



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 283 007**

51 Int. Cl.:
C12N 9/10 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Número de solicitud europea: **96940403 .7**
86 Fecha de presentación : **08.11.1996**
87 Número de publicación de la solicitud: **0871713**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.10.1998**

54 Título: **Utilización de la lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT) en el tratamiento de la aterosclerosis.**

30 Prioridad: **09.11.1995 US 6400 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2007

73 Titular/es: **THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA as represented by the SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES
National Institute of Health
Office of Technology Transfer
Westwood Building, Box OTT
Bethesda, Maryland 20892-9902, US**

72 Inventor/es: **Santamarina-Fojo, Silvia;
Hoeg, Jeffrey, M. y
Brewer, H., Bryan, Jr.**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 283 007 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

Utilización de la lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT) en el tratamiento de la aterosclerosis.

5 **Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a procedimientos para el tratamiento profiláctico y terapéutico de la aterosclerosis y a enfermedades que están relacionadas con una deficiencia en la actividad de lecitina colesterol aciltransferasa.

10 La aterosclerosis es un estado patológico de los mamíferos caracterizada por la acumulación de colesterol en las arterias. El colesterol se acumula en las células espumosas de la pared arterial, estrechando así el lumen. Esto da como resultado un flujo de sangre disminuido. Las secuelas clínicas de la aterosclerosis incluyen enfermedades cardíacas y ataque al corazón, accidente cerebrovascular, y enfermedad vascular periférica. Conjuntamente, estas enfermedades explican más muertes relacionadas con enfermedades en países industrializados que cualquier otra causa.

15 El desarrollo de la aterosclerosis humana está relacionado inversamente con la concentración de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en el suero. D.J. Gordon y B.M. Rifkind (1989) *N. Engl. J. Med.* 321: 1311. Altas concentraciones de HDL parecen proteger frente al desarrollo de aterosclerosis prematura, mientras que se asocian las bajas concentraciones de HDL-colesterol con un aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular. D.J. Gordon *et al.* (1986) *Circulation* 74:1217. Se ha propuesto que un aumento del 1% en la concentración de HDL conduciría a una reducción del 3% en el desarrollo de aterosclerosis clínica en hombres. Gordon y Rifkind, citado anteriormente.

20 La enzima lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT) de proteínas plasmáticas cataliza la transferencia de ácidos grasos desde la posición sn-2 de la lecitina hasta el grupo hidroxilo libre del colesterol. J.A. Glomset *et al.* (1966) *J. Lipid Res.* 7:638. J. McLean *et al.* (1986) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 83: 2335-2339 describieron la clonación y la secuencia de ADNc de LCAT humana. J. McLean *et al.* (1986) *Nucl. Acids Res.* 14:9397-9406 describieron una secuencia génica completa para LCAT humana.

25 Se propuso en primer lugar hace casi 30 años que el procedimiento de esterificación con esta enzima podría ser la etapa clave en la transferencia de colesterol desde los tejidos del cuerpo hasta el hígado. Este procedimiento, denominado "transporte inverso de colesterol" (J.A. Glomset (1968) *J. Lipid Res.* 9: 155), se propuso para facilitar la eliminación de colesterol del cuerpo. Sin embargo, no se conocía que los aumentos en LCAT disminuían el riesgo de aterosclerosis.

30 Se conocen diversas mutaciones del gen de la LCAT. Los individuos que son homocigóticos para un mutante de LCAT no funcional presentan la enfermedad de deficiencia de LCAT clásica, caracterizada por nublado de la cornea, anemia normocrómica y glomerulosclerosis. Las mutaciones en el gen de la LCAT que dan como resultado algo de actividad de LCAT residual conducen a la enfermedad del ojo de pez, caracterizada por la opacidad de la cornea e hipoalfalipoproteinemia. H.-G. Klein *et al.* (1992) *J. Clin. Invest.* 89:499-506.

35 Por tanto, existe una necesidad de composiciones y procedimientos para el tratamiento profiláctico y terapéutico de la aterosclerosis y estados asociados con la carencia de LCAT. Esta invención satisface esta necesidad proporcionando composiciones y procedimientos para aumentar el nivel sérico de la actividad de LCAT.

45 **Sumario de la invención**

Se ha descubierto que aumentando el nivel de actividad de la lecitina colesterol aciltransferasa en un conejo (que es un modelo aceptado del desarrollo de la aterosclerosis en seres humanos; D.J. Gordon y B.M. Rifkind (1989) *N. Engl. J. Med.* 321: 1311), provoca una disminución en la acumulación de colesterol en las arterias. Este descubrimiento es sorprendente porque ningún resultado anterior había indicado que el aumento del nivel de actividad de LCAT presentaría un efecto de este tipo. En el modelo del conejo, el aumento en la cantidad de masa de LCAT humana en el suero en aproximadamente cinco veces el nivel normal humano, condujo también a disminuciones significativas en los triglicéridos totales, por lo menos aumentos de cinco veces en la cantidad de lipoproteínas de alta densidad y aproximadamente una disminución de siete veces en la razón de colesterol total con respecto a lipoproteínas de alta densidad en animales alimentados con una dieta rica en colesterol. Por tanto, el aumento de la actividad de LCAT en el suero de los seres humanos, conejos y otros mamíferos con modos similares de metabolismo lipoproteico es un tratamiento eficaz frente a la aterosclerosis.

60 La presente invención proporciona la utilización de lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT) en la preparación de un medicamento para disminuir la acumulación de colesterol en un sujeto que no presenta una deficiencia de LCAT. La invención incluye asimismo la utilización de LCAT para la preparación de un medicamento para el tratamiento de aterosclerosis en un sujeto que no presenta una deficiencia de LCAT.

65 Se describe un procedimiento que implica administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad farmacológicamente eficaz de LCAT. Se administra la composición por vía intravenosa. Se describen asimismo formas de dosificación farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad farmacológicamente eficaz de LCAT.

También se describe la transfección de células con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para la expresión de LCAT, mediante lo cual las células transfectadas expresan LCAT y secretan suficiente LCAT al suero para aumentar la LCAT hasta un nivel eficaz para disminuir la acumulación de colesterol. El procedimiento implica transfectar células *in vivo*. Alternativamente, el procedimiento implica transfectar células *ex vivo* y administrar células transfectadas que expresan y secretan LCAT al sujeto en una cantidad suficiente para aumentar la actividad de LCAT hasta un nivel eficaz para disminuir la acumulación de colesterol.

Se describen asimismo procedimientos que implican administrar un fármaco que regula por incremento la producción endógena de LCAT en el sujeto.

Se describe asimismo un procedimiento que implica aumentar tanto la actividad de LCAT sérica como el nivel de Apo A-I en el suero hasta una cantidad eficaz para disminuir la acumulación de colesterol. También se describen vectores que comprenden un ácido nucleico que comprende secuencias de control de la expresión operativamente unidas a una secuencia que codifica para la expresión de LCAT y secuencias de control de la expresión operativamente unidas a una secuencia que codifica para la expresión de un Apo A-I.

Se describen asimismo para el tratamiento de un estado de deficiencia de LCAT en un sujeto mamífero que comprende aumentar la actividad de LCAT en el suero del sujeto hasta un nivel terapéuticamente eficaz. El estado puede ser el síndrome de ojo de pez o síndrome de deficiencia de LCAT clásico.

Se describen asimismo mamíferos no humanos transgénicos para LCAT que presentan una actividad de LCAT en suero absoluta de por lo menos 1000 nmol/ml/h.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa una comparación de la aterosclerosis en conejos control y transgénicos que sobreexpresan LCAT humana mediante planimetría cuantitativa. Las aortas de conejos machos transgénicos con LCAT (n = 12) (parte superior) y control (n = 10) (parte inferior), alimentados mediante una dieta de comida con colesterol al 0,3% durante 17 semanas, se cultivaron y tiñeron con Sudan IV. El porcentaje del área superficial que se tiñó se determinó mediante planimetría de la imagen digitalizada. J. F. Cornhill *et al.* (1985) *Arteriosclerosis* 5:415. Las recopilaciones de las imágenes de los grupos de estudio se resumen para conejos control y transgénicos con tonos graduados de la probabilidad de distribución mostrados en la parte inferior.

La figura 2 (fotografías izquierda y derecha) muestra secciones transversales de la aorta de los conejos control y transgénicos alimentados con una dieta rica en colesterol. Se tomó una sección de 1 mm en la aorta torácica descendente en la misma posición para cada aorta, se tiñó con PAS, y se comparó el grado de acumulación de células espumosas en la íntima de los controles (izquierda) con la falta de formación de células espumosas en la íntima o cambio en el espesor en la íntima en las aortas transgénicas (derecha).

La figura 3 (gráficos izquierdo y derecho) muestra el grado de proliferación celular en la íntima tal como se muestra en la figura 2, cuantificado utilizando una razón de la íntima con respecto a la media. A.V. Chobanian *et al.* (1989) *Hypertension* 14:203. La evaluación cuantitativa tanto de la razón en la íntima/media ($p < 0,003$) como el porcentaje del área superficial ($p < 0,009$) fue significativamente inferior en los conejos con LCAT transgénicos que en los controles.

La figura 4 (A-H) muestra las correlaciones de Pearson bivariantes significativas ($p < 0,05$) de variables de posdieta con aterosclerosis aórtica en conejos control y transgénicos. La razón en la íntima/media se correlacionó bien con la evaluación planimétrica de aterosclerosis tanto en el grupo control (A) como en todo el grupo de estudio (E). La razón en la íntima/media se correlacionó inversamente con la gravedad de la aterosclerosis (B, F) y se correlacionó positivamente con el colesterol no HDL (C, G) y colesterol total/HDL-colesterol (TC/HDL) (D, H).

La figura 5 (A-B) representa la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos deducida de un clon genómico que codifica para una LCAT humana (SEC ID n°: 1).

Descripción detallada de la invención

Puesto que el procedimiento de acumular colesterol en las arterias conduce a la aterosclerosis y sus secuelas clínicas, por ejemplo, enfermedad cardíaca isquémica y ataque al corazón, accidente cerebrovascular, y enfermedad vascular periférica, la ralentización o inversión del procedimiento de acumulación de colesterol es eficaz en la invención o el tratamiento de aterosclerosis. Se describen composiciones y procedimientos para disminuir (es decir, ralentizar o invertir) la acumulación de colesterol en las arterias de un sujeto mamífero aumentando el nivel de actividad de la lecitina colesterol aciltransferasa ("LCAT") en el suero de un sujeto. Se describen asimismo procedimientos para mantener una razón de colesterol sérico total con respecto a lipoproteínas de alta densidad séricas en un mamífero por debajo de cinco:uno, considerado como un perfil de riesgo promedio para la enfermedad cardíaca (W.P. Castelli *et al.* (1986) *JAMA* 256:2835.). Se describen asimismo procedimientos previstos para el tratamiento de forma profiláctica o terapéutica de la aterosclerosis en un sujeto mamífero, en particular, un sujeto humano, aumentando la actividad de LCAT en el suero de un sujeto hasta una tasa eficaz para disminuir la acumulación de colesterol en el sujeto, en particular en las arterias del sujeto. También se describen, esta invención proporciona procedimientos para tratar estados

que implican deficiencias de LCAT, tales como síndrome de ojo de pez y enfermedad de deficiencia de LCAT clásica. También se describen procedimientos que implican el aumento de la actividad de LCAT en el suero hasta un nivel suficiente para mejorar el estado y, aumentarlo preferentemente hasta por lo menos niveles normales.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, “lecitina colesterol aciltransferasa”, o “LCAT” se refiere a una enzima de glucoproteína que puede encontrarse de manera natural en el suero sanguíneo de los mamíferos, incluidos los seres humanos, que cataliza la síntesis de ésteres de colesterol y lisolecitina a partir de fosfatidilcolina y colesterol no esterificado presente en lipoproteínas plasmáticas. La enzima se produce de manera natural principalmente por el hígado. Se ha aislado ADN genómico que codifica para una LCAT humana de 416 aminoácidos. Su secuencia de nucleótidos y su secuencia de aminoácidos deducida se proporcionan en la figura 5 (SEC ID NO: 1). Se describe la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida de una LCAT de ratón en C.H. Warden *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* 264: 21573-81. Cualquier LCAT mamífero o variación alélica enzimáticamente activa de ella es útil en esta invención, tal como son otras variantes, incluyendo fragmentos de la enzima que presenta la actividad enzimática descrita anteriormente. Una “variación alélica” en el contexto de un polinucleótido o un gen es una forma alternativa (alelo) de un gen que existe en más de una forma en la población. Al nivel polipeptídico, las “variantes alélicas” difieren generalmente unas de otras por sólo una, o como mucho, unas pocas sustituciones de aminoácidos. Una “variación de especies” de un polinucleótido o un polipéptido es una en la que la variación se produce de manera natural entre diferentes especies de un organismo. Un “fragmento” o “segmento” polipeptídico es un alargamiento de residuos de aminoácidos de por lo menos aproximadamente 6 aminoácidos contiguos de una secuencia particular, más normalmente de por lo menos aproximadamente 12 aminoácidos.

La cantidad de LCAT o actividad de LCAT en el suero puede determinarse de varias formas. La masa de LCAT puede determinarse mediante un radioinmunoensayo competitivo de doble anticuerpo. Se conocen también procedimientos rutinarios para medir la actividad de LCAT absoluta en el suero y para medir la más informativa tasa de esterificación de colesterol. Véase, por ejemplo, J.J. Albers *et al. Methods in Enzymol.* 129:763-783 (1986) y M.P.T. Gillett y J.S. Owens, Capítulo 7b, págs. 187-201, en *Lipoprotein Analysis - A Practical Approach*, C.A. Converse y E.R. Skinner, eds. La actividad de LCAT puede determinarse midiendo la conversión de colesterol radiomarcado a éster de colesterol tras la incubación de la enzima y los sustratos de liposomas de lecitina colesterol radiomarcados que contienen Apo A-I. La tasa de esterificación de colesterol endógeno puede determinarse midiendo la tasa de conversión de colesterol marcado a éster de colesterol tras la incubación de plasma fresco que se marca con una cantidad traza de colesterol radiactivo por equilibrado con una mezcla de [¹⁴C] colesterol-albúmina a 4°C. Se proporciona un protocolo más detallado en los ejemplos. La tasa de esterificación de colesterol endógeno es una mejor medición de la actividad de LCAT terapéutica puesto que refleja no sólo la cantidad de actividad de LCAT presente en el suero, sino también la naturaleza y cantidad de sustrato y cofactores en el plasma. Por tanto, la tasa de esterificación de colesterol no es necesariamente proporcional ni a la masa de LCAT ni a la actividad de LCAT absoluta.

Tal como se utiliza en la presente memoria, “sujeto mamífero” se refiere a un individuo de cualquier especie mamífera que desarrolla signos de aterosclerosis, incluyendo los seres humanos. Estos signos o indicadores incluyen, por ejemplo, el desarrollo de placas de colesterol en las arterias y calcificación, cuyo grado puede determinarse mediante tinción con Sudan IV, o el desarrollo de células espumosas en una arteria. La aterosclerosis también se caracteriza por un estrechamiento de las arterias detectado por, por ejemplo, CT ultrarrápida, de ultrasonidos y angioplastia coronaria. Los sujetos mamíferos preferidos para el tratamiento con LCAT de la aterosclerosis comprenden los que presentan un modo de metabolismo de lipoproteínas similar a los seres humanos y conejos, tales como primates no humanos.

45 *Tratamientos profilácticos y terapéuticos*

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “tratamiento” se refiere tanto a tratamiento profiláctico como terapéutico. Por ejemplo, puede administrarse tratamiento profiláctico a los sujetos con riesgo de desarrollar aterosclerosis. Un factor de riesgo es un perfil de lipoproteínas aterogénicas. Por ejemplo, una razón de colesterol sérico con respecto a lipoproteínas de alta densidad superior a 5:1 indica un riesgo más alto que el promedio de desarrollar aterosclerosis. Otros factores que indican un riesgo mayor de aterosclerosis incluyen un nivel de colesterol sérico superior a aproximadamente 240 mg/dl; un nivel de lipoproteínas de alta densidad inferior a aproximadamente 35 mg/dl; y un nivel de lipoproteínas de baja densidad superior a aproximadamente 190 mg/dl. De manera terapéutica, el tratamiento descrito puede administrarse a individuos que ya padecen aterosclerosis o una enfermedad asociada con ella.

El nivel de actividad de LCAT sérica eficaz para disminuir la acumulación de colesterol depende de varios factores, incluyendo la especie, la forma de administración, la salud general del sujeto, el resultado deseado (por ejemplo, tratamiento de profilaxis o terapéutico) y el juicio del médico que receta. Por ejemplo, el médico puede decidir qué niveles de riesgo para enfermedad cardíaca indican tratamiento profiláctico, y qué nivel objetivo de LCAT está indicado para el tratamiento de una persona que ya padece de aterosclerosis. Los niveles de LCAT suficientes para disminuir de forma medible la tasa de acumulación de colesterol son de por lo menos aproximadamente una vez y media la tasa de esterificación de colesterol normal para la especie mamífera y, más preferentemente, por lo menos dos veces, por lo menos aproximadamente cinco veces, por lo menos aproximadamente diez veces, por lo menos aproximadamente quince veces o por lo menos aproximadamente veinte veces.

En seres humanos, la tasa de esterificación de colesterol normal está comprendida entre aproximadamente 60 nmol/ml/h y aproximadamente 130 nmol/ml/h. El tratamiento eficaz de la aterosclerosis en seres humanos puede

implicar aumentar el nivel de actividad de LCAT sérica para lograr una tasa de esterificación de colesterol de por lo menos 200 nmol/ml/h, de por lo menos 250 nmol/ml/h, de por lo menos 500 nmol/ml/h, de por lo menos 1.000 nmol/ml/h o de por lo menos 2.000 nmol/ml/h. El aumento en la masa de LCAT en el suero da como resultado un aumento en las tasas de esterificación de colesterol. Normalmente, los seres humanos presentan aproximadamente 5 μg de LCAT por ml de suero. Por tanto, el aumento de LCAT hasta por lo menos 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de suero puede aumentar la tasa de esterificación de colesterol hasta niveles antiateroscleróticos. El aumento de LCAT hasta por lo menos 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de suero, por lo menos 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de suero, por lo menos 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de suero o por lo menos 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de suero puede también lograr estos fines.

10 *Procedimientos para aumentar los niveles séricos de LCAT*

El nivel sérico de LCAT puede aumentarse mediante cualquier medio disponible. Esto incluye, sin limitación, la administración directa de la enzima LCAT, la expresión de LCAT a través de tratamiento génico y la regulación por incremento de LCAT endógena a través de la administración de fármacos.

15 *1. Administración de enzima LCAT*

El nivel de actividad de LCAT en un sujeto puede aumentarse administrando al sujeto una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad farmacológicamente eficaz de LCAT. Una cantidad farmacológicamente eficaz de LCAT es una cantidad eficaz para disminuir la tasa de acumulación de colesterol en un sujeto. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "composición farmacéutica" se refiere a una composición adecuada para su utilización farmacéutica en un mamífero. Por tanto, las composiciones farmacéuticas son relativamente no tóxicas para el animal al que se administra la composición.

25 "Vehículo farmacéuticamente aceptable" comprende cualquiera de los excipientes, tampones y vehículos farmacéuticos convencionales, tales como una solución salina tamponada de fosfato, agua y emulsiones. Vehículos farmacéuticos adecuados y sus formulaciones se describen en Martin, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19^a Ed. (Mack Publishing Co., Easton 1995). Los líquidos son los vehículos farmacéuticos preferidos para la preparación de las composiciones farmacéuticas de esta invención.

30 Se proponen las composiciones farmacéuticas para todas las formas de administración bien conocidas y, en particular, administración parenteral para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico. También se contempla la administración local, tal como por vía transdérmica. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en una variedad de formas farmacéuticas unitarias que dependen del procedimiento de administración. Por ejemplo, formas farmacéuticas unitarias para administración parenteral incluyen dosis unitarias de disoluciones inyectables.

Puede administrarse LCAT mediante cualquier medio conocido en la técnica para la administración de proteínas. Sin embargo, se prefiere la administración sistémica por inyección. Esto incluye administración intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, y subcutánea. La inyección puede ser automatizada mediante, por ejemplo, una bomba programable. Por tanto, la presente invención proporciona composiciones para la administración intravenosa que comprenden una disolución de LCAT disuelta o suspendida en un vehículo aceptable, preferentemente un vehículo acuoso. Puede utilizarse una variedad de vehículos acuosos, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina al 0,4%, y similares. Por ejemplo, una solución salina tamponada de fosfato (PBS) es particularmente adecuada para la administración de proteína de LCAT. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización bien conocidas convencionales, o pueden filtrarse de forma estéril. Los aditivos pueden incluir también principios activos adicionales tales como agentes bactericidas, o estabilizantes. Las disoluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su utilización tal como están, o liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una disolución acuosa estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables tal como se requiere para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de tamponamiento y de ajuste de pH, agentes que ajustan la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitano, oleato de trietanolamina, etc.

55 También puede administrarse sistémicamente LCAT por vía transmucosa o transdérmica. Para la administración transmucosa o transdérmica, se utilizan en la formulación agentes penetrantes apropiados para la barrera que va a permearse. Tales penetraciones se conocen generalmente en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, derivados de ácido fusídico y sales biliares. Además, pueden utilizarse detergentes para facilitar la permeación. La administración transmucosa puede ser a través de pulverizadores nasales, por ejemplo, o utilizando supositorios.

60 La forma, cantidades y tiempo de administración son generalmente una materia para la determinación por el médico. En una forma de realización, se administra la composición farmacéutica como una forma farmacéutica unitaria. Se estima que aproximadamente 40 mg de LCAT son suficientes para aumentar la cantidad de LCAT sérico en un ser humano aproximadamente al doble. En consecuencia, una forma farmacéutica unitaria puede contener aproximadamente de 10 mg a aproximadamente 1.000 mg o aproximadamente de 40 mg a aproximadamente 200 mg. En ciertas formas de realización, la forma farmacéutica presenta aproximadamente 100 mg, o aproximadamente 500 mg de LCAT. Dependiendo del nivel objetivo de LCAT que va a mantenerse y el tiempo de administración, pueden administrarse dosis pequeñas frecuentemente o pueden administrarse dosis grandes menos frecuentemente.

La invención contempla varias fuentes de LCAT para su incorporación en composiciones farmacéuticas. La LCAT puede aislarse de plasma. Un procedimiento para aislar LCAT de suero humano se describe en los ejemplos.

Alternativamente, LCAT puede ser LCAT recombinante y, más particularmente, LCAT recombinante humano. J. McLean *et al.* (1986) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 83:2335-2339 describe la clonación y secuencia de un ADNc de LCAT humana. J. McLean *et al.* (1986) *Nucl. Acids Res.* 14:9397-9406 describe una secuencia génica completa para LCAT humana. (Véase figura 5) J.S. Hill *et al.* (1993) *J. Lipid Res.*, 34:1245-1251 describe la expresión de LCAT recombinante. Los procedimientos para preparar vectores de expresión se describen con mayor detalle a continuación. Estos vectores pueden utilizarse para expresar LCAT recombinante en una variedad de sistemas de expresión incluyendo mamíferos, insectos y sistemas bacterianos. Los huéspedes unicelulares pueden ser eucariotas o procariotas e incluyen, por ejemplo, *E. coli*, levadura, células de insectos, células COS o células de ovario de hámster chino ("CHO"). Se describe un procedimiento para expresar LCAT en células COS-7 en J. McLean (1986) *Proc. Nat'l. Acad. Sci., USA.*, 83:2335-2339. Las secuencias de control de la expresión pueden seleccionarse como resulte apropiado. LCAT recombinante puede purificarse a continuación mediante, por ejemplo, el procedimiento descrito en los ejemplos.

El término "vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de la expresión operativamente unido a una secuencia de nucleótidos que va a expresarse. Un vector de expresión comprende suficientes elementos que actúan en cis para la expresión; otros elementos para la expresión pueden proporcionarse mediante la célula huésped o sistema de expresión *in vitro*. Los vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la técnica, tales como cósmidos, plásmidos (por ejemplo, plásmidos desnudos o contenidos en liposomas) y virus que incorporan el polinucleótido recombinante. La construcción de vectores de expresión y la expresión de genes en células transfectadas implica la utilización de técnicas de clonación molecular también bien conocidas en la técnica. Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1989) y *Current Protocols in Molecular Biology*, P.M. Ausubel *et al.*, eds., (Current Protocols, una colaboración entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc.

2. Terapia génica

También se describe que el nivel de actividad de LCAT aumenta a través de la utilización de terapia génica. Tal como se utiliza en la presente memoria, "terapia génica" se refiere a la transferencia y, preferentemente, a la integración estable de nueva información genética en células en un sujeto. Los procedimientos para aumentar los niveles de actividad de LCAT mediante terapia génica implican transfectar células con un ácido nucleico que incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica para la expresión de LCAT. Las células transfectadas expresan LCAT y la secretan al suero del sujeto. Estas células se transfectan en un número suficiente o para la expresión de LCAT tan alta que aumentan la cantidad de LCAT hasta un nivel eficaz para disminuir la acumulación de colesterol. Los genes que codifican para LCAT se introducen en el sujeto de una de dos maneras. También se describe que se introducen los genes en células de los individuos *in vivo* por medio de vectores de expresión, o se introducen los genes en células *ex vivo*, y las células transfectadas que expresan y secretan LCAT se administran al sujeto.

En enfoques *in vivo*, las células del hígado son dianas útiles para la transfección. Las células del hígado producen LCAT, de modo que presentan la maquinaria de procesamiento para producir la encima de forma recombinante. Además, los vectores inyectados en el torrente circulatorio pasan rápidamente a través del hígado, por lo que las células del hígado se exponen rápidamente a los vectores. Las células madre hematopoyéticas son asimismo dianas útiles para la terapia génica puesto que se multiplican rápidamente, produciendo así más células que pueden producir LCAT.

Los enfoques *ex vivo* también son atractivos porque permiten más control sobre el procedimiento de transfección. Por ejemplo, las células transfectadas pueden someterse a prueba y las que expresan LCAT en las cantidades más altas pueden seleccionarse. Las células madre hematopoyéticas pueden tomarse del sujeto, transfectarse *ex vivo* e introducirse de nuevo en el sujeto. Por tanto, se describe asimismo que las células son células del sujeto. Mientras que los aloinjertos pueden ser útiles, lo injertos sinérgicos son los más útiles puesto que es menos probable que provoquen una respuesta de huésped frente a injerto.

Se conocen bien en la técnica procedimientos para transfectar genes en células de mamíferos, o bien *in vivo* o bien *ex vivo*, y para obtener su expresión. Éstos incluyen, por ejemplo, transfectar células con el ácido nucleico por medio de vectores de ácido nucleico, tales como vectores virales (incluyendo, por ejemplo, vectores retrovirales, vectores de adenovirus, vectores de virus adenoasociados, vectores del virus de la hepatitis, vectores del virus vaccinia y vectores del virus del herpes), vectores de plásmido, vectores de cósmido, vectores de microencapsulación (por ejemplo, microesferas liposomales catiónicas o no cargadas); microinyección; electroporación; transferencia cromosómica; precipitación con calcio; o inyección biolística (por ejemplo, unir ADN a una partícula, tal como una perla de oro, e impulsarla dentro de una célula). Véase también, por ejemplo, *Methods in Enzymology*, vol. 185, Academic Press, Inc., San Diego, CA (D.V. Goeddel, ed.) (1990) o M. Kriegler, *Gene Transfer and Expression - A Laboratory Manual*, Stockton Press, Nueva York, NY, (1990).

Los vectores virales son particularmente útiles para la terapia génica. Los procedimientos para construir y utilizar vectores virales se conocen en la técnica y se revisan, por ejemplo, en Miller y Rosman (1992) *Biotechniques*, 7:980-

990. La especificidad para seleccionar como diana vectores virales puede utilizarse para seleccionar como diana tipos de células predeterminadas e introducir una molécula de ácido nucleico dentro de la célula. Por tanto, el vector viral seleccionado dependerá, en parte, del tipo de célula que va a seleccionarse como diana. Por ejemplo, los hepatocitos, que normalmente producen LCAT, son una diana atractiva para la transfección. Además, un vector viral puede convertirse en específico de tejidos incorporando un promotor o potenciador específico de tejidos dentro del vector.

Los adenovirus son vectores útiles para la transferencia de genes dentro de células. Las células del hígado presentan un receptor de adenovirus. Por tanto, tras la inyección intravenosa de un adenovirus recombinante, aproximadamente el 95% de los virus infectarán selectivamente las células del hígado. Los vectores de adenovirus que carecen de replicación pueden prepararse mediante delección de secuencias que comprenden E1A, E1B, y una parte de la región E3, perjudicando la capacidad de estos virus para replicarse o transformarse en células no permisivas. Véase, por ejemplo, Hurwitz *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:163-167. El promotor/potenciador temprano del citomegalovirus puede utilizarse para impulsar la transcripción de un gen de la LCAT insertado con una secuencia de poliadenilación de SV40 clonada en sentido corriente abajo 3' de este gen indicador. Los adenovirus recombinantes de alta titulación pueden prepararse mediante amplificación en células LE293 utilizando los procedimientos establecidos. Los virus pueden purificarse a partir de lisados celulares mediante ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio seguido de desalación en una columna de Sephadex G-50 (Sigma Biochemicals, St. Louis MO) en PBS. Los virus purificados pueden utilizarse entonces para la inyección en el sujeto. Los vectores de adenovirus en los que se ha delecionado la región E4 también son atractivos como vectores de adenovirus de segunda generación que presentan una expresión prolongada y menos inmunogenicidad posible.

El virus adenoasociado (AAV), es un parvovirus de ADN monocatenario. Los vectores de AAV presentan varias ventajas que los hacen deseables como sistemas de inserción génica. No presentan ningún modo conocido de patogenicidad y el 80% de las personas en los Estados Unidos son actualmente seropositivos al AAV. Ostrove *et al.* (1981) *Virology* 113:521; Cukor *et al.*, en *The Parvoviruses* (ed. Berns, Plenum, NY, 1984). Los viriones de AAV son resistentes a tratamientos físicos, tales como sonicación e inactivación térmica no tolerados por otros virus durante la purificación. Samulski *et al.* (1989) *J. Virol.* 63:3822-3828. A diferencia de los retrovirus, es posible la infección y/o transducción de células que no están en división. Como los retrovirus, el AAV se integra en el genoma de la célula huésped tras la infección. Kotin *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2211-2215; Samulski *et al.* (1991) *EMBO J.* 10:3941-3950. Sin embargo, a diferencia de los retrovirus, el AAV se integra preferentemente en un sitio cromosómico específico (19q13.3). En este sitio, el AAV no produce ninguna alteración significativa en las propiedades de crecimiento o características morfológicas de las células humanas. Además, la integración de AAV en el genoma celular puede tener lugar en células que no están proliferando. Lebkowski *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:3988-3996. El AAV también presenta una capacidad de clonación razonablemente grande, ligeramente más de la mitad de la de los virus retrovirales. Los vectores de AAV recombinantes no contienen actividad de promotor endógeno, permitiendo que se hagan elecciones de promotor específicas dependiendo del tipo de célula diana, sin considerar las complicaciones que surgen de los promotores virales endógenos. A diferencia de los vectores retrovirales, los vectores de AAV empaquetados pueden concentrarse de modo que pueden utilizarse multiplicidades de infección que superan 1,0 en experimentos de transducción. Esto significa que prácticamente el 100% de las dianas en un cultivo podrían transducirse, obviando la necesidad para una etapa de selección.

AAV es un virus defectuoso que sólo crece en células en las que se proporcionan ciertas funciones mediante un virus cooperador que infecta conjuntamente tal como adenovirus o virus herpes. La infección de células con AAV en ausencia de las funciones cooperadoras da como resultado la integración de AAV en el genoma de la célula huésped sin replicación. El genoma de AAV tiene dos copias de una ITR larga-nucleótido-145 (repetición terminal invertida), una en cada extremo. Srivastava *et al.* (1983) *J. Virol.* 45:555-564. Las secuencias ITR proporcionan un origen de replicación y también median la integración y la escisión del genoma de AAV del genoma de la célula.

La secuencia entre las ITR de aproximadamente 4470 nucleótidos contienen dos marcos de lectura abiertos para los genes *rep* y *cap*. Hermonat *et al.* (1984) *Virology* 51:329-339. El gen *cap* codifica para proteínas de cápsida. El gen *rep* codifica para proteínas que se sabe que se necesitan para la replicación. Los vectores *rep*⁻ pueden mostrar una preferencia reducida por la integración específica de sitio en el cromosoma 19. Sin embargo, la frecuencia de integración global de los vectores *rep*⁻ es una frecuencia de integración aproximadamente 80 veces mayor que la de los vectores *rep*⁺ comparables, sugiriendo que *rep* inhibe en lugar de facilitar la integración. McLaughlin *et al.* (1988) *J. Virol.* 62:1963-1973.

En AAV recombinante, todas las secuencias codificantes de proteínas (tales como *cap*, *lip* y *rep*) pueden sustituirse por la secuencia que codifica para LCAT. El AAV recombinante se replica por transfección conjunta de una célula que porta el vector de AAV que lleva el gen de interés, junto con un plásmido de AAV cooperador que expresa todos los genes de AAV esenciales, en células infectadas por adenovirus o virus herpes, que suministran funciones cooperadoras adicionales necesarias para la replicación de AAV y la producción de nuevas partículas virales.

Se ha propuesto un procedimiento adicional en el que un vector recombinante que contiene secuencias ITR de AAV pero que carece de todas las otras secuencias de AAV es rodeado por lípidos catiónicos y se introduce en una célula mediante lipofección. Phillip *et al.*, documento WO 95/07995.

En el caso de vectores virales no infecciosos, el genoma del virus cooperador se muta normalmente para destruir la señal de empaquetamiento viral necesaria para encapsular el ácido nucleico en partículas virales. Sin embargo, el virus

ES 2 283 007 T3

cooperador retiene genes estructurales necesarios para empaquetar un virus recombinante introducido conjuntamente que contiene un gen de interés. Sin una señal de empaquetamiento, las partículas virales no contendrán un genoma y, por tanto, no pueden proceder a través de rondas de infección posteriores.

5 Los vectores retrovirales pueden utilizarse para procedimientos de selección como diana y tratamiento *in vivo* o *ex vivo*. Los vectores retrovirales pueden construirse o bien para funcionar como partículas infecciosas o bien para experimentar sólo una ronda inicial única de infección. En el primer caso, se modifica el genoma del virus de modo que mantiene los genes, secuencias reguladoras y señales de empaquetamiento necesarios para sintetizar nuevas proteínas virales y ARN. Sin embargo, se destruyen los genes que confieren el potencial oncogénico de estos virus.
10 Tras sintetizarse las proteínas virales, la célula huésped empaqueta el ARN en nuevas partículas virales, que pueden experimentar rondas de infección adicionales. El genoma viral también se modifica por ingeniería para codificar y expresar la proteína recombinante deseada. Se describen procedimientos mejorados de transfección de linfocitos de sangre periférica por vectores retrovirales en Yang *et al.* (1995) *Nature Medicine* 1 (9):890-893 y Bunnell *et al.* (1995) *Proc. Acad. Nat'l Sci. USA* 92:7739-7743.

15 Puede utilizarse una línea celular de empaquetamiento retroviral tal como PA317 (American Type Culture Collection, Bethesda, MD, número de registro CRL 9078) para producir vectores retrovirales anfotrópicos infecciosos. El plásmido retroviral, pLNCX (D. Miller y G. Rosman (1989) *Biotechniques* 7:980) puede contener la secuencia de control de la expresión operativamente unida a la secuencia de ácido nucleico para expresarse en "X". Ese plásmido contiene un promotor/potenciador (L) de LTR de virus de leucemia murina de Moloney; un gen de resistencia a neomicina que codifica para neomicina fosfotransferasa (N); un promotor (C)/LTR de citomegalovirus humano y el gen de codificación que va a expresarse (X). El gen de la LCAT se inserta mediante técnicas convencionales en un sitio de clonación preexistente mediante la sustitución del gen de fosfotransferasa para resistencia a neomicina por uno que codifica para una fosfotransferasa de resistencia a higromicina.

20 Los retrovirus han sido el vehículo preferido para la inserción génica en células madre hematopoyéticas humanas debido a su alta eficacia de transferencia génica y la integración colineal y estable de los genes transfectados en el ADN cromosómico. Sin embargo, los genes de retrovirus pueden integrarse en el cromosoma de la célula huésped sólo si la célula se está dividiendo activamente.

30 Los ácidos nucleicos utilizados para transfectar células con el gen de la LCAT normalmente estarán en la forma de un vector de expresión que incluye una secuencia de control de la expresión operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que codifica para la expresión de LCAT. El término "secuencia de control de la expresión" se refiere a una secuencia de nucleótidos en un polinucleótido que regula la expresión (transcripción y/o traducción) de una secuencia de nucleótidos operativamente unida a la misma. El término "operativamente unido" se refiere a una relación funcional entre dos partes en las que la actividad de una parte (por ejemplo, la capacidad para regular la transcripción) da como resultado una acción sobre la otra parte (por ejemplo, la transcripción de la secuencia). Las secuencias de control de la expresión pueden incluir, por ejemplo y sin limitación, secuencias de promotores (por ejemplo, inducibles o constitutivos), potenciadores, terminadores de la transcripción, un codón de iniciación (es decir, ATG), señales de corte y empalme para intrones, y codones de terminación.

40 Las secuencias de control de la expresión apropiadas para las células de mamíferos incluyen, por ejemplo, el promotor de SV40, el promotor del RSV (virus del sarcoma de Rous), el promotor del CMV (citomegalovirus) y el promotor de metalotioneína. Se prefiere el promotor de CMV para sistemas de expresión transitoria. Se prefiere el promotor de metalotioneína para sistemas de expresión estable. Los promotores pueden ser constitutivos o pueden ser específicos del tejido para el tipo de célula diana, por ejemplo, específicos de hepatocitos. Se prefieren las secuencias de control de la expresión que proporcionan altos niveles de expresión para producir LCAT en cantidades suficientes para producir una disminución en la acumulación de colesterol.

50 Tal como se utiliza, el término "que codifican para la expresión de LCAT" se refiere a secuencias que, tras la transcripción y traducción de ARNm, producen secuencias polipeptídicas de la enzima LCAT. Así, por ejemplo, el ADNc, ADN genómico con intrones eliminados tras la transcripción y el procesamiento en ARNm, y secuencias de generadas que codifican para LCAT, todos codifican para la expresión de LCAT. Las secuencias de ADN que codifican para la expresión de LCAT pueden obtenerse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse secuencias codificantes mediante síntesis química. También, pueden concebirse cebadores de PCR utilizando las secuencias de LCAT proporcionadas en la presente memoria y puede aislarse el ADNc o ADN genómico mediante amplificación. Los siguientes polinucleótidos son útiles como cebadores para producir sondas para aislamiento de una biblioteca de un ADNc o clon genómico que codifica para una LCAT humana.

60 1. Sonda I: una sonda de exón 1 de LCAT en 5' de 340 pb

Oligonucleótido sentido: 5' GGC TCC CTG AGG CTG TGC CCC TTT 3' (SEC ID NO: 2)

65 Oligonucleótido antisentido: 5' TGG CGT GGT GCA TCA GGG GCC TGG 3' (SEC ID NO: 3)

2. Sonda II: una sonda de LCAT en 3' de 380 pb

Oligonucleótido sentido: 5' CTG GTG TGG AAG TAT ACT GCT TTT 3' (SEC ID NO: 4)

5 Oligonucleótido antisentido: 5' CTT CAA CCT GAA ACA TAG CCA TCA 3' (SEC ID NO: 5)

La técnica de "reacción en cadena de polimerasa", o "PCR", tal como se utiliza en la presente memoria se refiere generalmente a un procedimiento en el que se amplifican cantidades mínimas de una parte específica de ácido nucleico, ARN y/o ADN, tal como se describe en la patente US n° 4.683.195 concedida el 28 de julio de 1987. Generalmente, es necesario que esté disponible la información de la secuencia desde los extremos de la región de interés o más allá, de manera que puedan diseñarse los cebadores de oligonucleótidos; estos cebadores serán idénticos o similares en secuencia a las cadenas opuestas en el molde que va a amplificarse. Los nucleótidos terminales en 5' de los dos cebadores pueden coincidir con los extremos de material amplificado. Puede utilizarse PCR para amplificar secuencias de ARN específicas, secuencias de ADN específicas del ADN genómico total, y el ADNc transcrito a partir del ARN celular total, secuencias de bacteriófagos o plásmidos, etc. Véase, generalmente, Mullis *et al.* (1987) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263; Erlich, ed., *PCR Technology*, (Stockton Press, NY, 1989). Tal como se utiliza en la presente memoria, se considera que la PCR es un ejemplo, pero no el único, de procedimiento de reacción de una polimerasa de ácido nucleico para amplificar una muestra de ácido nucleico, que comprende la utilización de un ácido nucleico conocido (ADN o ARN) como cebador.

Un "polinucleótido aislado" es un polinucleótido, por ejemplo, un ARN, ADN, o polímero mixto, que está sustancialmente separado de otras secuencias de ADN que acompañan de forma natural a una secuencia humana nativa, por ejemplo, ribosomas, polimerasas, y muchas otras secuencias genómicas humanas. El término engloba una secuencia de polinucleótido que se ha eliminado de su entorno en el que se produce de forma natural, e incluye aislados de ADN clonado o recombinante y análogos sintetizados químicamente o análogos sintetizados biológicamente por sistemas heterólogos. Una molécula sustancialmente pura incluye formas aisladas de la molécula. Un "polipéptido aislado" o proteína presenta un significado similar estando el polipéptido o proteína sustancialmente separado de cualquier contaminante celular y componente asociado de forma natural con la proteína *in vivo*, de modo que es la especie macromolecular predominante en la composición.

Se evitan algunas de las desventajas que provienen de la utilización de vectores virales mediante la transfección de un fragmento de ADN en células de forma no biológica, por ejemplo, mediante lipofección, transformación química, electroporación o inyección biolística. En estos enfoques, pueden prepararse cantidades abundantes de ADN puro mediante transfecciones, y pueden albergar fragmentos mucho más grandes. Se prefieren tales enfoques para células que pueden retirarse temporalmente del cuerpo.

El término "recombinante" o "molécula de ADN recombinante" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que no se produce de forma natural, o que se prepara mediante combinación artificial de dos segmentos de la secuencia separados de otro modo. Con "producido de forma recombinante" se hace referencia a la combinación artificial conseguida con frecuencia mediante o bien medios de síntesis química, o bien mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante técnicas de ingeniería genética. Esto se realiza normalmente para sustituir un codón por un codón redundante que codifica para el mismo o un aminoácido conservativo, mientras se introduce o se elimina normalmente un sitio de reconocimiento de secuencia. Alternativamente, se realiza para unir segmentos de ácido nucleico de las funciones deseadas para generar una entidad genética única que comprende una combinación deseada de funciones que no se encuentran en las formas naturales comunes. Los sitios de reconocimiento de enzima de restricción son a menudo la diana de tales manipulaciones artificiales, pero otras dianas específicas de sitio, por ejemplo, promotores, sitios de replicación de ADN, secuencias de regulación, secuencias de control, u otras características útiles pueden incorporarse mediante diseño. "Moléculas de ADN recombinantes" incluyen vectores de expresión y clonación. Un "fragmento" de un polinucleótido es un tramo de por lo menos aproximadamente 18 nucleótidos, más normalmente de por lo menos 40 nucleótidos.

3. Regulación por incremento de LCAT endógena

Otro procedimiento para aumentar el nivel sérico de actividad de LCAT es a través de la administración de fármacos que regulan por incremento la producción endógena de LCAT en el sujeto. Ya se sabe que los andrógenos regulan por disminución la expresión de LCAT. J.J. Albers *et al. Biochim. Biophys. Acta* 795:293-296 (1984). También, los niveles de LCAT son superiores en mujeres que en hombres. J.J. Albers *et al. Atherosclerosis* 43:369-379 (1983). Se espera que los estrógenos y análogos de estrógenos regulen por incremento la expresión de LCAT. Las cantidades de tales fármacos que van a administrarse pueden determinarse empíricamente por el médico.

Pueden identificarse fármacos candidatos seleccionando compuestos por su capacidad para aumentar la expresión de LCAT en modelos de animales o en modelos *in vitro*. En modelos de animales, el fármaco candidato puede administrarse a un animal para determinar el efecto sobre la actividad de LCAT en el animal. Alternativamente, tras la administración, el animal puede examinarse para determinar el efecto del fármaco sobre el desarrollo de aterosclerosis.

Los fármacos candidatos pueden identificarse seleccionando compuestos por su capacidad para aumentar la actividad de LCAT *in vitro*. En un procedimiento, se somete a prueba el compuesto para determinar su efecto sobre la capacidad de LCAT para producir esterificación de colesterol para dar éster de colesterol en un ensayo de actividad de LCAT tal como se describió anteriormente.

Procedimientos de tratamiento adicionales

El metabolismo del colesterol implica tanto la carga de colesterol sobre partículas de HDL a través de esterificación mediante LCAT como el transporte de colesterol al hígado mediante HDL. Se sabe que aumentando Apo A-I disminuye el riesgo de enfermedad cardíaca. A.C. Liu *et al.* (1994) *J. Lipid Res.* 35:2263-2267 y C. Paszty *et al.* (1994) *J. Clin. Invest.* 94:899-903. Ciertas versiones de Apo A-I, tales como Apo A-I milano, son particularmente protectoras. C.R. Sirtori *et al.* (1995) *Atherosclerosis* X págs. 50-55, Elsevier Science, NY y S. Ameli *et al.* (1994) *Circulation* 90:1935-41. Además, Apo A-I es un cofactor de la actividad de LCAT. C.J. Fielding *et al.* (1972) *Biochim Biophys. Acta* 270:513-518. En consecuencia, aumentando la actividad de LCAT en el suero del sujeto combinado con el aumento del transporte de colesterol al hígado aumentando HDL sérica o proporcionando HDL con mejores características de carga de colesterol, produce un efecto sinérgico para disminuir la acumulación de colesterol en las arterias de un sujeto. También se describe el aumento tanto de LCAT como del nivel de Apo A-I en el suero de un sujeto hasta una cantidad eficaz para disminuir la acumulación de colesterol. La cantidad de Apo A-I en el suero de un ser humano es normalmente de aproximadamente 130 mg/dl. También se describe que los niveles de Apo A-I pueden aumentarse hasta por lo menos 150 mg/dl o por lo menos 300 mg/dl. También se describe que se aumentan los niveles tanto de Apo A-I como de Apo A-I milano. También se aumenta Apo A-I milano hasta por lo menos 150 mg/dl o por lo menos 300 mg/dl. Los procedimientos para aumentar la cantidad de Apo A-I incluyen cualquiera de los ya descritos para aumentar los niveles de LCAT. Se describen los procedimientos para producir Apo A-I en la patente US nº 4.943.527 (Protter *et al.*).

También se describen vectores de expresión que comprenden un ácido nucleico que incluye secuencias de control de la expresión operativamente unidas a una secuencia que codifica para la expresión de LCAT. También se describen vectores de expresión que comprenden un ácido nucleico que incluye secuencias de control de la expresión operativamente unidas a una secuencia que codifica para la expresión de LCAT y secuencias de control de la expresión operativamente unidas a una secuencia que codifica para la expresión de una proteína Apo A-I, incluyendo, por ejemplo, Apo A-I milano.

Tratamiento de estados relacionados con una deficiencia de LCAT

Se describen procedimientos para tratar estados que provienen de una deficiencia de la actividad de LCAT, tales como síndrome de deficiencia de LCAT clásico, en el que LCAT está ausente, y el síndrome de ojo de pez, en el que el individuo sólo tiene niveles de actividad de LCAT residual, parcial. Los procedimientos implican aumentar los niveles de actividad de LCAT sérica en tales individuos hasta un nivel terapéuticamente eficaz. Aumentar los niveles séricos de LCAT hasta niveles aproximadamente normales, es decir, lograr una tasa de esterificación de colesterol de por lo menos 60 nmol/ml/h o de por lo menos 130 nmol/ml/h, es terapéuticamente eficaz. También, la LCAT puede aumentarse hasta lograr una tasa de esterificación de colesterol superior a los niveles normales, por ejemplo, tasas de aproximadamente 200 nmol/ml/h, 300 nmol/ml/h, 500 nmol/ml/h o 1.000 nmol/ml/h. Aumentando la masa de la LCAT en el suero hasta aproximadamente 5 µg/ml, o superior, por ejemplo, aproximadamente 10 µg/ml, aproximadamente 20 µg/ml, aproximadamente 50 µg/ml o aproximadamente 100 µg/ml, también se logran estos resultados. Los niveles de LCAT pueden aumentarse mediante cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente.

Mamíferos no humanos transgénicos

También se describen mamíferos no humanos transgénicos para LCAT cuyo suero tiene una tasa de esterificación de colesterol de por lo menos 1,5 veces o por lo menos dos veces el nivel normal, o una actividad sérica de la LCAT absoluta de por lo menos 1000 nmol/ml/h y, preferentemente, por lo menos 1500 nmol/ml/h. Estos animales son útiles en la producción de ganado más sano, en el estudio de la aterosclerosis y como selecciones para compuestos que aumentan o disminuyen la acumulación de colesterol. Tal como se utiliza en la presente memoria, "mamífero transgénico para LCAT" se refiere a un mamífero cuyas células germinales (es decir, ovocitos o espermatozoides), por lo menos, comprenden una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende secuencias de control de la expresión operativamente unidas a una secuencia de ácido nucleico que codifica para la expresión de la LCAT. Las secuencias de control de la expresión no se encuentran de forma natural operativamente unidas a la LCAT. Preferentemente, el ácido nucleico recombinante comprende una secuencia codificante de LCAT no nativa, es decir, una secuencia de LCAT que la especie no produce en la naturaleza. También se describe la utilización de LCAT cuya LCAT es una LCAT humana. Mamíferos transgénicos particularmente útiles incluyen conejos y roedores tales como ratones. Los mamíferos no humanos transgénicos pueden producirse tal como se describe en los ejemplos.

Ejemplos*Determinación de la tasa de esterificación de colesterol endógeno*

J.J. Albers *et al.*, (1986) *Methods in Enzymology* 129:763-783 describen el procedimiento siguiente para determinar la tasa de esterificación de colesterol endógeno. Para cada 25 ensayos, el reactivo de color enzimático se prepara de nuevo cada día mezclando 0,1 ml de una disolución de 1 mg de colesterol oxidasa/ml, 1 ml de una disolución de 2 mg de peroxidasa/ml, 1 ml de una disolución de 20 mg de 4-aminoantipirina/ml, 1 ml de una disolución de 50 mg de 2,4-dibromofenol/ml, 3,75 ml de una disolución de colato de sodio al 2%, y 30,65 ml de tampón de ensayo. Se pipetea cuarenta microlitros de plasma fresco en tubos de vidrio, por septuplicado para muestras tanto control como de prueba. A tiempo cero, se añaden 20 µl de una disolución de yodoacetato 150 mM a cada muestra control para

inhibir la reacción de la LCAT, mientras que se añaden 20 μ l de tampón de incubación (tampón fosfato 50 mM, pH 7,4) a cada muestra de prueba. Todas las muestras se incuban a 37°C durante 40 minutos. Al final de esta incubación, se añaden 20 μ l de disolución de yodoacetato 150 mM a cada muestra de prueba y se añaden 20 μ l de tampón de incubación a cada muestra control. Entonces, se añaden 1,5 ml de reactivo de color a cada una de todas las muestras y se incuban las mezclas durante 10 min. a 37°C. La absorbancia de las mezclas de ensayo se incuban durante 10 min. a 37°C. Se mide la absorbancia de las mezclas de ensayo espectrofotométricamente a una longitud de onda de 500 nm. Se determina el colesterol sin esterificar en cada muestra por comparación frente al color de la disolución patrón de colesterol que contiene de 1 a 100 μ g de colesterol sin esterificar cuyo color se desarrolla de la misma manera que en la disolución de muestra. Se obtiene la tasa de esterificación de colesterol mediante la resta de la cantidad de colesterol en las muestras de prueba de la de las muestras control. La tasa puede expresarse tanto como tasa de esterificación de colesterol fraccionaria (disminución en porcentaje de colesterol sin esterificar/h), como tasa de esterificación de colesterol molar (disminución en nmol de colesterol sin esterificar/ml de plasma/h).

Aislamiento de LCAT

J.J. Albers *et al.* *Methods in Enzymol.*, 129:763-783 (1986) describen el siguiente procedimiento para aislar LCAT. Se precipita el plasma con sulfato de dextrano-Mg²⁺ (MgCl₂ 500 mM) y se recoge el plasma. Se añade la mezcla a una columna de cromatografía de fenil-Sepharose y se equilibra con Tris 10 mM, NaCl 140 mM, y EDTA 1 mM, pH 7,4. Se eluye la LCAT lavando la columna con agua destilada. Se dializan las fracciones que contienen LCAT frente a fosfato de sodio 20 mM, pH 7,1, y se hacen pasar a través de una columna Affi-Gel Blue con este tampón. Se aíslan las fracciones que contienen la LCAT. Se equilibran estas fracciones con Tris 1 mM, EDTA 5 mM y NaCl 25 mM, pH 7,4. Se somete la mezcla a cromatografía de DEAE-Sepharose y se eluye la LCAT con un gradiente de NaCl-Tris lineal (de NaCl 25 mM, Tris 1 mM a NaCl 200 mM, Tris 10 mM) que contiene EDTA 5 mM. Se someten las fracciones que contienen LCAT a cromatografía de hidroxapatita. Se eluye la LCAT con un gradiente de fosfato lineal (de 15 mM a 60 mM), pH 6,9, NaCl 150 mM. Se someten las fracciones que contienen LCAT a filtración en gel Sephacryl S-200 y se eluye con Tris 10 mM, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4.

Producción de animales transgénicos

Se describen los procedimientos para producir mamíferos transgénicos en, por ejemplo, C.P. Landel (1991) *GATA* 8:83-94. Se induce la superovulación, mediante, por ejemplo, en primer lugar la administración de suero de yegua preñada, seguido de la administración de gonadotropina exógena de cuarenta y dos a cuarenta y ocho horas después. Entonces se permite que los animales se apareen. Se recogen los óvulos fertilizados para microinyección de hembras donantes que han superovulado. Se sacrifican las hembras y se extraen los oviductos. Se retiran los óvulos del oviducto y se lavan en tampón M2, descrito a continuación en la tabla 1. Se cultivan los óvulos y se separan de las células del cúmulo en tampón M16, descrito a continuación. Se microinyectan los óvulos con fragmentos de ADN purificado que codifican para la expresión de la LCAT. Se implantan los óvulos intactos microinyectados en los oviductos de madres adoptivas convertidas en seudopreñadas por apareamiento con machos estériles. Los animales no humanos transgénicos se identifican entre la descendencia nacida de las madres adoptivas.

El efecto del aumento de LCAT sobre la aterosclerosis en animales transgénicos

Se estudió el efecto del aumento de los niveles de LCAT humana sobre la aterosclerosis en el conejo. El conejo ha sido la especie animal principal utilizada para estudiar el desarrollo de aterosclerosis producida por el colesterol de la dieta durante más de 80 años (N. Anitschkow y S. Chalataw (1913) *Zentralbl. Allg. Path. Anat.* 24:1-9). Esta sensibilidad al colesterol de la dieta conduce a aterosclerosis en el conejo que se asemeja a placas ateroscleróticas humanas (M.L. Overturf y D.S. Loose-Mitchell (1992) *Curr. Opin. Lipidol.* 3:179-185). Las lipoproteínas de muy baja densidad del conejo son similares en su composición química, contenido de apolipoproteínas, y movilidad electroforética con electroforesis en gel de agarosa a las lipoproteínas de muy baja densidad humanas. M.J. Chapman (1980) *J. Lipid Res.* 21:789-853. Además, la apolipoproteína B, una apolipoproteína implicada en la aterogénesis, resulta evidente en lipoproteínas de densidad intermedia y lipoproteínas de baja densidad del conejo asemejándose mucho a las observadas en el hombre. *Id.* Como los seres humanos, el conejo expresa la proteína de transferencia de éster de colesterol que no sólo permite la transferencia de éster de colesterol derivado de lipoproteínas de alta densidad hasta partículas de lipoproteínas que contienen apolipoproteína B, sino que también es probable que desempeñe un papel en la aterosclerosis inducida por la dieta que desarrollan los conejos (A.R. Tall (1993) *J. Lipid Res.* 34:1255-1274). Por tanto, el sistema de modelo de conejo proporciona unos medios excelentes para detectar y cuantificar el impacto de tratamientos potenciales para tratar y prevenir la aterosclerosis en humanos.

Se utilizó un constructo que contiene el gen de la LCAT genómico humano de longitud completa para generar animales transgénicos. B.L. Vaisman *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270:12269. Este constructo contenía la totalidad de los intrones y 851 pb de las regiones no traducidas en 5' y 1134 pb de las en 3' del gen de la LCAT humano. Se seleccionó una biblioteca de cósmidos preparada a partir de ADN de glóbulos blancos genómico humano con una sonda de ADNc de LCAT humana de longitud completa tal como se describe. J. Sambrook *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989) y B.L. Vaisman *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270:12269-12275. Se preparó el ADN de clones identificados mediante aislamiento de ADN de minipreparaciones de lisis alcalina (J. Sambrook *et al.*, citado anteriormente), y se digirió con la enzima de restricción Sma I (New England Biolabs, Beverly, MA). Se aisló el fragmento de Sma I de 6,2 kb a partir de gel de agarosa mediante purificación con Gene Clean (Gene Clean Bio101 Inc., La Jolla, CA) seguido de subclonación en bluescript IKS-(Stratagene, La Jolla,

CA) para generar un plásmido de 9,16 kb. Tras la amplificación en *E. coli*, se aisló el ADN de plásmido mediante bandeo de CsCl doble (S.S. Fojo (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 124:308-313) seguido de diálisis extensiva y digestión con Sma I. Entonces se aisló de nuevo el fragmento de Sma I del fragmento de 6,2 kb a partir de geles de agarosa y se purificó con Gene Clean (Gene Clean Bio101 Inc., La Jolla, CA). Se volvió a purificar el fragmento purificado con Gene Clean mediante bandeo de CsCl, seguido de diálisis extensiva frente al tampón de inyección (tris 10 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM) antes de la microinyección.

Se aprobó la generación de conejos transgénicos por el Animal Care and Use Committee of the National Heart, Lung and Blood Institute. Se produjeron los animales transgénicos esencialmente tal como se describió anteriormente transflectando con el fragmento de Sma I que codifica para la expresión de la LCAT, anterior.

En el estudio de la extensión de la aterosclerosis, se sacrificaron animales mediante premedicación con xilazina (3 mg/libra), cetamina (15 mg/libra) y robinul (0,25 ml/10 libras) por vía intramuscular antes de o bien anestesia por inhalación de isoflurano o bien eutanasia con pentobarbital sódico por vía intravenosa.

Un nivel alto de expresión de LCAT humana condujo a niveles elevados de concentraciones de HDL-colesterol en el conejo. J.M. Hoeg *et al.* (1994) *Atherosclerosis* 109:11, resumen. Se expandió esta línea fundadora T-1 para estos estudios. Se estudiaron un total de 10 machos transgénicos para LCAT y 9 de control de 5-6 meses de edad. La masa de LCAT humana en el plasma de los transgénicos era de $27,25 \pm 6,27 \mu\text{g/ml}$ (media \pm DE), lo que fue más de 5 veces la masa media de LCAT de $5,56 \pm 0,91 \mu\text{g/ml}$ notificado en seres humanos. J.J. Albers *et al.* (1982) *Atherosclerosis* 43:369. La expresión de LCAT humana condujo a una actividad de LCAT en el nivel inicial en los conejos transgénicos fue 15 veces la de los controles (tabla 2). Comparado con los controles, los conejos transgénicos para LCAT tenían un aumento marcado en las concentraciones de colesterol total (617%; $p < 0,001$) y HDL (671 %; $p < 0,001$).

Entonces se alimentaron estos conejos con una dieta con colesterol al 0,3% (número de producto 4109000, Ziegler Brothers, Inc., Gardners, PA). La dieta rica en colesterol condujo a aumentos en los ratones control tanto de las concentraciones de colesterol total (19 veces) como especialmente de colesterol no HDL (127 veces) (tabla 2). Por el contrario, las concentraciones plasmáticas en los conejos transgénicos para LCAT aumentaron solamente 2 veces y 11 veces, respectivamente. La actividad de LCAT en los ratones transgénicos en la dieta con colesterol siguió siendo más de 3 veces la del control y condujo a un aumento de las concentraciones de HDL-colesterol hasta más de 5 veces las de los conejos control. La razón de colesterol total /HDL-colesterol, un indicador sensible de la aterosclerosis humana que puede detectarse clínicamente (W. Castelli y A. Leaf (1985) *Cardiology Clinics* 3: 171), aumentó en el grupo control en más de 12 veces. Por el contrario, la razón de total/HDL en el ratón transgénico para LCAT se elevó en menos de 2 veces (tabla 2) y siguió siendo inferior a la razón de 5 que proporciona un riesgo promedio para la aterosclerosis en el hombre. W.P. Castelli *et al.* (1986) *JAMA* 256: 2835.

Estas diferencias en las concentraciones plasmáticas de lipoproteínas entre los conejos control y transgénicos para LCAT reflejaron diferencias en el desarrollo de la aterosclerosis. Tras 17 semanas en la dieta con colesterol al 0,3%, se recogieron las aortas de estos animales y se utilizaron dos métodos para cuantificar la gravedad de la aterosclerosis inducida por la dieta en estos conejos. La tinción de Sudan IV de gotas de lípidos permite la cuantificación del porcentaje de área superficial que desarrolla lesiones. J.F. Cornhill *et al.* (1985) *Arteriosclerosis* 5:415. El mapa de probabilidad para el desarrollo de lesión aórtica en los conejos transgénicos (figura 1) muestra sólo focos dispersos de material con tinción de Sudan IV, mientras que las aortas de control presentaban una tinción sustancial en la mayoría de los animales. La aorta del grupo control presentaba un $35 \pm 7\%$ de la superficie cubierta por placa. Mientras, en marcado contraste, sólo el $5 \pm 1\%$ de la superficie aórtica estaba cubierta por placa en los conejos transgénicos para LCAT ($p < 0,009$, figuras 1 y 3, a la derecha).

Estas diferencias sustanciales en la aterosclerosis en las aortas entre estos dos grupos también resultaron evidentes microscópicamente (figura 2). La íntima de los conejos control demostró la formación de células espumosas, proliferación celular y un aumento en la razón de la íntima/media hasta $0,40 \pm 0,11$ (figura 3, a la izquierda). No hubo prácticamente formación de células espumosas ni proliferación celular en los conejos transgénicos que expresan LCAT humana (figura 2). La razón de íntima/media de $0,03 \pm 0,01$ fue significativamente inferior a la del control ($p < 0,009$; figura 3, a la izquierda). Estos datos establecen que el aumento en la actividad de LCAT condujo a una reducción del 85-90% en la aterosclerosis.

El efecto de la sobreexpresión de LCAT humana sobre la aterogénesis se correlacionó de manera significativa con los cambios en las lipoproteínas plasmáticas. El metabolismo de las partículas de lipoproteína de apolipoproteína B (apoB) aterogénica se interrelaciona con el de las lipoproteínas de alta densidad asociadas distintas a apoB. Los pacientes con concentraciones muy elevadas de o bien partículas de apoB ricas en triglicéridos (E.A. Brinton *et al.* (1991) *J. Clin. Invest.* 87:536) o bien partículas de LDL enriquecidas con colesterol (J.R. Schaefer *et al.* (1992) *Arteriosclerosis and Thrombosis* 12:843) presentan una eliminación aumentada de las partículas de HDL. La interrelación del metabolismo de estas partículas está mediado, por lo menos parcialmente, por la esterificación mediante LCAT del colesterol presente en HDL y la transferencia posterior del éster de colesterol, mediante la proteína de transferencia de éster de colesterol (CETP), desde HDL hasta las partículas que contienen apoB. A.R. Tall (1993) *J. Lipid Res.* 34:125. Los conejos no sólo expresan más CETP que los roedores y seres humanos, sino que también aumentan la expresión de esta proteína con la alimentación con colesterol. E.M. Quinet *et al.* (1990) *J. Clin. Invest.* 85:357. Por tanto, la sobreexpresión de LCAT en estos conejos fue en el contexto de abundante actividad de CETP que afectó a las concentraciones de colesterol tanto de partículas de HDL como distintas a HDL.

Para explorar además las relaciones entre las variables relevantes a las lipoproteínas y la aterogénesis, se realizaron una serie de correlaciones de Pearson bivariantes. Los dos criterios de valoración de la aterosclerosis utilizados en este estudio fueron altamente correlacionados tanto para los conejos control así como para el grupo completo del estudio (figura 4, paneles A y E). La gravedad de la aterosclerosis tanto en el grupo control ($r = -0,64$, $p < 0,006$; figura 2, panel B) como en el grupo completo del estudio ($r = -0,55$, $p = 0,019$; figura 4, panel F) estaba inversamente relacionada con la actividad de LCAT en el nivel inicial. Estas correlaciones inversas con la actividad de LCAT estaban complementadas por las correlaciones directas significativas tanto del colesterol no HDL (figura 4, paneles C y G) como la razón de colesterol total/HDL-colesterol (figura 4, paneles D y H). Estas relaciones de dosis-respuesta fortalecen la asociación entre la aterogénesis y el nivel de expresión de LCAT en los conejos control así como en los transgénicos para LCAT.

Existen varias causas para las concentraciones elevadas de HDL-colesterol (hiperalfalipoproteinemia) y las concentraciones disminuidas de HDL-colesterol (hipoalfalipoproteinemia). La etiología subyacente que conduce a estos fenotipos diferentes puede presentar diferentes efectos sobre la aterogénesis. Aunque las concentraciones de HDL-colesterol están determinadas principalmente por el aclaramiento de HDL de la circulación (E.A. Brinton *et al.* (1994) *Arterioscler. Thromb.* 14:707; D.J. Radar *et al.*, en *High Density Lipoproteins: Physiopathology and Clinical Relevance*, A.L. Catapano, F. Bemini y A. Corsini, Eds. (Raven Press, Ltd., Nueva York, 1993), pág. 43), la sobreproducción de apoA-I puede conducir a hiperalfalipoproteinemia (D.J. Radar *et al.* (1993) *Metabolism* 42:1429) y proteger frente al desarrollo de la aterosclerosis (E.M. Rubin *et al.* (1991) *Nature* 353: 265). Además, las HDL representan un conjunto de partículas heterogéneas. En el hombre, se ha propuesto que las HDL que contienen apoA-I (LpA-I) son más eficaces en el transporte inverso de colesterol que las partículas que contienen tanto apoA-I como apoA-II. R. Barbas *et al.* (1988) *Adv. Exp. Med. Biol.* 243:271; J.C. Fruchart y G. Ailhaud (1992) *Clinical Chemistry* 38:793; H.B. Brewer, Jr. *et al.*, en *Disorders of HDL*, L. A. Carlson, Ed. (Smith-Gordon, 1990), pág. 51. ApoA-I es un potente cofactor que potencia la actividad de LCAT, y la modulación del tamaño de LpA-I es sensible a la presencia de partículas que contienen apoB y actividad de LCAT. M.C. Cheung y A.C. Wolf (1989) *J. Lipid Res.* 30: 499. Los conejos no expresan apoA-II (A.L. Borresen (1976) *J. Immunogenet.* 3: 73; A.L. Borresen (1976) *J. Immunogenet.* 3: 83; A.L. Borresen (1976) *J. Immunogenet.* 3: 91), y estos ratones transgénicos sólo presentan partículas de LpA-I. La sobreexpresión de LCAT en estos animales puede haber conducido a la generación de subespecies de HDL antiaterogénicas.

Ratones transgénicos que expresan LCAT humana

El ratón, a diferencia del conejo, no es un sistema de modelo ideal para la aterosclerosis humana. Un motivo para esto es que el metabolismo de las lipoproteínas en el ratón es significativamente diferente del de los conejos, seres humanos y otros primates no humanos. Una diferencia metabólica clave entre conejos y ratones es la presencia de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol ("CETP") en conejos pero no en ratones. La CETP media la transferencia de ésteres de colesterol desde HDL hasta lipoproteínas que contienen apo-B en conejos, pero no en ratones. La CETP media la transferencia de ésteres de colesterol desde HDL hasta proteínas que contienen apo-B, lo que facilita el suministro de colesterol al hígado.

Se sometió a prueba el efecto de la expresión de LCAT humana en ratones alimentados con una dieta rica en colesterol. Se efectuó la expresión de LCAT produciendo ratones transgénicos. Los ratones transgénicos se produjeron mediante la microinyección de un fragmento genómico de 6,2 kb del gen de la LCAT humano completo en óvulos fertilizados. Véase Vaisman *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 12269.

Los ratones transgénicos alimentados con una dieta rica en colesterol mostraron un aumento de las concentraciones plasmáticas de colesterol total, éster de colesterol y lipoproteína distinta a HDL que contiene apo-B con, como lo hicieron los animales control. Sin embargo, comparado con los controles, el aumento de los niveles plasmáticos de colesterol total y éster de colesterol en los ratones transgénicos para LCAT reflejó principalmente concentraciones plasmáticas de HDL superiores, puesto que las lipoproteínas distintas a HDL proaterogénicas no difirieron significativamente entre los dos grupos.

A pesar del flujo de salida relativamente normal de colesterol de la membrana celular, así como la persistencia de concentraciones plasmáticas de HDL superiores en respuesta a la dieta aterogénica, los ratones que sobreexpresaron LCAT humana presentaban un aumento de la aterosclerosis con aumentos en el tamaño medio de la lesión aórtica comparado con los controles, y a diferencia de los conejos transgénicos, un sistema de modelo para la aterosclerosis humana.

El aumento de los niveles de HDL en seres humanos se asocia con una disminución del riesgo de enfermedad cardiovascular. Estos resultados muestran que el mecanismo mediante el cual aumenta la HDL determina las propiedades antiaterogénicas de la lipoproteína. Por tanto, es probable que sea más eficaz aumentar la actividad de la LCAT en mamíferos que presentan un metabolismo de las lipoproteínas similar a los seres humanos (por ejemplo, conejos y primates no humanos) y en seres humanos cuyo metabolismo de las lipoproteínas (aparte de la deficiencia de LCAT) es relativamente normal (por ejemplo, que no presentan deficiencia de CETP).

TABLA 1

Medios de cultivo M2 y M16 para embriones antes de la implantación (de Landel, *supra*).

I. Fórmula para 100 ml de cada una de las disoluciones madre concentradas. Preparar todas las disoluciones utilizando material de plástico desechable y estéril y agua bidestilada o MilliQ. Almacenar a -20°C.

Disolución madre A	5,534 g de NaCl
	0,356 g de KCl
	0,162 g de KH ₂ PO ₄
	0,293 g de MgSO ₄ ·7H ₂ O
	2,610 g de lactato de sodio
	1,0 g de glucosa
	0,060 g de penicilina
	0,050 g de estreptomina
Disolución madre B	2,101 g de rojo de fenol
	0,010 g de NaHCO ₃
Disolución madre C	0,360 g de piruvato de sodio
Disolución madre D	2,252 g de CaCl ₂ ·2H ₂ O
Disolución madre E	5,958 g de HEPES
	0,010 g de rojo de fenol

II. Preparación de 1X, M2 y M16 a partir de las disoluciones madre concentradas. De nuevo, utilizar material de plástico estéril y agua muy pura. Mezclar los componentes suavemente (no agitar cuando se disuelve el BSA, ya que producirá espuma), filtrar a través de un filtro de 0,45 µm y almacenar a 4°C durante hasta 1 semana.

Disolución madre	M2	M16
A	1,0 ml	1,0 ml
B	0,16 ml	1,0 ml
C	0,10 ml	0,10 ml
D	0,10 ml	0,10 ml
E	0,84 ml	---
H ₂ O	7,8 ml	7,8 ml
BSA	40 mg	40 mg

ES 2 283 007 T3

TABLA 2

Actividades de LCAT y control y lipoproteínas plasmáticas antes y después de la alimentación con colesterol

	ACTIVIDAD DE LCAT	Colesterol total	Triglicéridos totales	Lipoproteína de alta densidad	Lipoproteína no de alta densidad	Colesterol total/lipoproteína de alta densidad
	(nmol/ml/h)			(mg/dl)		
Control (n=9)						
Nivel inicial	101 ± 11	29 ± 3	39 ± 4	24 ± 1	4 ± 3	1,17 ± 0,12
alimentado con colesterol	98 ± 4	548 ± 57*	107 ± 15*	39 ± 3*	509 ± 57*	14,98 ± 2,13*
Transgénico para LCAT (n=10)						
Nivel inicial	1593 ± 101**	179 ± 7**	43 ± 4	161 ± 5**	18 ± 4	1,11 ± 0,02
alimentado con colesterol	308 ± 35*	396 ± 33*	81 ± 8*	200 ± 21*	196 ± 14*	2,03 ± 0,07*

Se extrajeron 5-7 ml de sangre a los conejos tras ayuno de 12 horas (nivel inicial) y tras alimentarlos con una dieta de comida para animales con colesterol al 0,3% (alimentados con colesterol). Se determinó la actividad de α -LCAT usando 10 μ l de plasma en un ensayo de proteoliposoma {{46885}}. Se analizó el plasma con EDTA para determinar las concentraciones de colesterol total y triglicéridos (Sigma, St. Louis, MO) en un autoanalizador Hitachi 911 (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN). Se determinó la concentración de HDL-colesterol en plasma que se había diluido con solución salina tamponada con fosfato 1:1 (v/v) y precipitado a continuación con sulfato de dextrano {{15590}}. Se determinó la concentración de colesterol plasmático total y la de colesterol no HDL restando la concentración de HDL-colesterol de la concentración de colesterol total.

* Difiere del nivel inicial, $p < 0,05$; ** Difiere de los valores de control, $p < 0,05$

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT) en la preparación de un medicamento para disminuir la acumulación de colesterol en un sujeto que no presenta una deficiencia de LCAT.
2. Utilización de LCAT para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la aterosclerosis en un sujeto que no presenta una deficiencia de LCAT.
- 10 3. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, en la que el medicamento que contiene LCAT va a administrarse a un sujeto mamífero para aumentar la actividad de la lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT) en el suero del sujeto hasta un nivel eficaz para disminuir la acumulación de colesterol en el sujeto, en el que la acumulación de colesterol es un indicador de aterosclerosis.
- 15 4. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el medicamento va a administrarse a un ser humano, por ejemplo en la que el sujeto está en riesgo de desarrollar aterosclerosis o en la que el sujeto padece aterosclerosis.
- 20 5. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la LCAT es una LCAT humana, preferentemente LCAT recombinante.
6. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el medicamento va a administrarse a un sujeto que presenta una razón de colesterol sérico con respecto a lipoproteínas de alta densidad superior a 5:1.
- 25 7. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el medicamento va a administrarse a un sujeto de manera que la tasa de esterificación de colesterol endógeno aumente en el sujeto hasta por lo menos 200 nmol/ml/h, preferentemente hasta por lo menos 300 nmol/ml/h, más preferentemente hasta por lo menos 500 nmol/ml/h, más preferentemente hasta por lo menos 1.000 nmol/ml/h, incluso más preferentemente hasta por lo menos 2.000 nmol/ml/h.
- 30 8. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el medicamento va a administrarse por vía parenteral, mediante inyección, por vía transmucosa o por vía transdérmica.
- 35 9. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el medicamento que contiene LCAT comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable y está en una forma de dosificación unitaria, preferentemente la dosificación unitaria contiene de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1.000 mg, más preferentemente de aproximadamente 40 mg a aproximadamente 200 mg de enzima LCAT.
- 40 10. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el medicamento que comprende LCAT está adaptado para la administración a través de células transfectadas que presentan un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para la expresión de LCAT, por lo que las células transfectadas expresan LCAT y secretan suficiente LCAT en el suero de un individuo al que se administran para aumentar la LCAT hasta un nivel eficaz para disminuir la acumulación de colesterol.
- 45 11. Utilización según la reivindicación 10, en la que el ácido nucleico comprende secuencias de control de la expresión unidas operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica para la expresión de LCAT, preferentemente las células se transfectan con el ácido nucleico por medio de vectores virales, vectores de plásmido, vectores de cósmido, vectores de microencapsulación, microinyección, electroporación, transferencia cromosómica, precipitación con calcio o inyección biolística.
- 50 12. Utilización según la reivindicación 11, en la que las células se transfectan *in vivo*, opcionalmente en la que las células se transfectan con un vector viral que comprende el ácido nucleico, en la que el vector viral es un vector retroviral, un vector de adenovirus, un vector de virus adenoasociado, un vector del virus de la hepatitis, un vector del virus vaccinia o un vector del virus del herpes, preferentemente el vector viral es un vector de adenovirus que comprende un promotor de CMV, una unión de corte y empalme de exón-intrón de SV40, una secuencia que codifica para la expresión de LCAT y una señal de poliadenilación de SV40.
- 55 13. Utilización según la reivindicación 11, en la que las células se transfectan *ex vivo* y se administran así las células transfectadas para expresar y secretar LCAT al sujeto en una cantidad suficiente para aumentar la actividad de LCAT hasta un nivel eficaz para disminuir la acumulación de colesterol, opcionalmente las células son células hematopoyéticas.
- 60 14. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que el medicamento va a administrarse a un sujeto para aumentar el nivel de lipoproteína Apo A-I en el suero de un sujeto hasta una cantidad eficaz para disminuir la acumulación de colesterol, preferentemente aumentando la cantidad de lipoproteína Apo A-I en el suero hasta por lo menos 150 mg/dl, más preferentemente hasta por lo menos 300 mg/dl.
- 65

ES 2 283 007 T3

15. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que el medicamento va a administrarse a un sujeto para aumentar el nivel de lipoproteína Apo A-I milano en el suero de un sujeto al que se administra el medicamento en una cantidad eficaz para disminuir la acumulación de colesterol, preferentemente aumentando la cantidad de lipoproteína APO A-I milano en el suero hasta por lo menos 150 mg/dl.

5

10

15

20

25

30

35

40

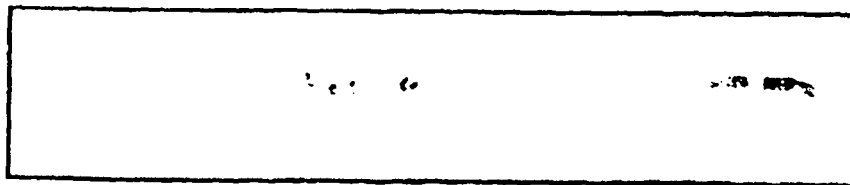
45

50

55

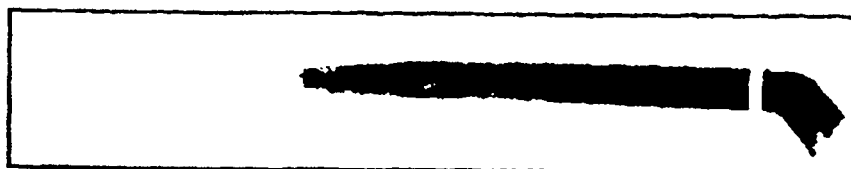
60

65



Transgénicos con LCAT (n = 9)
 $5\% \pm 1\%*$

FIG. 1A.



Controles (n = 10)
 $35\% \pm 7\%$

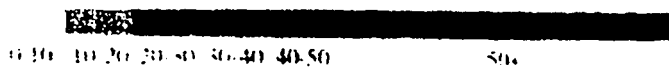


FIG. 1B.

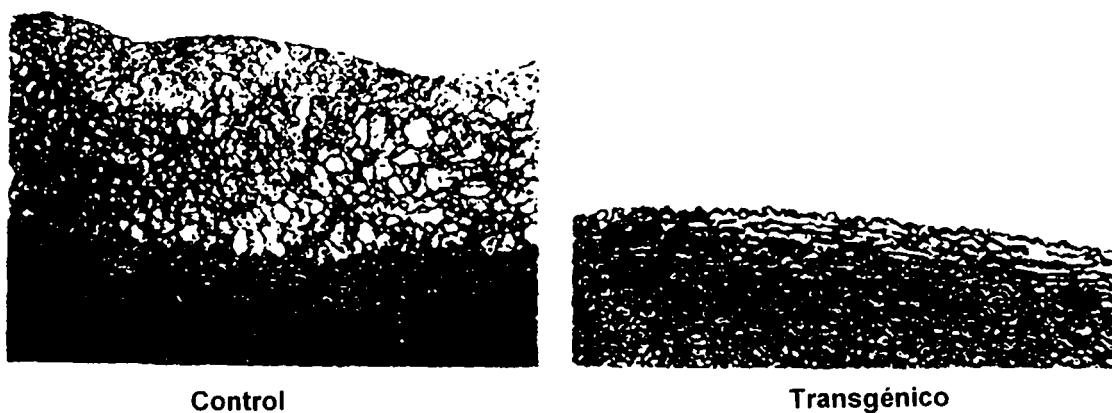


FIG. 2.

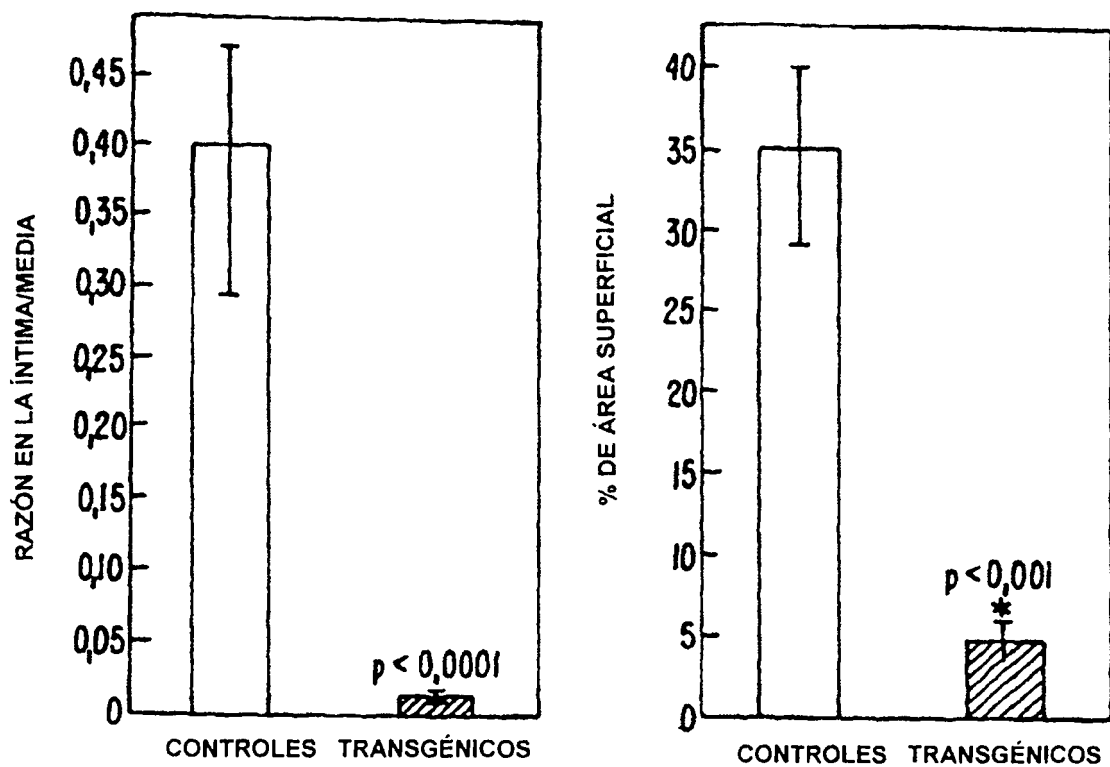


FIG. 3.

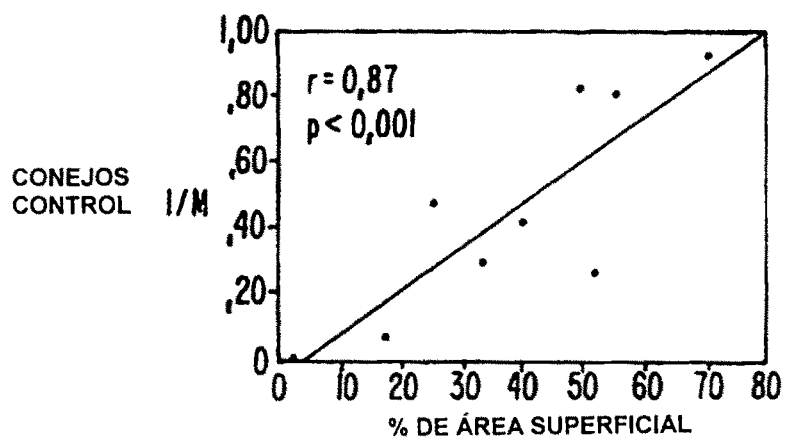


FIG. 4A.

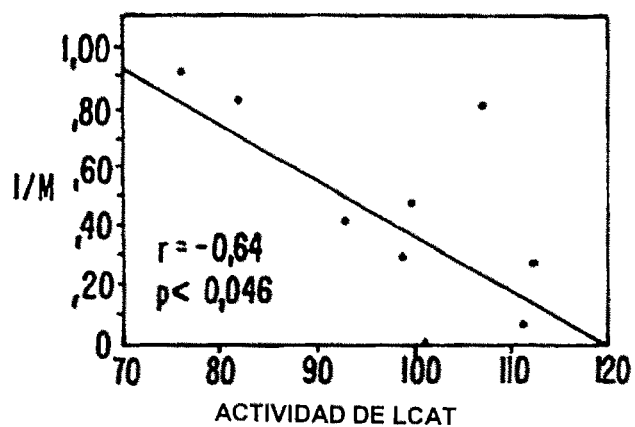


FIG. 4B.

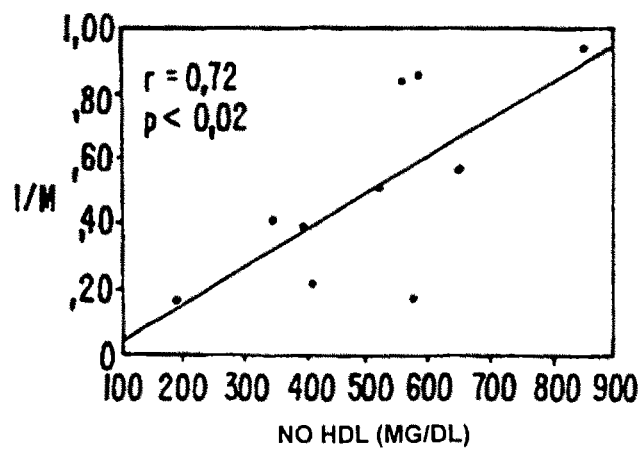


FIG. 4C.

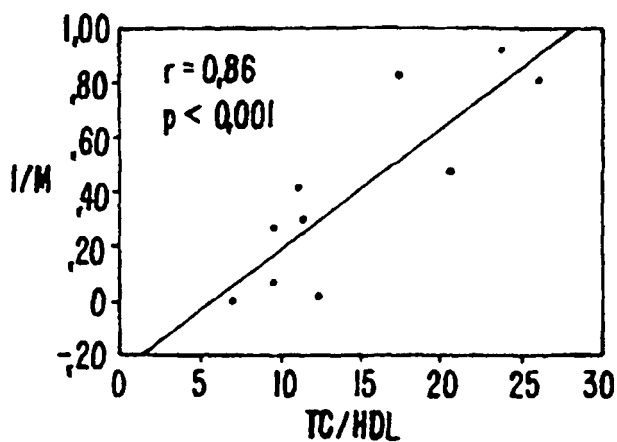


FIG. 4D.

CONEJOS
CONTROL Y
TRANSGÉNICOS
CON LCAT

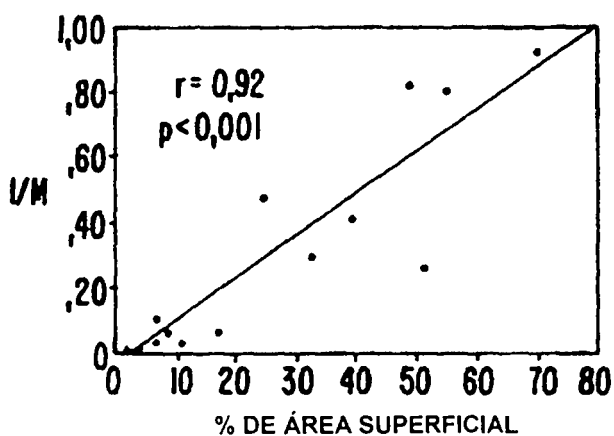


FIG. 4E.

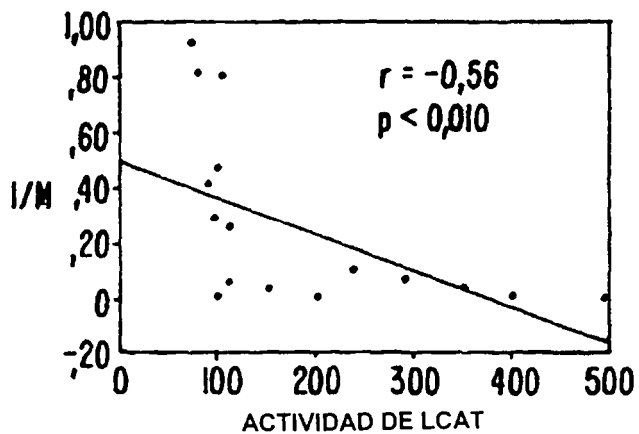


FIG. 4F.

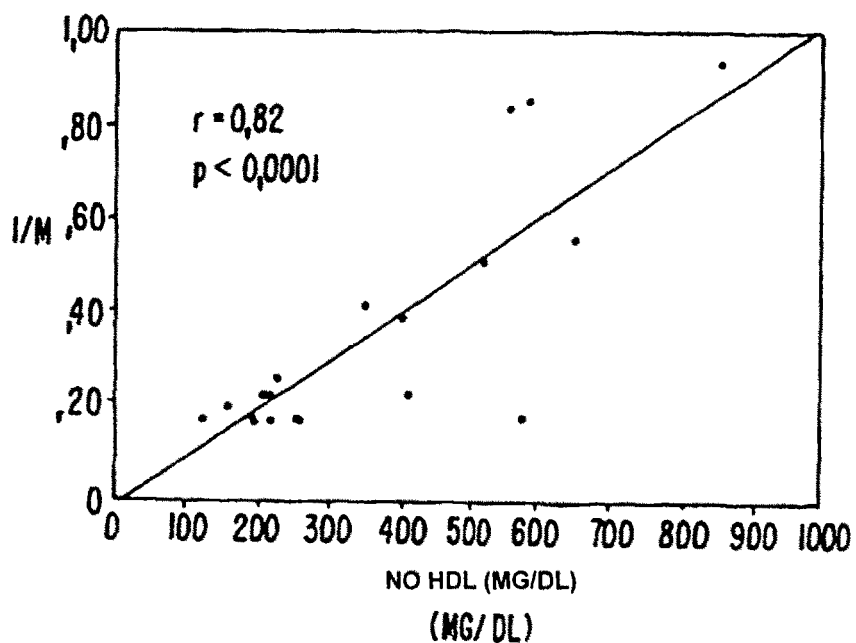


FIG. 4G.

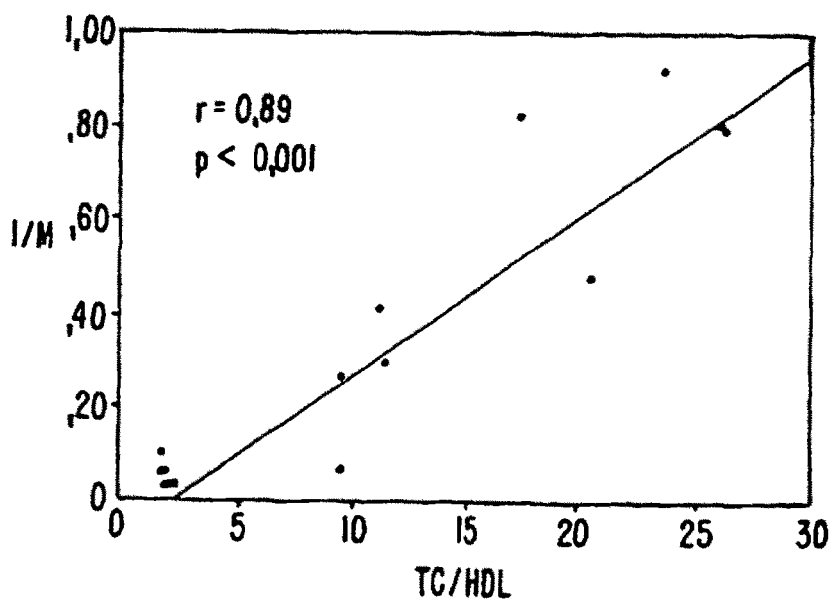


FIG. 4H.

1 CTGCAGACATGGAGTTCCTCGAGGTGCTGACCCGAGGGCCCTTGAGCGGGTGTGGTGGCGGGTGGTGGCCGTGAAGTCATCA
 85 CCATCTACTCCTGAGCCAGTGTATCTTGTGGCCTGGAGTCGAGGTCTTGGCCAGGACATAACAAGCTGTGGTCTGGGGTAAC
 169 AGCCTCTTCCCAGCACCCACCTGCCAGCCCTGCTTGGCCCTGGACCCAGCTTTGCTAGGTCTCCTTGGAAACCAG
 253 GCCTGGCCCTCAAAAATGGAGATGGATCCCAGGTCTTGTGGACCCCTGGGATGTTTGGGACTTTACTATCTAGCACCCCCAGTAG
 337 GCCTGTCTGGCCAGAGACTGGTAGGGGCCGAGTGGGTTTGAAGGCAGCCGGCCCGCCAGCCAGGAGCGCTATTTAT
 421 TGCATATTTATTGTTGGATGTCACCATCAGACAGGAAGGAGGTAGCCAGGGAGGAGTCCAGCCAGCTGCCCTGCAGGAA
 505 GATCTGGCTCAGTCTACTATGGCCAGGGCCCCCCCCAAGCTGAGCCGAAATGGAGACAGCTGAGCTGAGGCCCTGACTTTTCAA
 589 TAAACATTTGTAGTTCTGGCCCTCCTGCTGCCCCGGCTCTGTTTCCCTCGGCCAAGAGAAGGAGGAACTGAACCCAG
 673 GCCCAGAGCCGGCTCCCTGAGGCTGTGCCCTTTCCGGCAATCTCTGGCCACAACCCCTGAGCCGCGCTCCCTCCCACTG
 -24
 757 GCCCTAGGGCCCCCTCCCACTCCACACCAAGATAAGGACAGCCAGTGCCGCTTCTCTGGCAGTAGGCACCCAGGGCTGGAAATGG MetG
 -23 lyProProGlySerProTrpGlnTrpValThrLeuLeuLeuGlyLeuLeuProProAlaAlaProPheTrpLeuLeuAsnVal
 841 GGCCGCCGGCTCCCCATGGCAGTGGGTACGCTGCTGGGGTGTCTGCCCTCCTGCCGCCCTTCTGGCTCCTCAATG
 7 LeuPheProProHisThrProLysAlaGluLeuSerAsnHisThrArgProValIleLeuV
 925 TGCTCTTCCCCCGCACACCACGCCCAAGGCTGAGCTCAGTAACACACACAGGCCCTCATCTCGGTAAGCCCCCACCAGGCC
 1009 CCTGATGCACCACGCCAGACCCTGGGGAGCCTGGGCCCCAGCCCTGGCAGCTGACCTGGCCAAAGCCCTTCTGCCCTGCATAA

FIG. 5A.

1093 GCCCCGACATAAGTACCTGCCCTGGTGTGGGGAGGGCCAAAAGCTTGTCCTTAGAGGAATGACGTCCCTTCTCCACCACAC
 1177 TGTGACTCTCAGTTGTCTAACCCAGGGGGCGGAGTGGGGACGGGTGTGCCTGAGGTCTTGGCTGGGGCATCACAAAGCTGTG
 1261 GTCAGTCACAGCCACACAGACTCTGGGGCCAAAGCCCCACCACCTCCTTGGCCCCCACCACCAAGGACAAGATGCCCCAGCCC
 1345 AGGATCGGTGAGCAGGAGGGCCCATCCATGCCCGGCCCTATTAGGCCCCAGCCCCCATGCCCCAGACCTATCTGTTCCCACC
 1429 TTGGACTTTGGCAATAAAGGAGCGCCAGACTGGGTGTTTGGCTCTGCAGAGGCGGGTTCAGCGGCCCTTGGCCCTCAGCACCTCAG
 1513 CGCCTTCCCTTCCCTCAGGGAAGCCTGGGCTTTGGCTACTGGGGGACAGAGGGGTGTAAAGCAGGGGAGGGTAAGTG
 1597 TGCTTTGTACCTGGGGTTGAGGGTATGGGAGGTGGGGGTGGGTCTGGTCACTGCAGCATCTGGGGTGACGGGGGTAAAGGGTC
 1681 ACGGGGGAATCCAGAGTCCAGAGTGAGGGCTGCTCACAGTGCCCGGCTGCCTGGGGAATCAGCTAGAAGCCAAAGCTGGAC
 42 LysProAspValValAsnTrpMetCysTyrArgLysThrGluAspPhePheThrIleTrpLeuAspLeuAsnMetPheLeuPro
 1765 AAACCCAGATGTGGTGAACCTGGATGTGCTACCCGCAAGACAGAGGACTTCTTCACCATCTGGCTGGATCTCAACATGTTCCCTACCC
 70 LeuGlyValAspCysTrpIleAspAsnThrAr
 1849 CTTGGGGTAGACTGCTGGATCGATAACACCCAGGTACAGCCATGTGCTCCACCCCTAGCCCCAACACAGCTGCCCTTGGCTACTGG
 81
 1933 CTGCTGAGTGGCACCCCGCCCGCAGGGTTGTCTACAACCGGAGCTCTGGGCTCGTGTCCAACGCCCTGGTGTCCAGATCCCG
 100 ValProGlyPheGlyLysThrTyrSerValGluTyrLeuAspSerSerLysLeuAlaG
 2017 CGTCCCCTGGCTTTGGCAAGACCCTACTCTGTGGAGTACCTGGACAGCAGCAAGCTGGCAGGTTTGTGTACAGAGGGCAGGGCTGGG

FIG. 5B.

3109 AAACATCAACACAGACACCAATCTTGTTCCCCCTTCTGGAGCACAACTCTGTGGCCCCCAATTGCTGCATAAGCCACACAAGGAG
 3193 CAGAAAGACATGCCCGAGGGAGGACAGCCAGCACCGCCCCACCATCCCCACACATCCTGGGCTCACCACCATCCCCACA
 3277 CACCCTGGTCTCAGGAAGCCCCGCTACTTTTTTTTTTTTTCAGACAGGGTCAATCTGTGCGCCAGGCTGGAGTGCAGTG
 3361 GCGTGATCATAGCCGGCAGTCTCAATCTCCCTGGCCCAAGCAATCCTCCTGCCTCAGCCTCCGGTTAGCTGAGACTATAGGCAC
 3445 ACAACACCACACCTAATTPATTTTTGTTTTTATAGAGATGAGGTCCTGCTATGTTGCCCCAGGCTGGTCTCAAACTCTTCACC
 3529 TTAAGTATCTCCCTGCCCTCAGCCTCCCGAAGTGTGGGATACAGGGCTGAGCTACTGTGCTGGCCCTTTTAAAAAATCTTTA
 3613 TTGTTTATTTATGATTTGAGATGGAGTCTGGCTCGTTTTCCCAAGGCTGGAGTGCAGTAGTGCAATCTCCACTCACTGCAAC
 3697 CTCCATCTCCCCAGTTCABAGTGATTTCTTGCCCTCAGCCTCCCTAGTAGCTAGGATCACAGGCATGTGCCACCACGCCCTGGCTA
 3781 ATTTTATATTTTATAGAGATVAGGTTTTCCCCANGTGGCCAGGCTGGTCTCGAACTCCTGACCTTAACTCATCTGCCCTGCC
 3865 TCGGCCCTCCCAAGTGCTTAGGATTAACAGGTGTGAGCCACCCTGACCCCGCCCTATTTATTTTAAAGCTGGAACTCTCACTG
 3949 TGTCACCCAGGCTACAGTGCAGTGGTGGGATCATAGTTACTGTAACTCAAAATCCTAGGCTCAAGCAATCTTCCCTGCCCTTIG
 4033 CCTCCTGAGTAGCTAGGACTAGAGGTGCCACTCCACTAAGCCAGCTGATTTTTTTTTTTTTTTTGTAGAGACAGGGTCTC
 4117 ACTGCATGGCCTAGTCTGGTCAAGGACTCCCTGGCCCTCAAGTGAATCCTCCCTCAGCCCAAGTGTGGGATTACAGGGG
 4201 TGAGCCATGGTGCCTGTCCCTGCCATCCTTTTGAAGCCCTACAGCTCCACCACAAGAGTCTTATCAGGGCTTCTCATTTGAGT
 4285 AAGCTGACACTGAGCATCATTGAATATCAGGCCCTGCTCAAGCCTGTGGCTTAGAGTCTGTGTCTAGATTGGGCAGGGACAAGAT

SECUENCIA Alu

SECUENCIA

SECUENCIA Alu

FIG. 5D.

exón 6

4369 TGAGCATCTGGCTGAGCCTACACTCAGCAGGTTGTGGCCAGGGTAGCCAGGCCCTGGCTCCCTGCTCCACCTTGCTCCCATATC

227 1yAspAsnGlnGlyIleProIleMetSerSerIleLysLeuLysGluGluGlnArgIleThrThrSerProTrpMet

4453 CACAGGTGACAACCAAGGCATCCCCATCATGTCCAGCATCAAGCTGAAGAGGAGCAGGCATATAACCAACACCTCCCCCTGGAT

253 PheProSerArgMetAlaTrpProGluAspHisValPheIleSerThrProSerPheAsnTyrThrFlyArgAspPheGlnArg

4537 GTTCCCTCTCGCATGGCGTGGCCTGAGGACCCAGTGTTCATTTCCACACCCAGCTTCRACTACACAGGCCGTGACTTCCAACG

281 PhePheAlaAspLeuHisPheGluGluGlyTrpTyrMetTrpLeuGlnSerArgAspLeuAlaGlyLeyProAlaProGly

4621 CTTCTTTGCAGACCTGCACCTTGAGGAAGGCTGGTACATGTGGCTGCAGTCACGTGACCTCCTGGCAGGACTCCACGACCTGG

309 ValGluValTyrCysLeuTyrGlyValGlyLeuProThrProArgThrTyrIleTyrAspHisGlyPheProTyrThrAspPro

4705 TGTGGAAGTATACTGTCTTTACGGCGTGGCCTGCCACGCCCGCACCTACATCTACGACCCAGGCTTCCCCTACACGGACCC

337 ValGlyValLeuTyrGluAspGlyAspThrValAlaThrArgSerThrGluLeuCysGlyLeuTrpGlnGlyArgGlnPro

4789 TGTGGGTGTGCTCTATGAGGATGGTGATGACACGGTGGCGACCCCGCAGCACCGAGCTCTGTGGCCTGTGGCAGGGCCCGCAGCC

365 GlnProValHisLeuLeuProLeuHisGlyIleGlnHisLeuAsnMetValPheSerAsnLeuThrLeuGluHisIleAsnAla

4873 ACAGCCTGTGCACCTGCTGCCCTGCACGGGATACAGCATCTCAACATGGTCTTCAGCAACCTTGACCTGGAGCACATCAATGC

393 IleLeuLeuGlyAlaTyrArgGlnGlyProProAlaSerProThrAlaSerProGluProProProGluEnd

4957 CATCCTGCTGGGTGCCTACCGCCAGGGTCCCCCTGCATCCCCGACTGCCAGCCAGAGCCCCCGCCTCCTGAAATAAAGACCTTC

5041 CTTTGCTACCGTAAGCCCTGATGGCTATGTTTCAGGTTGAAGGGAGGACTAGAGTCCCACACTAGGTTTCACTCCTCACCAGC

5125 CACAGGCTCAGTGCTGTGTCAGTGAGGCAAGATGGGCTCTGCTGAGGCCCTGGGACTGAGCTGGCACCCCTAGATGTACAGCTG

5201 CCCACTCTCCTGGTGGAGCTGTTGAGGCAAGTGTGCCACCGTGCCTCTGTGCTGGGGGGGACTGGAGCTGGCTCCACCC

FIG. 5E.

6553 AACCTGGGAGGTGGACGTTGCGGTGAGCCAAAGATCACACTATTGCACTCCAGCCTGGGCAACAAGAGCAAACAACCTCCGTCTCAAA
SECUENCIA Aliu
6637 AAAAAAAAATTTATTTTAAATTAGCCAGGTGTAGCCACAGCTGTAGTCAAATCTACTAGGCAGGCTGAGGTGGGAGGATTGCTT
6721 GAACCTGGGAGGCAGAGGTTGCAGTGA GCCAAGATGGT GCCACGGCATCCAGCCTGAGCAACAGCAAGACCCTGTGTCCAAAA
6805 AAAAAAAAAAAAAACCGTAAATAAGCCAGGCACAGTGGTTCAATGGTATATAAGCCTAGCCACTTTGGAAAGGCTGAGGAGGGTG
6889 GATCGCCTGAGCTC

FIG. 5G.