

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 329**

51 Int. Cl.:
C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07874411 .7**
96 Fecha de presentación: **13.12.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2121746**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.11.2009**

54 Título: **Mediadores selectivos y potentes del flujo de salida de colesterol**

30 Prioridad:
13.12.2006 US 874909 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.03.2012

73 Titular/es:
**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA
1111 FRANKLIN STREET, 12TH FLOOR
OAKLAND, CA 94607-5200, US**

72 Inventor/es:
**BIELICKI, John K. y
JOHANSSON, Jan**

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

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).

ES 2 377 329 T3

DESCRIPCIÓN

Mediadores selectivos y potentes del flujo de salida de colesterol

- 5 Esta invención se realizó con financiación del gobierno bajo el N° de Contrato DE-AC02-05CH11231 concedido por el Departamento de Energía de los Estados Unidos y la Subvención (Contrato) N° R03-AG023153 concedida por el Instituto Nacional del Envejecimiento. El Gobierno tiene ciertos derechos en esta invención.

- 10 La investigación que condujo a esta invención también estaba financiada por un acuerdo de investigación patrocinado con Artery Therapeutics, Inc. (LBNL Work for Other Agreement No. LB05-001119) y por la Subvención N° 13IT-0025 concedida por el Programa de Investigación de Enfermedades Relacionadas con el Tabaco del Estado de California.

Antecedentes de la invención

- 15 La enfermedad cardiovascular (CVD) es una causa principal de morbilidad y mortalidad en los Estados Unidos y en todo el mundo. La acumulación de colesterol en macrófagos en la pared arterial promueve la formación de células espumosas y aterosclerosis, constituyendo una causa principal de CVD (Schmitz, G. y Kaminski, W. E., "ATP-binding cassette (ABC) transporters in atherosclerosis", *Curr Atheroscler Rep.*, 4(3): 243-51 (2002). La acumulación de colesterol en macrófagos depende en gran medida del equilibrio entre la deposición por partículas lipoproteicas que contienen Apolipoproteína B, tales como VLDL, IDL y LDL, y la eliminación de colesterol por partículas ApoA-I y ApoE. La disminución de las concentraciones de LDL en plasma por estatinas y otras medicaciones de disminución de los niveles de colesterol previene aproximadamente un tercio de los acontecimientos de CVD, aunque continúan existiendo dos tercios de los acontecimientos (véase, por ejemplo, "Randomized trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)", *Lancet*, 344(8934): 1383-1389 (1994); y "Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS)", *Circulation*, 197 (15): 1440-5 (1998). Esto último constituye una enorme necesidad médica sin satisfacer.

- 30 Niveles elevados de colesterol HDL en plasma están asociados con un riesgo reducido de aterosclerosis (Gordon et al., "High Density Lipoprotein As A Protective Factor Against Coronary Heart Disease", *Am. J. Med.*, 62: 707-14 (1977)). Estudios epidemiológicos recientes han sido capaces de atribuir el efecto protector de las HDL a su apolipoproteína principal, Apo A-I (Walldius, G. et al., "High Apolipoprotein B, Low Apolipoprotein A-I, And Improvement In The Prediction of Fatal Myocardial Infarction (AMORIS study): A Prospective Study", *Lancet*, 358(9298): 2026-33 (2001); y Yusuf et al., "Effect of Potentially Modifiable Risk Factors Associated With Myocardial Infarction in 52 Countries (the INTERHEART study): Case-control Study", *Lancet*, 364(9438): 937-52 (2004)). Los efectos beneficiosos de las HDL están relacionados, en parte, con su actividad en la mediación de la ruta anti-aterogénica de transporte inverso de colesterol (RCT). El RCT implica el transporte de colesterol desde los macrófagos periféricos hasta el hígado para la excreción de esterol en heces (Lewis et al., "New Insights Into The Regulation of HDL Metabolism and Reverse Cholesterol Transport", *Circ. Res.*, 96: 1221-32 (2005)). La etapa limitante de la velocidad del RCT implica la estimulación del flujo de salida de colesterol de los macrófagos, mediada por apolipoproteínas nativas tales como Apo A-I y Apo E. Este proceso de flujo de salida de colesterol genera HDL nacientes y requiere el transportador del casete de unión a ATP A1 (ABCA1) o se desarrolla aterosclerosis (Calpe-Berdiel et al., "Direct Evidence *In Vivo* of Impaired. Macrophage-Specific Reverse Cholesterol Transport in ATP-Binding Cassette Transporter A1-Deficient Mice", *Biochim. Biophys. Acta.*, 1738 (1-3): 6-9 (2005). ABCA1 es la molécula defectuosa en la enfermedad de Tangiers, que se caracteriza por una deficiencia grave en HDL en plasma y una aterosclerosis prematura (Attie et al., "Pivotal Role of ABCA1 in Reverse Cholesterol Transport Influencing HDL Levels and Susceptibility to Atherosclerosis", *JLipid Res.*, 42(11): 1717-26. (2001)). Las apolipoproteínas A y E también estabilizan la proteína ABCA1 celular previniendo su degradación, lo que asegura altos niveles de exportación de colesterol celular y ensamblaje de HDL.

- La importancia clínica de las HDL ha despertado el interés en el desarrollo de estrategias para manipular el RCT para fines terapéuticos. Los estudios de prueba de concepto exploratorios han demostrado que las inyecciones con variantes de Apo A-I de longitud completa, por ejemplo, proApoA-I, Apo A-I Milano y Apo A-I 2 tipo silvestre en complejos de fosfolípidos aumentan el RCT (Eriksson et al., "Stimulation of Fecal Steroid Excretion After Infusion of Recombinant Proapolipoprotein A-I. Potential Reverse Cholesterol Transport in Humans", *Circulation*, 100(6): 594-8 (1999)) y provocan la regresión de la aterosclerosis coronaria (Nissen et al., "Effect of Recombinant ApoA-I Milano on Coronary Atherosclerosis in Patients with Acute Coronary Syndromes: A Randomized Controlled Trial," *JAMA*, 290(17): 2292-300 (2003); y Tardif et al., "Effect of rHDL on Atherosclerosis-Safety and Efficacy (ERASE) Investigators", *JAMA*, 297: 1675-82. Epub 26 marzo (2007)). Aunque la prometedor proteína ApoA-I de longitud completa tiene varios inconvenientes como agente terapéutico si se va a desarrollar en productos comerciales. Por ejemplo, la ApoA-I es una proteína larga de 243 aminoácidos que no es nada fácil de producir en las cantidades necesarias para un producto comercial. Además, las variantes de Apo A-I, tales como las variantes Milano y Paris, pueden provocar respuestas inmunológicas debido a su naturaleza extraña.

Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de composiciones y métodos adicionales que utilicen la potente ruta de

RCT para mediar el flujo de salida de colesterol para estabilizar y provocar la regresión de las placas ateroscleróticas, es decir, para tratar la enfermedad cardiovascular. Sorprendentemente, la presente invención satisface esta necesidad, así como otras necesidades al proporcionar dichas composiciones y métodos.

5 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a péptidos que tienen efectos sobre el metabolismo de lípidos. Los lípidos son un componente estructural celular importante y proporcionan material de fuente para células fundamentales incluyendo prostaglandinas, especies oxidativas reactivas y similares. A través de rutas de señalización, los lípidos también contribuyen a la orquestación de las respuestas de citocinas, por ejemplo, a estímulos inflamatorios. Dichos efectos de lípidos están implicados en varias patologías incluyendo, pero sin limitación, la aterosclerosis y manifestaciones de enfermedades neurológicas, inflamatorias e infecciosas. Los péptidos ejercen sus efectos directamente o a través de mediadores. Los mediadores incluyen, pero sin limitación, HDL, transportadores ABC y mediadores para la oxidación y la inflamación.

En un aspecto, la invención proporciona por lo tanto una familia de polipéptidos que tienen una actividad de flujo de salida de colesterol que es comparable a, y preferentemente supera en base al peso, la de las apolipoproteínas de longitud completa (por ejemplo, Apo A1 y Apo E); y que tienen una alta selectividad por ABCA1, que es comparable a la de las apolipoproteínas de longitud completa. Más particularmente, la presente invención proporciona una familia de polipéptidos de origen no natural que actúan como ligandos funcionales de alta afinidad por ABCA1 y que estimulan el flujo de salida de colesterol celular con aproximadamente la capacidad y la potencia de las apolipoproteínas nativas en una base por molécula. Los polipéptidos de la presente invención estimulan el flujo de salida de colesterol de macrófagos-células espumosas *in vivo*, promueven un aumento sostenido en la secreción de esterol fecal y reducen la gravedad de la aterosclerosis establecida en presencia de hipercolesterolemia y de una agresión dietética de alto contenido en grasa en un modelo de enfermedad de ratón deficiente en apolipoproteína E, y también previenen el desarrollo de aterosclerosis en un modelo de ratón deficiente en receptor de LDL.

Como tales, los polipéptidos de la presente invención, es decir, los polipéptidos que tienen una actividad selectiva y potente por ABCA1, pueden usarse terapéuticamente para promover la estabilización de ABCA1, así como la actividad de flujo de salida de lípidos de ABCA1, y pueden usarse en solitario o, como alternativa, en combinación con otros agentes farmacológicos conocidos para el tratamiento de una enfermedad cardiovascular para reducir la aterosclerosis. Además, los polipéptidos de la presente invención pueden usarse en solitario o, como alternativa, en combinación con otros agentes farmacológicos conocidos para el tratamiento del síndrome coronario agudo, para reducir el contenido de lípidos de placas y para estabilizar las placas vulnerables. Además, los polipéptidos de la presente invención pueden usarse en solitario o, como alternativa, en combinación con otros agentes farmacológicos conocidos para el tratamiento de la dislipidemia, la hipercolesterolemia y la inflamación, para aumentar las concentraciones de HDL en plasma y/o para promover el transporte inverso de colesterol.

Los péptidos de la invención comprenden ciertas características que en conjunto definen las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los péptidos. Estas características incluyen una estructura de hélice α y una orientación anfipática de aminoácidos a lo largo del eje de la estructura de hélice α . Los péptidos comprenden dos focos de restos ácidos separados a lo largo del eje hidrófilo. La estructura de hélice α se refuerza adicionalmente por formación de un puente salino de aminoácidos natural en la superficie de contacto de lípido-agua. Los péptidos también carecen de un efecto estereoespecífico sustancial, por ejemplo, los péptidos que comprenden L- y D-aminoácidos y formas invertidas funcionan igual de bien. Los péptidos comprenden una secuencia de núcleo de 24 restos aminoácídicos que se une selectivamente a HDL en plasma y se dirige al transportador ABCA1 en células.

La farmacodinámica se facilita por las propiedades hidrófobas, por ejemplo, el ángulo de cuña hidrófobo a lo largo del eje de la hélice α sitúa al péptido en la membrana celular en las proximidades del transportador ABCA1, permitiendo de este modo una interacción funcional. Por lo tanto, los péptidos interaccionan con membranas celulares de una forma fisiológica, en el sentido de que confieren un flujo de salida de lípidos específico de ABCA1 con efectos de membrana celular inespecíficos mínimos.

En un aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:

$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}$ (SEC ID N°: 11), en la que: X_1 , X_7 , X_8 , X_{15} , X_{18} y X_{19} son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en E y D; X_2 , X_6 , X_9 , X_{10} , X_{12} , X_{13} , X_{16} , X_{17} , X_{20} , X_{21} y X_{24} son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en A, V, L, I, F, W, M y P; X_3 , X_5 , X_{14} y X_{23} son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en R, K, A, V, L, I, F, W, M, P, G, S, T, C, Y, N y Q, en la que al menos dos de X_3 , X_5 , X_{14} y X_{23} son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en R y K; y X_4 , X_{11} y X_{22} son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en S, T, G, A e Y; en la que cuando está presente una prolina, está presente en una sola posición, y en la que cada letra representa el código de aminoácido de una letra convencional. Los polipéptidos de la SEC ID N°: 11 tienen actividad de flujo de salida

de colesterol, actividad de estabilización de ABCA1, actividad antioxidante, así como actividad antiinflamatoria.

En ciertas realizaciones del polipéptido de la SEC ID N°: 11, X₂, X₆, X₉, X₁₀, X₁₂, X₁₃, X₁₆, X₁₇, X₂₀, X₂₁ y X₂₄ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en A, V, L, F y W y, preferentemente, son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en A, L, F y W. En otras realizaciones del polipéptido de la SEC ID N°: 11, al menos tres de X₃, X₅, X₁₄ y X₂₃ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en R y K. En ciertas otras realizaciones, X₃, X₅, X₁₄ y X₂₃ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en R, K, L y F, en las que al menos dos de X₃, X₅, X₁₄ y X₂₃ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en R y K. En otras realizaciones más, X₄, X₁₁ y X₂₂ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en S, A e Y y, preferentemente, X₄, X₁₁ y X₂₂ son cada uno A.

En un aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:

X₁X₂X₃SX₅X₆X₇X₈X₉X₁₀AAX₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀LAX₂₃X₂₄ (SEC ID N°: 1)

en la que: X₁, X₇, X₈, X₁₅, X₁₈ y X₁₉ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en E y D; X₂ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F, V, L y W; X₃, X₅, X₁₄ y X₂₃ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en R y K; X₆, X₉, X₁₀, X₁₃, X₁₆, X₂₀ y X₂₄ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en L, F y W; y X₁₇ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F, A, L y W; y en la que cada letra representa el código de aminoácido de una letra convencional. Los polipéptidos de la SEC ID N°: 1 tienen actividad de flujo de salida de colesterol, actividad de estabilización de ABCA1, actividad antioxidante, así como actividad antiinflamatoria.

En otra realización, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:

X₁X₂X₃SX₅LX₇X₈WFAAFX₁₄X₁₅FX₁₇X₁₈X₁₉FLAX₂₃L (SEC ID N°: 2).

en la que: X₁, X₇, X₈, X₁₅, X₁₈ y X₁₉ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en E y D; X₂ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F y V; X₃, X₅, X₁₄ y X₂₃ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en R y K; y X₁₇ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F y A; y en la que cada letra representa el código de aminoácido de una letra convencional. Los polipéptidos de la SEC ID N°: 2 tienen actividad de flujo de salida de colesterol, actividad de estabilización de ABCA1, actividad de antioxidante, así como actividad antiinflamatoria.

En otra realización más, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:

EX₂RSKLEEMTFAAFREFX₁₇EEFLARLKS (SEC ID N°: 3),

en la que: X₂ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F y V; y X₁₇ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F y A; y en la que cada letra representa el código de aminoácido de una letra convencional. Los polipéptidos de la SEC ID N°: 3 tienen actividad de flujo de salida de colesterol, actividad de estabilización de ABCA1, actividad antioxidante, así como actividad antiinflamatoria.

En una realización, la presente invención proporciona un polipéptido aislado de SEC ID N°: 1-3 y 11, que comprende además X₂₅ y X₂₆ en el extremo carboxi terminal (es decir, extremo C-terminal), en el que X₂₅ es un aminoácido seleccionado independientemente del grupo que consiste en R, K, A, V, L, I, F, W, M, P, G, S, T, C, Y, N y Q, y X₂₆ es un aminoácido seleccionado independientemente del grupo que consiste en S, T, G, A e Y. En una realización preferida, X₂₅ es K y X₂₆ es S. En relación con esta realización preferida, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:

X₁X₂X₃SX₅X₆X₇X₈X₉X₁₀AAX₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀LAX₂₃X₂₄KS (SEC ID N°: 8)

en la que: X₁, X₇, X₈, X₁₅, X₁₈ y X₁₉ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en E y D; X₂ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F, V, L y W; X₃, X₅, X₁₄ y X₂₃ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en R y K; X₆, X₉, X₁₀, X₁₃, X₁₆, X₂₀ y X₂₄ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en L, F y W; y X₁₇ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F, A, L y W; y en la que cada letra representa el código de aminoácido de una letra convencional. Además, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:

X₁X₂X₃SX₅LX₇X₈WFAAFX₁₄X₁₅FX₁₇X₁₈X₁₉FLAX₂₃LKS (SEC ID N°: 9)

en la que: X_1 , X_7 , X_8 , X_{15} , X_{18} y X_{19} son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en E y D; X_2 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F y V; X_3 , X_5 , X_{14} y X_{23} son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en R y K; y X_{17} es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F y A; y en la que cada letra representa el código de aminoácido de una letra convencional.

- 5 Además, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:

EX₂RSKLEEWFAAFREFX₁₇EEFLARLKS (SEC ID N°: 10),

- 10 en la que: X_2 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F y V; y X_{17} es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F y A; y en la que cada letra representa el código de aminoácido de una letra convencional.

- 15 En una realización, el polipéptido aislado de la presente invención comprende (y en ciertas realizaciones consiste en o, como alternativa, consiste esencialmente en) la secuencia de aminoácidos siguiente: EVRSKLEEWFAAFREFAEFLARLKS (SEC ID N°: 4, que también se denomina en la presente memoria "ATI-5261" o "5261") o comprende (y en ciertas realizaciones consiste en o, como alternativa, consiste esencialmente en) la secuencia: EVRSKLEEWFAAFREFAEFLARL (SEC ID N°: 12). En otra realización, el polipéptido aislado comprende (y en ciertas realizaciones consiste en o, como alternativa, consiste esencialmente en) la secuencia de aminoácidos siguiente:

- 20 EVRSKLEEWFAAFREFFEFLARLKS (SEC ID N°: 5, que también se denomina en la presente memoria "S 1") o comprende (y en ciertas realizaciones consiste en o, como alternativa, consiste esencialmente en) la secuencia: EVRSKLEEWFAAFREFFEFLARL (SEC ID N°: 13). En otra realización más, el polipéptido aislado comprende (y en ciertas realizaciones consiste en o, como alternativa, consiste esencialmente en) la secuencia de aminoácidos siguiente: EFRSKLEEWFAAFREFFEFLARLKS (SEC ID N°: 6, que también se denomina en la presente memoria "S2") o comprende (y en ciertas realizaciones consiste en o, como alternativa, consiste esencialmente en) la secuencia: EFRSKLEEWFAAFREFFEFLARL (SEC ID N°: 14). En otra realización más, el polipéptido aislado comprende (y en ciertas realizaciones consiste en o, como alternativa, consiste esencialmente en) la secuencia de aminoácidos siguiente: EFRSKLEEWFAAFREFAEFLARLKS (SEC ID N°: 7, que también se denomina en la presente memoria "S3") o comprende (y en ciertas realizaciones consiste en o, como alternativa, consiste esencialmente en) la secuencia: EFRSKLEEWFAAFREFAEFLARL (SEC ID N°: 15).

- En otro aspecto, la presente invención proporciona variantes polipeptídicas de los polipéptidos de la SEC ID N°: 10. En una realización, el polipéptido tiene una identidad de al menos el 75% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4. En otra realización, el polipéptido tiene una identidad de al menos el 75% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 5. En otra realización más, el polipéptido tiene una identidad de al menos el 75% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 6. En otra realización más, el polipéptido tiene una identidad de al menos el 75% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 7. En una realización preferida, el polipéptido tiene una identidad de al menos el 75%, preferentemente una identidad del 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con un polipéptido de la SEC ID N°: 4, 5, 6, 7, 12, 13, 14 ó 15.

- En una realización, los polipéptidos de la presente invención comprenden además un grupo protector. Por ejemplo, los polipéptidos pueden modificarse de modo que los grupos R en los aminoácidos constituyentes y/o los aminoácidos terminales se bloqueen, es decir, se protejan mediante un grupo protector. Se ha descubierto que el bloqueo, particularmente del extremo amino y/o carboxi terminal, puede mejorar enormemente la administración oral y aumenta significativamente la semivida en suero. Por lo tanto, en una realización, los polipéptidos de la presente invención comprenden además un grupo protector acoplado al extremo amino o carboxi terminal. En una realización, los polipéptidos comprenden además un primer grupo protector acoplado al extremo amino terminal y un segundo grupo protector acoplado al extremo carboxilo terminal.

- 50 Los grupos protectores adecuados incluyen, pero sin limitación, acetilo (Ac), amida, grupos alquilo de 3 a 20 carbonos, Fmoc, t-butoxicarbonilo (Tboc), grupo 9-fluorenoacetilo, grupo 1-fluorenocarboxílico, grupo 9-fluorenocarboxílico, grupo 9-fluorenona-1-carboxílico, benciloxicarbonilo, xantilo (Xan), tritilo (Trt), 4-metiltritilo (Mtt), 4-metoxitritilo (Mmt), 4-metoxi-2,3,6-trimetil-bencenosulfonilo (Mtr), mesitilen-2-sulfonilo (Mts), 4,4-dimetoxibenzhidrido (Mbh), tosilo (Tos), 2,2,5,7,8-pentametil croman-6-sulfonilo (Pmc), 4-metilbencilo (MeBzl), 4-metoxibencilo (MeOBzl), benciloxi (BzlO), bencilo (Bzl), benzoílo (Bz), 3-nitro-2-piridinossulfonilo (Npys), 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)etilo (Dde), 2,6-diclorobencilo (2,6-DiCl-Bzl), 2-clorobenciloxicarbonilo (2-Cl-Z), 2-bromobenciloxicarbonilo (2-Br-Z), benciloximetilo (Bom), ciclohexiloxi (cHxO), t-butoximetilo (Bum), t-butoxi (tBuO), t-butilo (tBu) y trifluoroacetilo (TFA).

- 60 En una realización preferida, los polipéptidos comprenden un primer grupo protector acoplado al extremo amino terminal, incluyendo el primer grupo protector, pero sin limitación, acetilo, propionilo y un alquilo de 3 a 20 carbonos. En una realización preferida, el primer grupo protector es un acetilo. En otra realización preferida, los polipéptidos comprenden un segundo grupo protector acoplado al extremo carboxilo terminal, siendo el segundo protector una amida.

Los polipéptidos de la presente invención pueden comprender todo "L" aminoácidos, todo "D" aminoácidos o una mezcla de "L" y "D" aminoácidos. Se ha descubierto sorprendentemente que los polipéptidos que comprenden todo D-aminoácidos estimulan el flujo de salida de colesterol con gran capacidad y gran afinidad, como los polipéptidos de L-aminoácidos.

Un polipéptido de la presente invención tiene actividad de flujo de salida de colesterol y actividad estabilizante de ABCA1. En una realización, un polipéptido de la presente invención protege a un fosfolípido de la oxidación por un agente oxidante (es decir, el polipéptido tiene actividad antioxidante). En otra realización, un polipéptido de la presente invención tiene actividad antiinflamatoria, incluyendo la inhibición de moléculas de adhesión. En una realización preferida, un polipéptido de la presente invención comprende una o más de estas actividades. En realizaciones aún más preferidas, un polipéptido de la presente invención comprende cada una de estas actividades.

Una realización adicional de la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un polipéptido descrito en la presente memoria y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden un agente terapéutico adicional (por ejemplo, una estatina tal como atorvastatina, lovastatina, pravastatina, simvastatina, fluvastatina o rosuvastatina; un agente de unión a ácidos biliares tal como colestiramina o colestipol; un inhibidor del canal transportador de esterol de Nieman-Pick tipo C1 tipo 1 tal como Ezetimibe; un inhibidor de la agregación plaquetaria tal como aspirina, ticlopidina o clopidogrel, niacina/nicotinamida, un activador de PPAR, Vitamina E o combinaciones de los mismos, para tratar una enfermedad o trastorno asociado con el flujo de salida de colesterol (por ejemplo, enfermedad cardiovascular).

Otro aspecto de la presente invención proporciona peptidomiméticos de los polipéptidos descritos en la presente memoria. En una realización, la presente invención proporciona un peptidomimético que tiene una conformación sustancialmente tridimensional como un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11 o SEC ID N°: 1. En otra realización, la presente invención proporciona un peptidomimético que tiene una conformación sustancialmente tridimensional como un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N°: 2-10. En una realización, el peptidomimético es un análogo retro-inverso. En otra realización, el peptidomimético es un análogo retro-enantio. En otra realización más, el peptidomimético es un análogo de trans-olefina. Como se describe en la presente memoria, los peptidomiméticos pueden comprender otras modificaciones de la cadena principal. En una realización, los peptidomiméticos de la presente invención incluyen al menos un enlace de cadena principal que no es un enlace amida en la dirección de amino a carboxi respecto al polipéptido de origen natural, o al menos un enlace de cadena principal que no es un enlace amida. Como con los polipéptidos de la presente invención, los peptidomiméticos de la presente invención pueden comprender además un grupo protector y, preferentemente, un grupo protector en ambos extremos amino y carboxilo terminales.

En otro aspecto, la invención proporciona un péptido α -helicoidal anfipático que se une al mismo sitio de unión a ABCA1 como un péptido que comprende un segmento α -helicoidal y tiene una actividad de flujo de salida de colesterol, por ejemplo, la SEC ID N°: 4. La invención proporciona además un péptido α -helicoidal anfipático que se une a HDL. Además, la invención proporciona además un péptido de hélice α anfipático aislado, por ejemplo, que tiene un solo elemento peptídico de hélice α de 24 aminoácidos, que estimula el flujo de salida de colesterol específico de ABCA1.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición que comprende un polipéptido de la presente invención, tal como un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 1-11, o un peptidomimético del mismo, formando un complejo con un lípido. En una realización, el lípido es un fosfolípido. En otra realización, el fosfolípido es 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina ("POPC"). En otra realización más, la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto más de la invención proporciona al menos un polipéptido o peptidomimético descrito en la presente memoria para su uso en métodos de mediación del flujo de salida de colesterol en un sujeto mamífero (por ejemplo, un primate tal como un ser humano o chimpancé, o un roedor tal como una rata o ratón). Los expertos en la materia apreciarán que puede administrarse un ácido nucleico que codifique dicho polipéptido (o peptidomimético) al sujeto en lugar de administrar el polipéptido (o peptidomimético). La presente invención proporciona dichos ácidos nucleicos. Basándose en su actividad de flujo de salida de colesterol, los polipéptidos y peptidomiméticos de la presente invención pueden usarse ventajosamente para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección asociada con dislipidemia, hipercolesterolemia e inflamación.

Otro aspecto más de la presente invención proporciona al menos un polipéptido o peptidomimético descrito en la presente memoria para su uso en métodos para tratar o prevenir un síntoma de aterosclerosis en un mamífero. De nuevo, los expertos en la materia apreciarán que puede administrarse un ácido nucleico que codifique dicho polipéptido (o peptidomimético) al sujeto en lugar de administrar el polipéptido (o peptidomimético). Dichos ácidos nucleicos se proporcionan por la presente invención. En una realización de este método, el mamífero es un mamífero al que se le ha diagnosticado que tiene uno o más síntomas de aterosclerosis. En otra realización, al mamífero se le ha diagnosticado un riesgo de presentar aterosclerosis. Preferentemente, el mamífero es un ser

humano, pero también puede ser un animal no humano. En una realización ejemplar, el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11, preferentemente SEC ID N°: 1 u 8, preferentemente SEC ID N°: 2 ó 9, más preferentemente SEC ID N°: 3 ó 10 y, aún más preferentemente una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4, 5, 6, 7, 12, 13, 14 ó 15.

En otra realización relacionada, los métodos comprenden además administrar al menos un agente terapéutico adicional. Los ejemplos de dichos agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, un anticuerpo, un inhibidor enzimático, un agente antibacteriano, un agente antiviral, un esteroide, un agente antiinflamatorio no esteroideo, un antimetabolito, una citocina o un receptor de citocinas soluble. El inhibidor enzimático puede ser un inhibidor de proteasa o un inhibidor de ciclooxigenasa. El agente adicional puede añadirse como parte de una composición farmacéutica, o puede administrarse al mismo tiempo o dentro de un periodo de tiempo en el que el efecto fisiológico del agente adicional se solape con el efecto fisiológico del polipéptido o polipéptidos, o peptidomimético o peptidomiméticos, de la presente invención. Más específicamente, puede administrarse un agente adicional al mismo tiempo o una semana, varios días, 24 horas, 8 horas o inmediatamente antes de la administración del polipéptido o polipéptidos, o peptidomimético o peptidomiméticos. Como alternativa, un agente adicional puede administrarse una semana, varios días, 24 horas, 8 horas o inmediatamente después de la administración del polipéptido o polipéptidos o peptidomimético o peptidomiméticos.

Otro aspecto más de la presente invención proporciona métodos para estabilizar una placa vulnerable, comprendiendo el método de administrar a un mamífero al menos un polipéptido o peptidomimético descrito en la presente memoria. De nuevo, los expertos en la materia apreciarán que un ácido nucleico que codifique dicho polipéptido puede administrarse al sujeto en lugar de administrar el polipéptido. Dichos ácidos nucleicos se proporcionan por la presente invención. En una realización de este método, el mamífero es un mamífero al que se le ha diagnosticado que tiene una o más placas vulnerables. En otra realización, al mamífero se le ha diagnosticado un riesgo de tener una o varias placas vulnerables. Preferentemente, el mamífero es un ser humano, pero también puede ser un animal no humano. En una realización ejemplar, el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11, preferentemente de SEC ID N°: 8, preferentemente una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 ó 9, más preferentemente una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3 ó 10 y, aún más preferentemente, una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4, 5, 6 ó 7.

La presente invención también proporciona kits para un síntoma de aterosclerosis, comprendiendo el kit un recipiente que contiene un polipéptido o peptidomimético de la presente invención. El kit puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, el kit puede comprender además materiales de instrucciones que muestran el uso del polipéptido peptidomimético para tratar o prevenir una enfermedad o afección asociada con dislipidemia, hipercolesterolemia o inflamación, tal como aterosclerosis. Los polipéptidos y peptidomiméticos proporcionados en los kits de la presente invención pueden comprender todo L-aminoácidos, todo D-aminoácidos o una mezcla de L y D aminoácidos.

En relación con los kits anteriores, el material de instrucciones puede incluir un documento o medio grabado que incluya instrucciones escritas o audibles para el uso de una composición farmacéutica. El material de instrucciones incluye, por ejemplo, una etiqueta en un frasco, un papel insertado en una caja, una impresión en la caja o cartón, instrucciones proporcionadas en un sitio web en una dirección proporcionada en cualquiera de estas localizaciones, etc.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos de preparación de un polipéptido variante que tiene actividad de flujo de salida de colesterol y/o actividad de estabilización de ABCA, comprendiendo el método: (a) proporcionar un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 8; (b) modificar al menos una posición de aminoácido del polipéptido para generar una variante polipeptídica; (c) explorar la variante polipeptídica para determinar la actividad de flujo de salida de colesterol y/o la actividad de estabilización de ABCA; (d) seleccionar la variante polipeptídica que tiene al menos el 80% de la actividad de flujo de salida de colesterol del polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 8 y/o seleccionar la variante polipeptídica que tiene al menos el 80% de la actividad de estabilización de ABCA del polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 8; y (e) sintetizar la variante polipeptídica seleccionada. En algunas realizaciones, el polipéptido está modificado, por ejemplo, por sustitución, delección o inserción de uno, dos, tres o más aminoácidos. En una realización, uno o más de los aminoácidos están sustituidos con un aminoácido conservativo. El polipéptido puede comprender uno o más D-aminoácidos. En algunas realizaciones de este método, el polipéptido modificado o variante comprende todo D-aminoácidos. Además, para modificar uno o más aminoácidos de los polipéptidos, la cadena principal del polipéptido también puede modificarse para generar peptidomiméticos, como se describe en la presente memoria.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona el uso de al menos un polipéptido o peptidomimético de la presente invención en la preparación de un medicamento para mediar el flujo de salida de colesterol en un mamífero. En realizaciones ejemplares, el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 1-11 o, como alternativa, un peptidomimético del mismo. En una realización, el peptidomimético tiene una conformación sustancialmente tridimensional como un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 1-11.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de al menos un polipéptido o peptidomimético de la presente invención en la preparación de un medicamento para tratar un síntoma de aterosclerosis en un mamífero. En realizaciones ejemplares, el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 1-11 o, como alternativa, un peptidomimético del mismo. En una realización, el peptidomimético tiene una conformación sustancialmente tridimensional como un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 1-11.

En un aspecto adicional más, la presente invención proporciona el uso de al menos un polipéptido o peptidomimético de la presente invención en la preparación de un medicamento para estabilizar una placa vulnerable en un mamífero. En realizaciones ejemplares, el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 1-11 o, como alternativa, un peptidomimético del mismo. En una realización, el peptidomimético tiene una conformación sustancialmente tridimensional como un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 1-11.

Un polipéptido y peptidomimético de la invención también es útil como herramienta de investigación y/o herramienta de diagnóstico. Por ejemplo, dicho péptido puede usarse para identificar sujetos que tengan plasma deficiente en colesterol inverso y a aquellos sujetos que respondan al tratamiento inverso de colesterol. Además, un polipéptido de la invención puede usarse para evaluar el potencial anti-aterosclerótico de otros compuestos (incluyendo, por ejemplo, peptidomiméticos).

Además, un polipéptido o peptidomimético de la invención puede usarse para investigar interacciones de lipoproteína-receptor en animales y modelos animales, particularmente cuando se marca un polipéptido o peptidomimético de la presente invención (por ejemplo, un marcador radiactivo, un marcador fluorescente, etc.).

Un polipéptido o peptidomimético de la invención también puede usarse para identificar modelos animales apropiados para la elucidación de rutas metabólicas de lípidos. Por ejemplo, un polipéptido o peptidomimético puede usarse para identificar modelos animales e interacciones de genes y/o fármacos que tengan un efecto sobre el transporte inverso de colesterol.

Otras características, objetos y ventajas de la invención y sus realizaciones preferidas serán evidentes a partir de una lectura en la descripción detallada, los ejemplos, las reivindicaciones y las figuras a continuación.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra que el polipéptido de la SEC ID N°: 4 estimulaba el flujo de salida de colesterol de una forma dependiente de la concentración, promoviendo niveles máximos de flujo de salida a 3 µg/ml. La saturación en el flujo de salida a lo largo de un estrecho intervalo de concentraciones y la curva sigmoidea indican que el polipéptido de la SEC ID N°: 4 estimulaba el flujo de salida de colesterol mediante un proceso cooperativo de alta afinidad que implicaba a ABCA1.

La Figura 2 ilustra que el polipéptido de la SEC ID N°: 4 estimulaba niveles relativamente elevados de flujo de salida de colesterol a concentraciones de masa en las que la apoA-I era en gran medida ineficaz.

La Figura 3 ilustra que los valores de Km para los polipéptidos de la presente invención eran considerablemente inferiores (4-5 veces) que para las apolipoproteínas intactas cuando se expresan como µg/ml, lo que es indicativo de un proceso de alta afinidad que da como resultado altos niveles de flujo de salida de colesterol a concentraciones relativamente reducidas de los polipéptidos. En una base por molécula, los polipéptidos de la presente invención estimulaban el flujo de salida del colesterol de macrófagos con la misma afinidad aparente por ABCA1 y con la eficacia aproximada de apoA-I y E de longitud completa.

La Figura 4 ilustra que el polipéptido de SEC ID N°: 4 y SEC ID N°: 5 requería ABCA1 para la actividad de flujo de salida al igual que la apolipoproteína E2, E3, E4 y A-I. La necesidad de ABCA1 indica que la actividad inespecífica en ausencia de ABCA1 era mínima y similar a la de las apolipoproteínas nativas. Estos resultados concuerdan con otros hallazgos que demuestran que los polipéptidos de la presente invención son ligandos de alta afinidad por ABCA1.

La Figura 5 ilustra que el polipéptido de la SEC ID N°: 4 estabiliza la proteína ABCA1 de macrófagos. La presencia del polipéptido de la SEC ID N°: 4 en el medio extracelular evitaba la desaparición de proteína ABCA1 de forma similar a Apo A1 y concuerda con la actividad de estabilización de ABCA1.

La Figura 6 ilustra que el pretratamiento de macrófagos con el polipéptido de la SEC ID N°: 4 aumenta el flujo de salida de colesterol respecto a Apo A-I. El pretratamiento con polipéptido de SEC ID N°: 4 producía un aumento del 40% en el flujo de salida de colesterol mediado por Apo A-1 a partir de macrófagos, en comparación con el pretratamiento con medios sin suero solamente. Se observaron resultados similares con complejos del polipéptido de SEC ID N°: 4 y POPC.

La Figura 7 ilustra que, cuando se añadía a macrófagos de ratón marcados con [³H]colesterol en forma sin lípidos a una concentración de 3 µg/ml, el polipéptido de la presente invención estimulaba altos niveles de flujo de salida de colesterol celular.

- 5 La Figura 8 ilustra que los polipéptidos de 25 y 24 aminoácidos que carecen de la Ser26 y de la Lys25-Ser26 C-terminal, respectivamente, conservaban una alta actividad y estimulaban el flujo de salida de colesterol eficazmente, como el polipéptido de 26 aminoácidos (SEC ID N°: 5), demostrando que los últimos dos aminoácidos (es decir, Lys25 y Ser26) de los polipéptidos de la presente invención no son esenciales para la actividad. Por el contrario, la
10 delección de tres o más restos del extremo C-terminal producía polipéptidos (de 23, 22 y 18 aminoácidos) que eran débilmente activos en la estimulación del flujo de salida de colesterol.

La Figura 9 ilustra que análogos de D-aminoácidos y retro-invertidos del polipéptido de SEC ID N°: 4 estimulan el flujo de salida de colesterol de ABCA1 de una forma dependiente de ABCA1. Los niveles máximos de flujo de salida de colesterol se consiguieron a concentraciones de 3 µg/ml con estos análogos polipeptídicos.

- 15 La Figura 10 ilustra que los análogos polipeptídicos del polipéptido de la SEC ID N°: 5, en los que los restos de ácido glutámico se sustituyeron con restos de ácido aspártico (es decir, E8, 15>D y E1, 7, 8, 15, 18, 19>D, conservaban una alta capacidad para estimular el flujo de salida de colesterol de una forma dependiente de ABCA1, de forma similar al polipéptido de la SEC ID N°: 5 ("S 1"). Los niveles máximos de flujo de salida de colesterol se consiguieron
20 a concentraciones de 3 µg/ml con estos análogos polipeptídicos de SEC ID N°: 5.

La Figura 11 ilustra que la actividad de flujo de salida de colesterol mediada por ABCA-1 de los polipéptidos de la presente invención depende, en parte, del número de restos ácidos en el polipéptido.

- 25 La Figura 12 ilustra que los restos de lisina pueden sustituir a la arginina en los polipéptidos de la presente invención sin pérdida de actividad. Los análogos de los polipéptidos de SEC ID N°: 5 que tienen las triples sustituciones R3, 14, 23>K3, 14, 23 estimulaban el flujo de salida de colesterol de ABC de macrófagos tratados con AMPc, de forma similar al polipéptido precursor de SEC ID N°: 5.

- 30 La Figura 13 ilustra la importancia de los restos catiónicos para la actividad de flujo de salida de colesterol de ABCA1. Los análogos del polipéptido de la SEC ID N°: 5 que tienen sustituciones de arginina (R) a glutamina (Q), es decir, R3→Q, R14→Q y R23→Q, median todos el flujo de salida de colesterol de una forma dependiente de ABCA1, de forma similar al polipéptido precursor de la SEC ID N°: 5, cuando se usaban a una concentración de 30 µg/ml. Por el contrario, cuando estos tres restos de arginina (R) se sustituyeron con glutamina (Q), el polipéptido resultante
35 tenía una capacidad de flujo de salida enormemente reducida y una eficiencia de flujo de salida reducida.

- La Figura 14 ilustra que los polipéptidos de la presente invención que tienen sustituciones de aminoácidos hidrófobos en la superficie de contacto de lípido-agua mantienen su capacidad para estimular altos niveles de flujo de salida de colesterol. Los polipéptidos de 26 y 24 aminoácidos correspondientes al polipéptido de la SEC ID N°: 4,
40 en los que la arginina en la posición 3 se sustituyó con aminoácidos hidrófobos, es decir, polipéptidos R3>L y R3>F, estimulaban niveles relativamente elevados de flujo de salida de colesterol a partir de macrófagos que expresaban ABCA1 (es decir, más AMPc). De forma similar, los análogos polipeptídicos A12>L de la SEC ID N°: 4 también estimulaban el flujo de salida de colesterol a partir de macrófagos de una forma dependiente de ABCA1.

- 45 La Figura 15 ilustra que las sustituciones de aminoácidos sin carga polares mantienen la actividad de flujo de salida de ABCA1. Los análogos polipeptídicos del polipéptido de la SEC ID N°: 4 que tienen una sustitución de serina a tirosina en la posición 26 (es decir, S26>Y) o sustituciones de serina a alanina en las posiciones 4 y 26 (S4, 26>A) conservaban una actividad de flujo de salida de colesterol dependiente de ABCA1.

- 50 La Figura 16 ilustra que las sustituciones con aminoácidos sin carga no polares y polares mantienen la actividad de flujo de salida de ABCA1. Los análogos polipeptídicos del polipéptido de la SEC ID N°: 4 que tienen una sustitución A11>Y11 tienen propiedades farmacocinéticas idénticas a las del polipéptido precursor. El análisis farmacocinético representado aquí estaba basado en un modelo monofásico.

- 55 La Figura 17 ilustra que cuando el polipéptido de la SEC ID N°: 4 se formula con POPC estimula el flujo de salida de colesterol a partir de macrófagos en mayor medida que el polipéptido sin lípidos.

- La Figura 18 ilustra que a pesar de la aterosclerosis avanzada y de la presencia continua de la agresión dietética durante la intervención, el polipéptido de la SEC ID N°: 4 reducía significativamente la aterosclerosis establecida en
60 comparación con vehículo solamente, a juzgar por una reducción altamente significativa en el contenido de lípidos de placas dentro del seno aórtico.

- Las Figuras 19A y 19B ilustran que el polipéptido de la SEC ID N°: 4 y complejos del polipéptido de la SEC ID N°: 4 y POPC tienen la capacidad de reducir la aterosclerosis en ratones. Después de 6 semanas de tratamiento, el
65 polipéptido de la SEC ID N°: 4 reducía el área de lesiones de placas a lo largo de toda la aorta y disminuía el

contenido de lípidos de placas del seno aórtico. Se observó una reducción similar en la aterosclerosis usando complejos del polipéptido de la SEC ID N°: 4 y POPC. La Figura 19A muestra el porcentaje de lípidos en placas en toda la aorta (control respecto a libre $p<0,0040$, control respecto a complejo $p<0,0002$, libre respecto a complejo $p=ns$). La Figura 19B muestra el porcentaje de placas en la raíz aórtica (control respecto a libre $p<0,0001$, control respecto a complejo $p<0,0001$, libre respecto a complejo $p=ns$).

La Figura 20 ilustra que el polipéptido de la SEC ID N°: 4 estimulaba el flujo de salida de colesterol *in vivo* a juzgar por un aumento pronunciado (2 veces) en los niveles de [3H]colesterol derivado de macrófagos que aparecían en plasma a las 8 y 24 horas post-inyección, en comparación con vehículo de solución salina solamente. Esto estaba acompañado de un aumento de más de 2 veces en la secreción de esterol fecal, indicando que el polipéptido era altamente eficaz para promover el transporte de

La Figura 21 proporciona gráficas de resumen que ilustran que el polipéptido de la SEC ID N°: 4 tiene efectos anti-ateroscleróticos significativos en la prevención de la formación de placas ateroscleróticas en ratones *knock out* para receptor de LDL. EL análisis de toda la aorta por inmunotinción mostró que la cantidad de placas se reducía en animales tratados con el péptido libre o con el complejo de péptido-fosfolípido en comparación con animales de control.

La Figura 22 ilustra que el polipéptido de la SEC ID N°: 4 tiene propiedades antiinflamatorias. La administración del polipéptido de la SEC ID N°: 4 a ratas deficientes en apolipoproteína E dio como resultado niveles disminuidos de la citocina inflamatoria IL-6 en comparación con animales de control que recibieron solución salina.

La Figura 23 ilustra que el polipéptido de la SEC ID N°: 4 modificado para incluir una tirosina en el extremo C-terminal tenía una semivida en suero prolongada. El péptido estaba radiomarcado con yodo y se determinó la cantidad de polipéptido en muestras de suero. Los resultados mostraron que el polipéptido tenía una semivida terminal de aproximadamente 34 horas cuando se administraba por vía intravenosa y una semivida terminal de aproximadamente 11 horas cuando se administraba por vía intraperitoneal.

La Figura 24 ilustra los diagramas de rueda helicoidal de Edmundson y cilíndrico que muestran la estructura de un polipéptido de consenso de la presente invención, es decir, ATI-5261. La representación de rueda de Edmundson muestra la naturaleza anfipática del polipéptido helicoidal. Los números se refieren a la secuencia de aminoácidos primaria del polipéptido. Los círculos sombreados representan los restos ácidos y los círculos parcialmente sombreados los aminoácidos positivos. Cada punto marcado por los números corresponde a incrementos de 20° alrededor de la rueda helicoidal; por lo tanto, la superficie no polar está compuesta por siete restos que abarcan 140° alrededor de la cara de la estructura helicoidal; esto refleja el ángulo de cuña creado por las posiciones relativas de R3, K5 y R23. El corte de la proyección de la rueda helicoidal por el eje largo de la superficie polar crea el diagrama cilíndrico que se muestra aplanado.

Breve descripción de las secuencias

La SEC ID N°: 1 es:

POSIC: ¹	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
AA(s)	E D	F V L W	R K	S	K R	L F W	E D	E D	W L F	F L W	A	A	F L W	R K	E D	F L W	F A L W	E D	E D	F L W	L	A	R K	L F W

La SEC ID Nº: 2 es:

POSIC ¹	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	0	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	0	2	1	2	2	3	2	4
AA(s)	E D	F	R	S	K	L	E	E	W	F	A	A	F	R	E	E	E	F	F	F	E	E	F	L	A	A	R	K	L	
		V	K		R		D	D						K	D					A	D	D								

La SEC ID Nº: 3 es:

POSIC ¹	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
AA(s)	E	F	R	S	K	L	E	E	W	F	A	A	F	R	E	E	F	A	E	F	L	A	R	L
		V																						

Las SEC ID N°: 4-7 son las siguientes:

- 5 SEC ID N°: Secuencia
 SEC ID N° 4 EVRSKLEEWFAAFREFAEEFLARLKS
 SEC ID N° 5 EVRSKLEEWFAAFREFFEEFLARLKS
 SEC ID N° 6 EFRSKLEEWFAAFREFFEEFLARLKS
 SEC ID N° 7 EFRSKLEEWFAAFREFAEEFLARLKS

La SEC ID N°: 8 es:

2	6	S
2	5	K
2	4	L F W
2	3	R K
2	2	A
2	1	L
2	0	F L W
1	9	E D
1	8	E D
1	1	F A L W
1	6	F L W
1	5	E B
1	4	R K
1	3	F L W
1	2	A
1	1	A
1	0	F L W
9		W L F
8		E D
7		E D
6		L F W
5		K R
4		S
3		R K
2		F V L W
1		E D
POSIC	AA(s)	

La SEC ID Nº: 9 es:

POSIC.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	0	1	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	1	1	2	3	4	5	6
AA(s)	E	F	R	S	K	L	E	E	W	F	A	A	F	R	E	F	E	E	F	F	E	E	E	F	L	A	R	L	K	S
	D																													
		V	K		R		D							A	D		D										K			

La SEC ID Nº: 10 es:

POSIC.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	6	S
AA(s)	E	F	R	S	K	L	E	E	W	F	A	A	F	F	F	F	F	F	F	L	A	R	L	K				

La SEC ID Nº: 11 es:

2 4	A V L I F W M P
2 3	R K A V L I F W M P G S T C Y N Q
2 2	S T G A Y
2 1	A V L I F W M P
2 0	A V L I F W M P
1 9	E D
1 8	E D
1 7	A V L I F W M P
1 6	A V L I F W M P
1 5	E D
1 4	R K A V L I F W M P G S T C Y N Q
1 3	A V L I F W M P
1 2	A V L I F W M P
1 1	S T G A Y
1 0	A V L I F W M P
9	A V L I F W M P
8	E D
7	E D
6	A V L I F W M P
5	R K A V L I F W M P G S T C Y N Q
4	S T G A Y
3	R K A V L I F W M P G S T C Y N Q
2	A V L I F W M P
1	E D
POSIC. ¹ AA(s)	

Descripción detallada de la invención y realizaciones preferidas**I. INTRODUCCIÓN**

5 La presente invención proporciona, entre otros, polipéptidos que poseen una fuerte actividad de flujo de salida de colesterol y actividad de estabilización de ABCA. Los polipéptidos de la presente invención tienen una actividad de flujo de salida de colesterol y actividad de estabilización de ABCA1 que es comparable a la de las apolipoproteínas nativas, tales como Apo A-I y Apo E, que es extremadamente sorprendente en vista del hecho de que dichos polipéptidos no son de origen natural. En algunos casos, los polipéptidos de la presente invención también poseen
10 una actividad antioxidante y/o una actividad antiinflamatoria.

Por lo tanto, los polipéptidos de la presente invención son únicos en el sentido de que son pequeños de tamaño y poseen una secuencia de aminoácidos que no se encuentra en la naturaleza, al tiempo que poseen actividades similares en naturaleza a las de las apolipoproteínas nativas. Por lo tanto, los polipéptidos de la presente invención
15 son herramientas biológicas importantes para los estudios *in vitro* e *in vivo* de ABCA1, así como agentes terapéuticos importantes para numerosas aplicaciones terapéuticas.

Las realizaciones preferidas de dichos polipéptidos están basadas en la secuencia de las SEC ID N°: 1-3, 8-10 y 11, así como variantes conservativas de las mismas. Los polipéptidos preferidos de la invención son los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N°: 4-7, que se denominan ATI-5261, S1, S2 y S3 respectivamente. La invención proporciona composiciones que comprenden dichos polipéptidos, métodos de identificación, exploración y síntesis de dichos polipéptidos, y métodos de tratamiento, prevención o diagnóstico de enfermedades y trastornos asociados con dislipidemia, hipercolesterolemia e inflamación, tales como, por ejemplo, cardiopatía, lesiones ateroscleróticas, ictus, Alzheimer (es decir, por mejoría de la deposición de placas) y trastornos del almacenamiento por administración de dichos polipéptidos. La invención proporciona además kits para tratar, prevenir o diagnosticar enfermedades y trastornos asociados con dislipidemia, hipercolesterolemia e inflamación, así como trastornos del almacenamiento de los lípidos.
20
25

II. DEFINICIONES

30 El término "ABC" o "casete de unión a ATP" se refiere a proteínas de membrana multidominio responsables del flujo de salida y del flujo de entrada controlado de alocrios (por ejemplo, colesterol) a través de membranas celulares. Las proteínas ABC comprenden cuatro dominios, con dos dominios transmembrana (TMD) responsables de la unión y del transporte de alocrios, y dos dominios de unión a nucleótidos (NBD) responsables del acoplamiento de la energía de hidrólisis del ATP a cambios conformacionales en los TMD. Los miembros de la familia incluyen, por ejemplo, ABCA1 y ABCA7 (véase, por ejemplo, Dean et al., J. Lipid Res., 42: 1007-1017 (2001)). ABCA1 está caracterizado en Denis et al., J Biol Chem., 279(40): 41529-36 (2004). ABCA1 desempeña un papel en el flujo de salida de colesterol y está regulado positivamente en células que están expuestas a condiciones de enriquecimiento de colesterol, y es la molécula defectuosa en la enfermedad de Tangiers (Brooks-Wilson et al., Nat. Gen., 22: 336-344 (1999); Bodzioch et al., Nat. Gen., 22: 347-351 (1999); Rust et al., Nat. Gen., 22: 352-355 (1999)). ABCA1 se renueva rápidamente y tiene una semivida de aproximadamente 1 hora en ausencia de un estabilizante adecuado, tal como una apolipoproteína (véase, por ejemplo, Wang et al., J. Clin. Invest., 111: 99-107 (2003)). Las secuencias de ABCA se exponen en los N° de Acceso de Genbank: AJ012376; NM_173076; NM_015657; NM_005502; NP_005493; 095477. La estructura del promotor y la organización genómica del gen de ABCA7 humano se describen en Broccardo et al., Cytogenet Cell Genet., 92(3-4): 264-70 (2001). Las secuencias de ABCA7 se exponen en los N° de Acceso de Genbank: NM_033308; NM_019112; NP_150651; NP_061985; AAK00959. Se ha caracterizado una familia de proteínas de unión a ATP relacionadas (véase, por Ejemplo, Higgins et al., J Bioenerg Biomembr., 22(4): 571-92 (1990); Higgins et al., Bioessay, 8(4): 111-6 (1988); Higgins et al., Nature, 323(6087): 448-50 (1986); Doolittle et al., Nature, 323(6087): 451-3 (1986); y Blight y Holland, Mol Microbiol., 4(6): 873-80 (1990)).
40
45
50 Las proteínas que pertenecen a esta familia también contienen una o dos copias de la secuencia de consenso "A" (véase, por ejemplo, Walker et al., EMBO, 1 (8): 945-51 (1982)) o el "bucle P" (véase, por ejemplo, Saraste et al., Trends Biochem Sci., 15(11): 430-4 6155 (1990)). Los miembros de la familia de ABCA se revisan en Broccardo et al., Biochimica et Biophysica Acta, 1461: 395404 (1999).

55 La expresión "hélice alfa anfipática" o "hélice α anfipática" se refiere a una secuencia polipeptídica que puede adoptar una estructura secundaria que es helicoidal, siendo una superficie, es decir, cara, polar y compuesta principalmente por aminoácidos hidrófilos (por ejemplo, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn y Gln) y siendo la otra superficie una cara no polar que comprende principalmente aminoácidos hidrófobos (por ejemplo, Leu, Ala, Val, Ile, Pro, Phe, Trp y Met) (véase, por ejemplo, Kaiser y Kezdy, Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem., 16: 561 (1987) y Science, 223: 249 (1984)).
60

La cara polar de una hélice α anfipática puede presentar, en algunos casos, un "alineamiento de aminoácidos cargados negativamente" o "un alineamiento de aminoácidos ácidos", es decir, una serie de aminoácidos ácidos o cargados negativamente (por ejemplo, Asp y/o Glu) situados aproximadamente de forma regular (por ejemplo, aproximadamente cada uno, dos o tres giros de hélice) dentro de la estructura secundaria del polipéptido. Las hélices α anfipáticas desempeñan un papel en las interacciones de proteína-proteína tanto intra- como
65

intermoleculares, y se ha postulado que proteínas y lipoproteínas (por ejemplo, incluyendo apolipoproteínas) que comprenden hélices α anfipáticas desempeñan un papel en el transporte y metabolismo de lípidos (por ejemplo, HDL) (véase, por ejemplo, Anantharamaiah et al., *Adv. Exp. Med. Biol.*, 285: 131-40 (1991)). La estructura y la función de las hélices α anfipáticas se ha revisado en, por ejemplo, Segrest et al., *Proteins*, 8(2): 103-17 (1990). Se han descrito métodos de simulación por ordenador de identificación de hélices α anfipáticas por, por ejemplo, Jones et al., *J. Lipid Res.*, 33(2): 141-66 (1992). Se han identificado múltiples proteínas que comprenden hélices α anfipáticas incluyendo, por ejemplo, apolipoproteínas y proteínas amiloides del suero.

Una estructura que es "sustancialmente similar a una conformación tridimensional" de un polipéptido de la invención se refiere a la estructura que comprende una secuencia de núcleo, por ejemplo, de 24 restos de longitud, que adopta una estructura secundaria de hélice α anfipática que tiene una orientación de aminoácidos anfipática a lo largo del eje de la estructura de hélice α , siendo una superficie, es decir, una cara, polar y compuesta principalmente por restos hidrófilos, y siendo la otra superficie una cara no polar que comprende principalmente restos hidrófobos. Están presentes dos focos de restos ácidos separados a lo largo del eje hidrófilo. Un polipéptido o peptidomimético que tiene una estructura sustancialmente similar a una conformación tridimensional de un polipéptido de la invención también tiene la capacidad de estimular el flujo de salida de colesterol mediado por E1BCA1.

El término "apolipoproteína" o "Apo" o "apolipoproteína intercambiable" se refiere a una cualquiera de varias proteínas hidrosolubles que se combinan con un lípido (es decir, solubilizan el lípido) para formar una lipoproteína, y son constituyentes de quilomicrones, HDL, LDL y VLDL. Las apolipoproteínas ejercen su efecto fisiológico sobre el metabolismo de lípidos por unión a y activación de enzimas específicas o proteínas de transferencia de lípidos o receptores de superficie celular o transportadores de casetes de unión a ATP (por ejemplo, transportadores ABC). La interacción entre apolipoproteínas y ABCA1 produce un flujo de salida de colesterol y el ensamblaje de partículas de HDL. Las apolipoproteínas incluyen, por ejemplo, Apo A-I, Apo A-II, Apo A-IV, Apo C-I, Apo C-II, Apo C-III, Apo E y proteínas amiloides del suero, tales como amiloide A del suero.

El término "Apolipoproteína AI" o Apo A-I se refiere a un polipéptido que comprende 243 aminoácidos que forman dominios N- y C-terminales (véase, por ejemplo, Saito et al., *J. Biol. Chem.*, 278: 23227-23232 (2003) y Saito et al., *Prog. Lipid Res.*, 43: 350-380 (2004)). La estructura terciaria de apoA-1 comprende un dominio de haz de cuatro hélices N-terminal y un dominio C-terminal que se une a lípidos fuertemente (véase, por ejemplo, Saito et al., *Prog. Lipid Res.*, 43: 350-380 (2004) y Mishra et al., *Biochemistry*, 37: 10313-10324 (1998)). Los restos 44-243 de apoA-I contienen los determinantes estructurales necesarios para mediar el flujo de salida de colesterol mediante ABCA1 (véase, por ejemplo, Chroni et al., *J. Biol. Chem.*, 278: 6719-6730 (2003) y Natarajan et al., *J. Biol. Chem.*, 279: 24044-24052 (2004)). Esta región de apoA-I (aminoácidos 44-243) está compuesta por una serie de diez hélices α anfipáticas de 11 y 22 aminoácidos separadas por restos de prolina, según se define por el exón 4 del gen de apoA-I (véase, por ejemplo Borhani et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: 12291-6 (1997)). Los segmentos α -helicoidales individuales de apoA-1 están definidos, en parte, por la distribución relativa de restos cargados positivamente y se denominan Clase A o Y (véase, por ejemplo, Saito et al., *J. Biol. Chem.*, 278: 23227-23232 (2003)). Las hélices de Clase A poseen aminoácidos cargados positivamente en la superficie de contacto de lípido-agua, mientras que las hélices de Clase Y presentan un aminoácido cargado positivamente hacia la mitad de la superficie polar además de restos catiónicos en las superficies de contacto. La molécula apoA-I intacta se ha cristalizado junto con una forma truncada de la proteína (A-I Δ 1-43) (véase, por ejemplo, Ajees et al. *PNAS*, 103: 2126-2131 (2006); Borhani et al., *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 55: 1578-1583 (1999) y Segrest et al., *J. Biol. Chem.*, 274: 31755-31758 (1999)). Las secuencias de Apo AI se exponen en, por ejemplo, los N° de Acceso de Genbank: P02647, J0009; AAB64381; AAB22835; 1613168A; 1403292A; CAA25519; CAA26097 y LPHUA1.

Cada una de las hélices α anfipáticas representadas por los aminoácidos 43-243 de apoA-I es teóricamente capaz de unirse a superficies de fosfolípidos. Las hélices 1 (aminoácidos 44-65) y 10 (aminoácidos 220-241) de apoA-I poseen la mayor afinidad de unión a lípidos en forma aislada como polipéptidos de 22 aminoácidos sintéticos (véase, por ejemplo, Gillotte et al., *J. Biol. Chem.*, 274: 2021-2028 (1999)). Como tales, las hélices 1 y 10 se han implicado como mediadores del flujo de salida de colesterol celular y del ensamblaje de HDL nacientes (Palgunachari et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 16: 328-338 (1996); Panagotopoulos et al., *J. Biol. Chem.*, 277: 39477-39484 (2002); Chroni et al., *J. Biol. Chem.*, 278: 6719-6730 (2003)). Sin embargo, las hélices individuales de apoA-I con alta actividad de unión a lípidos, tales como las hélices 1 y 10, no son capaces de estimular el flujo de salida de colesterol dependiente de ABCA1 (véase, por ejemplo, Natarajan et al., *J. Biol. Chem.*, 279: 24044-24052 (2004)). Esto sugiere que son necesarios para la actividad biológica factores además de los efectos hidrófobos y de las interacciones de lípidos de membrana. En la naturaleza, son necesarias extensiones relativamente largas de varias hélices α anfipáticas de apoA-I dispuestas en serie y unidas extremo con extremo mediante restos de prolina para mediar interacciones de ABCA1 productivas, es decir, flujo de salida de colesterol y ensamblaje de HDL (véase, Beckstead et al., *Biochem.* 44: 4591-4599 (2005); Natarajan et al., *J. Biol. Chem.*, 279: 24044-24052 (2004); Chroni et al. *J. Biol. Chem.*, 278: 6719-6730 (2003) y Chroni et al., *Biochem.* 43: 2126-2139 (2004)). La unión de las hélices 9 con 10 de apoA-I crea un elemento mínimo con actividad en la estimulación del flujo de salida de lípidos de ABCA1, aunque la actividad de este conjunto de hélices mínimo es algo más débil que la de la proteína apoA-I de longitud completa (véase, Natarajan et al., *J. Biol. Chem.*, 279: 24044-24052 (2004) y Vedhachalam et al. *J. Biol. Chem.*, 279: 49931-49939 (2004)).

El término "Apolipoproteína E" o "Apo E" se refiere a una proteína plasmática en sangre que desempeña un papel importante en la homeostasis de lípidos en la pared arterial, así como en el cerebro (véase, por ejemplo, Wahrle et al., J. Biol. Chem., 279: 40987-40993 (2004)). Apo E se sintetiza y secreta por macrófagos-células espumosas dentro de las lesiones ateroscleróticas, en las que funciona manteniendo la homeostasis del colesterol celular (véase, por ejemplo, Basu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 7545-7549 (1981); Basu et al., Science, 219: 871-873 (1983); Rosenfeld et al., Arterioscler. Thromb., 13: 1382-1389 (1993); O'Brien et al., Am. J. Pathol., 144: 538-548 (1994)) por reversión del fenotipo de célula espumosa de macrófagos. Estos efectos están relacionados con la capacidad de apoE para estimular el flujo de salida de colesterol celular mediante ABCA1, así como con su papel en el transporte inverso de colesterol (Hara et al., J. Biol. Chem., 266: 3080-3086 (1991); Smith et al., J. Biol. Chem., 271: 30647-30655 (1996); Oram et al., J. Lipid Res., 37: 2473-2491 (1996); Zhang et al., J. Biol. Chem., 271: 28641-28646 (1996); Remaley et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 280: 818-823 (2001) y Mahley, Science, 240: 622-630 (1988)). ApoE puede competir con apoA-I por la unión a células que expresan ABCA1 y puede formar un complejo molecular con ABCA1 (Krimbou et al., J. Lipid Res., 45: 839-848 (2004)). Las interacciones defectuosas de Apo E/ABCA1 en el cerebro reducen espectacularmente los niveles de Apo E extracelular e interfieren con el transporte de lípidos intercelular, contribuyendo al desarrollo de trastornos neurológicos (véase, por ejemplo, Hirsch-Reinshagen et al., J. Biol. Chem., 279: 41197-41207 (2004); Wahrle et al., J. Biol. Chem., 279: 40987-40993 (2004) y Koldamavo et al., J. Biol. Chem., 280: 43224-43235 (2005)).

La proteína apoE está compuesta por un dominio de haz de cuatro hélices N-terminal y hélices C-terminales, que es similar a apoA-I (Saito et al., Prog. Lipid Res., 43: 350-380 (2004); Saito et al., J. Biol. Chem., 278: 23227-23232 (2003); Ajees et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 2128-2131 (2006)). El dominio C-terminal de apoE está compuesto por dos segmentos helicoidales largos separados por un resto de prolina (véase, por ejemplo, Hatters et al., Trends Biochem. Sci., 416, en prensa, www.sciencedirect.com (2006); Weisgraber, Adv. Prot. Chem., 45: 249-302 (1994); Saito et al., J. Biol. Chem., 278: 23227-23232 (2003)). El primer segmento consiste en 51 aminoácidos (restos 216-266) que forman una hélice α de clase A y el segundo de 33 aminoácidos (aminoácidos 267-299) que es una hélice α de clase G (Segrest et al., J. Lipid Res., 33: 141-165). Ambos segmentos helicoidales que comprenden aproximadamente 79 aminoácidos (restos 222-229) del dominio CT de apoE son necesarios para mediar el flujo de salida de lípidos de ABCA1 y el ensamblaje de HDL eficazmente (Vedhachalam et. al., J. Biol. Chem., 279(48): 49931-49939 (2004)). Por lo tanto, como es el caso con Apo A-I, la naturaleza depende de extensiones relativamente largas de múltiples segmentos helicoidales unidos en serie para generar interacciones de ABC1 y flujo de salida de colesterol celular de ABCA1 (Vedhachalam et. al., anteriormente). Las secuencias de Apo E se exponen en los N° de Acceso de Genbank: NM_000041; P02649; AAH03557; AAB59397; y AAB59518.

Las expresiones "flujo de salida de colesterol" y "actividad de flujo de salida de colesterol" se refieren al flujo de salida de colesterol de cualquier tipo celular. Por ejemplo, los macrófagos-células espumosas en la pared arterial liberan (es decir, exportan) colesterol a aceptores apropiados, tales como apolipoproteínas y/o HDL. Un compuesto que media el flujo de salida de colesterol aumenta la liberación, es decir, el movimiento del colesterol hacia fuera de la célula y hacia el medio o compartimento extracelular. El flujo de salida de colesterol está acompañado con frecuencia por o precedido por, es decir, sigue al flujo salida de fosfolípidos de células. La liberación coordinada de tanto colesterol como fosfolípidos produce HDL en presencia de un aceptor de lípidos adecuado, por ejemplo, apolipoproteína o péptido. Por lo tanto, los procesos de flujo de salida de colesterol y fosfolípidos están relacionados y son sinónimos entre sí. Un compuesto que aumenta la liberación de colesterol de las células aumenta la cantidad de colesterol y/o fosfolípidos que aparecen fuera de la célula al menos el 25%, 50%, 75%, 100% o al menos 2 veces, 4 veces, 8 veces, 10 veces o más en comparación con el nivel de flujo de salida de colesterol en ausencia del compuesto.

La expresión "actividad de estabilización de ABCA" o "estabilización de ABCA1" se refiere a aumentar y/o prolongar la semivida de una proteína ABCA previniendo su degradación. Un compuesto que tiene actividad de estabilización de ABCA1 retrasará significativamente la degradación de proteínas. Esto producirá un aumento en los niveles de proteína ABCA1 celular de al menos el 25%, 50%, 75%, 100% o al menos 2 veces, 4 veces, 8 veces, 10 veces o más en comparación con la proteína ABCA1 detectada en ausencia del compuesto.

La expresión "actividad antiinflamatoria" se refiere a la prevención o reducción de la inflamación. Se reconocerá que la inflamación desempeña un papel en el desarrollo de aterosclerosis y está asociada con dislipidemia, hipercolesterolemia y/u oxidación de lípidos de lipoproteínas. La respuesta inflamatoria puede ser local, tal como en la pared arterial o cerebro u otros tejidos extravasculares, y sistémica. La inflamación, tanto local como sistémica, puede estar asociada con la generación de mediadores de la inflamación, tales como lípidos oxidados y/o citocinas. En general, la respuesta inflamatoria está asociada con el reclutamiento de monocitos-macrófagos sanguíneos hacia compartimentos extravasculares. El reclutamiento de monocitos-macrófagos está asociado con la activación, diferenciación y retención de macrófagos en los tejidos extravasculares. Un compuesto que tiene actividad antiinflamatoria disminuirá una respuesta inflamatoria según se mide por una disminución en los mediadores de la inflamación (por ejemplo, moléculas de adhesión, citocinas y/o lípidos oxidados) y/o una disminución en macrófagos y/o en la activación de macrófagos en placas y tejidos en comparación con la ausencia del compuesto.

La expresión "actividad antioxidante" se refiere a la prevención o reducción de la oxidación causada por especies de reactivas de oxígeno (ROS) incluyendo, por ejemplo, peróxido de hidrógeno (H_2O_2); ión hipoclorito ($-OCl$); radical

hidroxilo (-OH); y el anión superóxido (O_2^-). Varias sustancias de origen natural (por ejemplo, proteínas y moléculas pequeñas) poseen actividad antioxidante. Por ejemplo, las apolipoproteínas pueden inhibir la peroxidación de lípidos, protegiendo de este modo las superficies de fosfolípidos de iniciadores de radicales libres lipófilos, así como hidrosolubles (véase, por ejemplo, Biochemistry, 41: 2089-2096 (2002)). Además, el alfa-tocoferol (vitamina E) es un antioxidante. Además, las proteínas y péptidos que promueven el movimiento de oxidantes, tales como oxisteroles y fosfolípidos oxidados, y antioxidantes (vitamina E) hacia dentro y hacia fuera de las células mediante transportadores ABS o cualquier otro medio puede verse que tienen actividad antioxidante para librar a la pared arterial de mediadores de la inflamación y/o afectar a la restauración de un equilibrio redox favorable en tejidos. Un compuesto con actividad antioxidante tiene una actividad antioxidante que es de al menos el 25%, 50%, 75%, 100% o de al menos 2 veces, 4 veces, 8 veces, 10 veces o más que la actividad antioxidante en ausencia del compuesto.

La “estabilización de placas”, como se usa en la presente memoria, se refiere a la estabilización de placas vulnerables del riesgo de rotura o erosión por eliminación de colesterol de placas ricas en lípidos, incluyendo, pero sin limitación, la eliminación de colesterol de células espumosas-macrófagos. Las placas contienen sustancias trombogénicas, es decir, sustancias que cuando se exponen al plasma son muy potentes en la agregación de plaquetas con el riesgo de trombosis local y oclusión de vasos, tales como factor tisular. La rotura de la placa y la exposición de dicho material se evitan por el tapón fibroso que separa la placa del vaso. La eliminación de lípidos confiere estabilidad de placas de dos formas principales. En primer lugar, anatómicamente, la eliminación de lípidos por retracción de la papilla en la arteria está confiriendo estabilidad a la placa por disminución del riesgo de estrés hemodinámico (expansión-contracción asociadas con latidos cardíacos y cambios de la presión arterial). En segundo lugar, como se describe en la bibliografía, la acumulación de colesterol está estimulando la síntesis y secreción de proteasas, incluyendo metaloproteinasas de la matriz (MMP) que tienen efectos de lisis sobre el tapón fibroso.

La expresión “Transporte Inverso de Colesterol (RCT)”, como se usa en la presente memoria, se refiere al proceso de eliminar colesterol de macrófagos-células espumosas y de las placas ricas en lípidos de la pared arterial con la posterior transferencia a través del plasma hacia el hígado para su captación, procesamiento y excreción como esteroides neutros (colesterol) o esteroides ácidos (colesterol hidroxilado/bilis) en las heces. El flujo de salida de colesterol de macrófagos-células espumosas es un requisito para el beneficio del RCT de por sí aun cuando el colesterol puede desplazarse a otras células adyacentes menos vulnerables. Sin embargo, la eliminación posterior de dicho colesterol por transporte en partículas de tipo HDL al hígado para su excreción es un aspecto favorable del tratamiento. Dicho RCT completo proporciona un rejuvenecimiento general del árbol arterial por eliminación neta real del contenido de colesterol en las arterias. El RCT y los efectos de estabilización de placas se confieren directamente por los péptidos o los complejos que forman de forma natural con fosfolípidos en plasma y células o, como alternativa, apoA-I/HDL, ya que los péptidos se unen a partículas de HDL endógenas, cambiando de este modo sus propiedades y haciendo que sean más eficaces para promover el RCT.

Una enfermedad o trastorno asociado con “dislipidemia” es cualquier enfermedad o trastorno en el que el metabolismo de lípidos esté desregulado, debido a alteraciones en las concentraciones de lípidos y lipoproteínas en tejidos (es decir, sangre) y/o a una mediación anormal del flujo de salida de colesterol o a la estabilización anormal de ABCA. Dichas enfermedades incluyen, por ejemplo, cardiopatía, lesiones ateroscleróticas, ictus, Alzheimer y trastornos del almacenamiento.

El término “aminoácido” se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una forma similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metilsulfonio de metionina. Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o cadenas principales polipeptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de una forma similar a un aminoácido de origen natural. Una descripción más detallada de aminoácidos, así como de sustituciones de aminoácidos conservativas, se proporciona a continuación en la sección titulada “Polipéptidos”.

Los aminoácidos pueden denominarse en la presente memoria por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la IUPAC-IUP Biochemical Nomenclature Commission. Asimismo, los nucleótidos pueden denominarse por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a un polímero de restos aminoacídicos. Los términos son aplicables a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos aminoacídicos son un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural. Los polímeros de aminoácidos pueden comprender en su totalidad L-aminoácidos, en su totalidad D-aminoácidos o una mezcla de L- y D-aminoácidos. El uso de la expresión “péptido o peptidomimético” en la solicitud actual enfatiza simplemente

que se contemplan péptidos que comprenden aminoácidos de origen natural así como aminoácidos modificados.

Los términos “aislado”, “purificado” o “biológicamente puro” se refieren al material que está sustancialmente o esencialmente libre de los componentes que normalmente lo acompañan como se encuentra en su estado nativo. La pureza y la homogeneidad se determinan típicamente usando técnicas de química analítica tales como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alto rendimiento. Una proteína que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada. El término “purificada” denota que un ácido nucleico o proteína da origen a esencialmente una banda en un gel electroforético. Particularmente, significa que el ácido nucleico o proteína tiene una pureza de al menos el 85%, más preferentemente una pureza de al menos el 95% y, más preferentemente, una pureza de al menos el 99%.

Los términos “idéntico” o porcentaje de “identidad”, en el contexto de dos o más secuencias polipeptídicas (o dos o más ácidos nucleicos), se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de restos aminoácidos o nucleótidos que son iguales, por ejemplo, una identidad del 60%, preferentemente una identidad del 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% a lo largo de una región especificada (tal como los primeros 24 aminoácidos de la SEC ID N°: 1) cuando se comparan y se alinean para una correspondencia máxima a lo largo de una ventana de comparación, o una región designada según se mide usando uno de los algoritmos de comparación de secuencias siguientes, o por alineamiento manual e inspección visual. Se dice entonces que dichas secuencias son “sustancialmente idénticas”. Esta definición también se refiere a la complementaria de una secuencia ensayo.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencias. Pueden usarse los parámetros del programa por defecto o, como alternativa, pueden designarse parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces los porcentajes de identidad de secuencia para las secuencias de ensayo respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa. Para una comparación de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas, se usan los algoritmos BLAST y BLAST 2.0 y los parámetros por defecto analizados a continuación.

Las expresiones “ácido nucleico” y “polinucleótido” se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma mono- o bicatenaria. El término incluye ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o restos o enlaces de cadena principal modificados, que son sintéticos, de origen natural y de origen no natural, que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y que están metabolizados de una forma similar a los nucleótidos de referencia. Los ejemplos de dichos análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforoamidatos, metil fosfonatos quirales, 2-O-metil ribonucleótidos, ácidos polipeptidonucleicos (PNA). A menos que se indique otra cosa, una secuencia de ácido nucleico particular también incluye “variantes modificadas de forma conservativa” de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. En concreto, las sustituciones de codones degenerados pueden conseguirse generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con restos de bases mixtas y/o desoxinosina (Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19: 5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem., 260: 2605-2608 (1985); Rossolini et al., Mol. Cell. Probes, 8: 91-98 (1994)). El término ácido nucleico se usa indistintamente con gen, ADNc, ARNm, oligonucleótido y polinucleótido.

Un “vector de expresión” es una construcción de ácido nucleico generada de forma recombinante o sintética con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula hospedadora. El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus o fragmento de ácido nucleico. Típicamente, el vector de expresión incluye un ácido nucleico a transcribir unido operativamente a un promotor.

Por “célula hospedadora” se entiende una célula que contiene un vector de expresión y sirve de soporte a la replicación o expresión del vector de expresión. Las células hospedadoras pueden ser células procariotas, tales como *E. coli* o células eucariotas tales como células de levadura, insecto, anfibios o mamíferos, tales como CHO, HeLa y similares, por ejemplo, células cultivadas, explantes y células *in vivo*.

Un “marcador” o “marcador detectable” es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunquímicos o químicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen radioisótopos (por ejemplo, ^3H , ^{35}S , ^{32}P , ^{51}Cr o ^{125}I), colorantes fluorescentes, reactivos electrodenso, enzimas (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante u otros usados comúnmente en un ELISA), biotina, digoxigenina o haptenos y proteínas para los que están disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales (por ejemplo, el polipéptido codificado por la SEC ID N°: 1, 2 ó 3 puede hacerse detectable, por ejemplo, por incorporación de un radiomarcador en el polipéptido, y usarse para detectar anticuerpos específicamente reactivos con el polipéptido).

Como se usa en la presente memoria, el término “mejora” significa que alivia, reduce o disminuye el grado de un

síntoma o disminuye el número de apariciones de episodios de una manifestación patológica.

El término “prevenir” está reconocido en la técnica y, cuando se usa en relación con una afección, tal como recurrencia o aparición de una enfermedad tal como hipercolesterolemia o aterosclerosis, es bien entendido en la técnica, e incluye la administración de una composición que reduce la frecuencia de, o retrasa la aparición de, síntomas de una afección médica en un sujeto respecto a un sujeto que no recibe la composición.

Como se usa en la presente memoria, el término “tratar” significa ralentizar, detener o revertir la progresión del trastorno o enfermedad. En una realización preferida, “tratar” significa revertir la progresión hasta el punto de eliminar el trastorno o enfermedad.

Como se usa en la presente memoria, el término “inhibe” significa que la cantidad se reduce en comparación con la cantidad que se produciría en una muestra control. En una realización preferida, el término inhibe significa que la cantidad se reduce en más del 50%, aun más preferentemente en más del 75%, o incluso el 100%.

Un “sujeto”, “paciente” o “mamífero” a tratar por los métodos descritos en la presente memoria puede significar un ser humano o un animal no humano.

III. POLIPÉPTIDOS

La presente invención proporciona una familia de polipéptidos de origen no natural que usan la potente ruta del transporte inverso de colesterol (RCT) para mediar el flujo de salida de colesterol. Además de ser mediadores selectivos y potentes del flujo de salida de colesterol dependiente de ABCA1, los polipéptidos de la presente invención también tienen actividad de estabilización de ABCA, actividad antioxidante, así como actividad antiinflamatoria, cualquier combinación de estas actividades y, preferentemente, todas estas actividades.

Los péptidos de la invención se basan en el sorprendente descubrimiento de una secuencia de aminoácidos de núcleo que tiene un efecto sobre el flujo de salida de colesterol. Los polipéptidos de la presente invención son variantes polipeptídicas de origen no natural de ese péptido de núcleo (es decir, el polipéptido de la SEC ID N°: 4, que también se denomina en la presente memoria “ATI-5261” o “5261”) que estimulaba el flujo de salida de colesterol dependiente de ABCA1 con una potencia molar similar a la de las apolipoproteínas (por ejemplo, Apo A-I, Apo E, etc.). Curiosamente, los miembros de la familia de polipéptidos de la presente invención son de pequeño tamaño, correspondiente a un solo segmento helicoidal que captura toda la actividad biológica y la potencia de las apolipoproteínas intactas y las extensiones largas de múltiples segmentos α -helicoidales encontrados en la naturaleza que son necesarias para ejercer la actividad de flujo de salida de colesterol mediante ABCA 1.

Respecto a los péptidos de hélice α anfipática, los aminoácidos hidrófobos se concentran en un lado de la hélice, habitualmente con aminoácidos polares o hidrófilos en el otro. Esta disposición es común en hélices alfa de apolipoproteínas y proteínas globulares, en las que una cara de la hélice está orientada hacia el núcleo hidrófobo y una cara está orientada hacia la superficie expuesta al agua. Diferentes secuencias de aminoácidos tienen diferentes tendencias a formar una estructura α -helicoidal. Metionina, alanina, leucina, glutamato y lisina tienen todas tendencias de formación de hélices especialmente elevadas, mientras que la prolina, glicina, tirosina y serina tienen tendencias de formación de hélices relativamente escasas. La prolina tiende a romper o plegar hélices porque no puede donar un enlace de hidrógeno de amida (al no tener hidrógeno de amida), y porque su cadena lateral interfiere estéricamente. Su estructura de anillo también restringe su ángulo diedro de cadena principal a las proximidades de -70° , que es menos común en las α -hélices. Un experto entiende que aunque la prolina puede estar presente en ciertas posiciones en las secuencias descritas en la presente memoria, por ejemplo, en ciertas posiciones en la secuencia de la SEC ID N°: 11, se esperaría que la presencia de más de tres prolinas dentro de la secuencia alterase la estructura helicoidal. Por consiguiente, los polipéptidos de la invención no tienen más de tres prolinas y, comúnmente, no tienen más de dos prolinas presentes en posiciones en la secuencia formadora de la hélice alfa. Típicamente, cuando una prolina está presente en la secuencia de una estructura helicoidal de núcleo de un péptido de la invención, por ejemplo, un péptido que comprende la SEC ID N°: 11, está presente en una sola posición de la secuencia de hélice de núcleo.

La Figura 24 expone una rueda helicoidal de Edmundson y un diagrama cilíndrico correspondiente que muestran la estructura de la secuencia de consenso, es decir, el polipéptido de la SEC ID N°: 4, en la que se basa generalmente la familia de polipéptidos. La representación de rueda de Edmundson muestra la naturaleza anfipática de los polipéptidos α -helicoidales de la presente invención. Los números se refieren a la secuencia de aminoácidos primaria del polipéptido de consenso. Los círculos sombreados representan los restos aminoacídicos ácidos y los círculos parcialmente sombreados representan los restos aminoacídicos catiónicos (cargados positivamente). Cada punto marcado por los números corresponde a incrementos de 20° alrededor de la rueda helicoidal. Este polipéptido de consenso presenta la posición de restos catiónicos en la superficie de contacto de lípido-agua de la hélice α anfipática fijada a 140° ; esto impone el ángulo de cuña, es decir, el tamaño, de la superficie no polar, que se cree que es importante para conferir actividad en la unión a superficies de fosfolípidos. Una característica de este polipéptido de consenso se refiere a supuestos sitios de formación de puentes salinos que se introdujeron por ingeniería genética entre aminoácidos cargados positivamente y aminoácidos cargados negativamente en la

superficie de contacto de lípido-agua de la hélice α anfipática. En este polipéptido de consenso, hay cuatro sitios de este tipo creados por parejas ácidas/catiónicas entre los restos E1/K5, E199/R23, E18/R14 y E7/R3, es decir, estando cada resto aminoacídico catiónico situado a cuatro restos de un resto aminoacídico ácido alrededor de la cara de la hélice α anfipática. Se cree que la creación de numerosos sitios para puentes salinos intrahelicoidales

- 5 potenciales puede ayudar a estabilizar la estructura secundaria del polipéptido, optimizando su contenido α -helicoidal. El corte de la proyección de rueda helicoidal por el eje largo de la superficie polar crea el diagrama cilíndrico, que se muestra aplanado en la Figura 24. De nuevo, es en esta secuencia de consenso en la que se basa generalmente la familia de polipéptidos de la presente invención.
- 10 Por lo tanto, en una realización, la presente invención proporciona polipéptidos aislados que comprenden una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10. Más particularmente, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:

EX 2 RSKLEEWFAAFREFX17EEFLARLKS (SEC ID N°: 10)

- 15 en la que X2 es un aminoácido incluyendo, pero sin limitación, F y V; y X17 es un aminoácido incluyendo, pero sin limitación, F y A; y en la que cada letra representa el código de aminoácido de una letra convencional.

- En una realización, el polipéptido aislado comprende (y en ciertas realizaciones consiste en o, como
- 20 alternativamente, consiste esencialmente en) la secuencia de aminoácidos siguiente: EVRSKLEEWFAAFREFFAEEFLARLKS (SEC ID N°: 4, que de nuevo se denomina también en la presente memoria "ATI-5261" o "5261"). En otra realización, el polipéptido aislado comprende (y en ciertas realizaciones consiste en o, como alternativa, consiste esencialmente en) la secuencia de aminoácidos siguiente: EVRSKLEEWFAAFREFFEFLARLKS (SEC ID N°: 5, que también se denomina en la presente memoria "S1"). En otra realización más, el polipéptido aislado comprende (y en ciertas realizaciones consiste en o, como alternativa,
- 25 consiste esencialmente en) la secuencia de aminoácidos siguiente: EFRSKLEEWFAAFREFFEFLARLKS (SEC ID N°: 6, que también se denomina en la presente memoria "S2"). En otra realización más, el polipéptido aislado comprende (y en ciertas realizaciones consiste en o, como alternativa, consiste esencialmente en) la secuencia de aminoácidos siguiente: EFRSKLEEWFAAFREFFAEEFLARLKS (SEC ID N°: 7, que también se denomina en la presente memoria "S3").

- 30 Los expertos en la materia entenderán fácilmente que los polipéptidos anteriores no incluyen toda la familia de polipéptidos de la presente invención. De hecho, usando las enseñanzas proporcionadas en la presente memoria, pueden producirse de forma rutinaria otros polipéptidos adecuados (por ejemplo, variantes conservativas) mediante, por ejemplo, sustituciones conservativas o semiconservativas (por ejemplo, D sustituido por E), extensiones,
- 35 deleciones y similares. Además, usando los ensayos proporcionados en la presente memoria, otros polipéptidos adecuados pueden explorarse de forma rutinaria para actividades biológicas deseadas.

- Por lo tanto, en otra realización, la presente invención proporciona variantes polipeptídicas de los polipéptidos de las SEC ID N°: 10 y 4-7. En una realización ejemplar, los polipéptidos tienen una identidad de al menos el 75%, al
- 40 menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 98% con los polipéptidos de la SEC ID N°: 10 y, más particularmente, con los polipéptidos de las SEC ID N°: 4-7. En otra realización, la presente invención proporciona variantes polipeptídicas de los polipéptidos de las SEC ID N°: 1-3 y 8-9. En una realización ejemplar, los polipéptidos tienen una identidad de al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 98% con los polipéptidos de la SEC ID N°: 1 o, más particularmente, los
- 45 polipéptidos de las SEC ID N°: 3 y 8-9. Como apreciarán los expertos en la materia, los restos aminoacídicos no idénticos pueden ser de origen natural o no natural. La expresión "porcentaje idéntico" se refiere a la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos (o entre dos secuencias de nucleótidos, que también se proporcionan por la presente invención). Cada identidad puede determinarse por comparación de una posición en cada secuencia que puede estar alineada con fines de comparación. Cuando una posición equivalente en las
- 50 secuencias comparadas está ocupada por el mismo aminoácido o base, entonces las moléculas son idénticas en esa posición; cuando el sitio equivalente está ocupado por el mismo resto aminoacídico o uno similar (por ejemplo, similar en su naturaleza estérica y/o electrónica), entonces las moléculas pueden denominarse homólogas (similares) en esa posición. La expresión como porcentaje de homología, es decir, la similitud o identidad se refiere a una función del número de aminoácidos similares o idénticos en posiciones compartidas por las secuencias
- 55 comparadas. Pueden usarse diversos algoritmos y/o programas de alineamiento incluyendo, por ejemplo, FASTA, BLAST y ENTREZ. FASTA y BLAST están disponibles como parte del paquete de análisis de secuencia GCG (University of Wisconsin, Madison, Wis.) y pueden usarse con, por ejemplo, los ajustes por defecto. ENTREZ está disponible a través del National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD. En una realización, el porcentaje de identidad de dos secuencias puede determinarse
- 60 mediante el programa GCG con un peso de huecos de 1, por ejemplo, cada hueco de aminoácido se considera como si hubiera un solo emparejamiento erróneo de aminoácido o nucleótido entre las dos secuencias.

En otra realización ejemplar, que puede superponerse con las realizaciones descritas anteriormente, los polipéptidos de la SEC ID N°: 10 y, más particularmente, los polipéptidos de las SEC ID N°: 4-7 están sustituidos con restos

aminoácidos conservativos (o semiconservativos). De forma similar, en otras realizaciones, los polipéptidos de SEC ID N°: 1 o, más particularmente, los polipéptidos de las SEC ID N°: 3 y 8-9 están sustituidos con restos aminoácidos conservativos (o semiconservativos). La expresión “sustituciones de aminoácidos conservativas” se refiere a la sustitución (conceptualmente o de otro modo) de un aminoácido de un grupo de este tipo con un aminoácido diferente del mismo grupo. Una forma funcional de definir propiedades comunes entre aminoácidos individuales es analizar las frecuencias normalizadas de cambios de aminoácidos entre las proteínas correspondientes de organismos homólogos (véase, por ejemplo, Schulz, G. E. y R. H. Schinner, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag). De acuerdo con dichos análisis, pueden definirse grupos de aminoácidos en los que los aminoácidos dentro de un grupo se intercambian preferentemente entre sí y, por lo tanto, se parecen más entre sí en su impacto sobre la estructura proteica global (véase, por ejemplo, Schulz, G. E. y R. H. Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag). Un ejemplo de un conjunto de grupos de aminoácidos definido de esta forma incluye: (i) un grupo cargado, que consiste en Glu y Asp, Lys, Arg e His; (ii) un grupo cargado positivamente, que consiste en Lys, Arg e His; (iii) un grupo cargado negativamente, que consiste en Glu y Asp; (iv) un grupo aromático, que consiste en Phe, Tyr y Trp; (v) un grupo de anillo de nitrógeno, que consiste en His y Trp; (vi) un grupo no polar alifático grande, que consiste en Val, Leu e Ile; (vii) un grupo ligeramente polar, que consiste en Met y Cys; (viii) un grupo de restos pequeños, que consiste en Ser, Thr, Asp, Asn, Gly, Ala, Glu, Gln y Pro; (ix) un grupo alifático que consiste en Val, Leu, Ile, Met y Cys; y (x) un grupo hidroxilo pequeño, que consiste en Ser y Thr.

En otra realización ejemplar, que de nuevo puede superponerse con las realizaciones descritas anteriormente, “una sustitución de aminoácido conservativa” puede referirse a la sustitución de un aminoácido por otro que es similar en su peso molecular o similar en su hidrofobicidad. Por “peso molecular similar” e “hidrofobicidad similar” se entiende un valor que está dentro del 25%, más preferentemente del 20%, 15%, 10% o menos del 10% del valor respectivo. Se exponen datos para pesos moleculares e hidrofobicidades de aminoácidos en la Tabla 1. Se expone una clasificación de hidrofobicidad en la Tabla 2; una sustitución conservativa incluye intercambiar un aminoácido, que se designa “=”, con otro (por ejemplo, Tyr = Trp) e intercambiar un aminoácido por otro que sea adyacente al mismo en el orden de clasificación definido por los símbolos de mayor y menor que.

TABLA 1:

Parámetros para los L-alfa-aminoácidos fisiológicos no modificados				
Aminoácido	Código de 3 letras	Código de 1 letra	Peso molecular†	Hidrofobicidad‡
Alanina	Ala	A	89,09	0,616
Cisteína	Cys	C	121,16	0,680
Aspartato	Asp	D	133,10	0,028
Glutamato	Glu	E	147,13	0,043
Fenilalanina	Phe	D	165,19	1,00
Glicina	Gly	G	75,07	0,501
Histidina	His	H	155,16	0,165
Isoleucina	He	I	131,18	0,943
Lisina	Lys	K	146,19	0,283
Leucina	Leu	L	131,18	0,943
Metionina	Met	M	149,21	0,738
Asparagina	Asn	N	132,12	0,236
Prolina	Pro	P	115,13	0,711
Glutamina	Gln	Q	146,15	0,251
Arginina	Arg	R	174,20	0,000
Serina	Ser	S	105,09	0,359
Treonina	The	T	119,12	0,450
Valina	Val	V	117,15	0,825
Triptófano	Trp	W	204,23	0,878
Tirosina	Tyr	Y	181,19	0,880

† Los pesos moleculares proporcionados son los de los aminoácidos libres neutros; los pesos de los restos pueden obtenerse restando un equivalente de agua (18 g/mol).

‡ Las hidrofobicidades proporcionadas son los valores "ajustados a escala" a partir de determinaciones computacionales del log(P) mediante la "Estrategia de fragmentos pequeños" (véase, "Development of Hydrophobicity Parameters to Analyze Proteins Which Bear Post- or Cotranslational Modifications" Black, S.D. y Mould, D.R., Anal. Biochem., 193: 72-82 (1991)). La ecuación usada para ajustar a escala los valores del log(P) sin procesar hasta los valores ajustados a escala proporcionados es la siguiente: Parámetros ajustados a escala = (Parámetros sin procesar + 2,061)/4,484.

Tabla 2:

Tendencia de los parámetros de hidrofobicidad para los L-alfa-aminoácidos fisiológicos
Phe > Leu = Ile > Tyr = Trp > Val > Met > Pro > Cys > Ala > Gly >
Thr > Ser > Lys > Gln > Asn > His > Glu > Asp > Arg

Otro indicio de que dos polipéptidos son variantes conservativas el uno del otro es que los dos polipéptidos desempeñan la misma función y, en realizaciones preferidas, la misma función al mismo nivel de actividad o a un nivel de actividad muy similar. Por lo tanto, en una realización, una variante conservativa de un polipéptido de esta invención comprenderá una actividad de al menos el 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de la encontrada en un polipéptido de SEC ID N°: 10 o, más particularmente, un polipéptido de las SEC ID N°: 4-7. De forma similar, en otras realizaciones, una variante conservativa de un polipéptido de esta invención comprenderá una actividad de al menos el 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de la encontrada en un polipéptido de SEC ID N°: 1 o, más particularmente, un polipéptido de las SEC ID N°: 3 y 8-9. De nuevo, en algunas realizaciones, los polipéptidos de esta invención poseerán más de una actividad. Por ejemplo, un polipéptido de la invención puede comprender una actividad de mediación del flujo de salida de colesterol, una actividad de estabilización de ABCA, una actividad antiinflamatoria, así como una actividad antioxidante, cualquier combinación de estas actividades o, de forma ideal, todas estas actividades. Las variantes conservativas pueden tener una o más de las mismas actividades y, de forma ideal, todas las mismas actividades. Los ensayos de exploración descritos en la presente memoria pueden usarse fácilmente por los expertos en la materia para determinar si dos o más polipéptidos poseen actividades similares. Además, los expertos en la materia conocerán otros ensayos de exploración que pueden usarse para determinar si dos o más polipéptidos poseen propiedades o actividades biológicas similares.

Aunque en realizaciones preferidas, los polipéptidos de esta invención utilizan aminoácidos de origen natural o formas D de aminoácidos de origen natural, pueden usarse sustituciones con aminoácidos de origen no natural (por ejemplo, sulfóxido de metionina, metilsulfonio de metionina, norleucina, ácido épsilon-aminocaproico, ácido 4-aminobutanoico, ácido tetrahidroisoquinolino-3-carboxílico, ácido 8-aminocaprílico, ácido 4-aminobutírico, Lys(N(épsilon)-trifluoroaceto), ácido α -aminoisobutírico y similares) en los polipéptidos de la presente invención. Como con las otras sustituciones de aminoácidos, los aminoácidos de origen no natural están típicamente sustituidos de modo que, tras la sustitución, conservan el carácter espacial e iónico o no iónico del resto al que sustituyen.

Por lo tanto, en una realización, la presente invención proporciona polipéptidos que tienen sustituciones de aminoácidos conservativas de los polipéptidos de la SEC ID N°: 10 y de las SEC ID N°: 4-7, comprendiendo los polipéptidos la secuencia de aminoácidos siguiente:

$X_1X_2X_3SX_5X_6X_7X_8X_9X_{10}AAX_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}LAX_{23}X_{24}KS$ (SEC ID N°: 8)

en la que X_1 , X_7 , X_8 , X_{15} , X_{18} y X_{19} se seleccionan cada uno independientemente y son aminoácidos incluyendo, pero sin limitación, E y D; X_2 es un aminoácido incluyendo, pero sin limitación, F, V, L y W; X_3 , X_5 , X_{14} y X_{23} se seleccionan cada uno independientemente y son aminoácidos incluyendo, pero sin limitación, R y K; X_6 , X_9 , X_{10} , X_{13} , X_{16} , X_{20} y X_{24} se seleccionan cada uno independientemente y son aminoácidos incluyendo, pero sin limitación, L, F y W; y X_{17} es un aminoácido incluyendo, pero sin limitación, F, A, L y W. En ciertas realizaciones, los polipéptidos modificados conservativamente de la SEC ID N°: 8 tendrán una o más de las mismas actividades y, de forma ideal, todas las mismas actividades que un polipéptido de la SEC ID N°: 10 o un polipéptido de las SEC ID N°: 4-7.

En otra realización, la presente invención proporciona polipéptidos que tienen sustituciones de aminoácidos conservativas de los polipéptidos de la SEC ID N°: 10 y de las SEC ID N°: 4-7, comprendiendo los polipéptidos la secuencia de aminoácidos siguiente:

$X_1X_2X_3SX_5LX_7X_8WFAAFX_{14}X_{15}FX_{17}X_{18}X_{19}FLAX_{23}LKS$ (SEC ID N°: 9)

en la que: X_1 , X_7 , X_8 , X_{15} , X_{18} y X_{19} se seleccionan independientemente y son aminoácidos incluyendo, pero sin limitación, E y D; X_2 es un aminoácido incluyendo, pero sin limitación, F y V; X_3 , X_5 , X_{14} y X_{23} se seleccionan cada uno independientemente y son aminoácidos incluyendo, pero sin limitación, R y K; y X_{17} es un aminoácido

incluyendo, pero sin limitación, F y A. Como con los polipéptidos modificados de forma conservativa de la SEC ID N°: 8, los polipéptidos modificados de forma conservativa de la SEC ID N°: 9 tendrán una o más de las mismas actividades y, de forma ideal, todas las mismas actividades que un polipéptido de la SEC ID N°: 10 o un polipéptido de las SEC ID N°: 4-7.

5 Además de lo anterior, la presente invención proporciona formas truncadas de los polipéptidos de las SEC ID N°: 4-7 y 8-10. En una realización de este tipo, los aminoácidos en las posiciones 25 (es decir, K) y 26 (es decir, S) de las SEC ID N°: 8-10 no están presentes. Los polipéptidos resultantes, es decir los polipéptidos de las SEC ID N°: 1-3, 11, que tienen una longitud de 24 aminoácidos, tienen propiedades similares a las de los polipéptidos de las SEC ID N°: 8-10. De forma similar, los polipéptidos de la invención pueden estar truncados respecto a los polipéptidos de las SEC ID N°: 4-7. De nuevo, en dichas realizaciones, los aminoácidos en las posiciones 25 y 26 no están presentes (SEC ID N°: 12-15).

15 Un experto en la materia entiende que pueden añadirse restos aminoacídicos al extremo C-terminal y/o N-terminal de los polipéptidos de la presente invención sin afectar a la actividad de dichos polipéptidos. Por lo tanto, un polipéptido de la invención que comprende una secuencia helicoidal como se describe en la presente memoria (por ejemplo, SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 11) incluye realizaciones que tienen más de 24 aminoácidos de longitud, por ejemplo, un péptido que tiene 25, 26, 28, 30, 32, 35 ó 40 aminoácidos de longitud. Un experto en la materia también entiende que los polipéptidos de la invención también pueden estar unidos, por ejemplo, mediante una prolina u otros restos enlazadores, a otro péptido α -helicoidal anfipático que puede estimular el flujo de salida de colesterol para formar polipéptidos más largos, por ejemplo, de 50, 60, 70, 80, 90 ó 100 aminoácidos de longitud. Por consiguiente, una secuencia de cualquiera de las SEC ID N°: 1-15 puede tener adiciones de aminoácidos o puede estar unida. Por ejemplo, una molécula de un polipéptido de la invención, por ejemplo, la SEC ID N°: 4, 5, 6 ó 7, puede unirse a otra molécula del polipéptido a través de un resto de prolina para proporcionar un polipéptido que tiene 53 aminoácidos de longitud. De forma similar, dos de 24 aminoácidos, por ejemplo, cualquiera de las SEC ID N°: 1, 11 ó 12-15, pueden unirse con otra de 24 aminoácidos o con una de 26 aminoácidos, por ejemplo, usando prolina, dando como resultado de este modo un polipéptido que tenga 49-53 restos de longitud. Dicho polipéptido puede tener una actividad de flujo de salida de colesterol que supere la de las apolipoproteínas de longitud completa nativas (por ejemplo, Apo AI y Apo E), o la del dominio de mediación del flujo de salida de colesterol de la apolipoproteína. Usando las metodologías descritas en la presente memoria, un experto en la materia puede añadir fácilmente aminoácidos adicionales al extremo C-terminal y/o N-terminal y después explorar los polipéptidos resultantes para la actividad deseada.

35 En vista de lo anterior, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:

$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}$ (SEC ID N°: 11)

40 en la que: X_1 , X_7 , X_8 , X_{15} , X_{18} y X_{19} son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en E y D; X_2 , X_6 , X_9 , X_{10} , X_{12} , X_{13} , X_{16} , X_{17} , X_{20} , X_{21} y X_{24} son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en A, V, L, I, F, W, M y P; X_3 , X_5 , X_{14} y X_{23} son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en R, K, A, V, L, I, F, W, M, P, G, S, T, C, Y, N y Q, en la que al menos dos de X_3 , X_5 , X_{14} y X_{23} son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en R y K; y X_4 , X_{11} y X_{22} son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en S, T, G, A y Y; en la que cuando está presente una prolina, está presente en una sola posición, y en la que cada letra representa el código de aminoácido de una letra convencional. Los polipéptidos de la SEC ID N°: 11 tienen actividad de flujo de salida de colesterol, actividad de estabilización de ABCA1, actividad antioxidante, así como actividad antiinflamatoria.

50 En ciertas realizaciones del polipéptido de la SEC ID N°: 11, X_2 , X_6 , X_9 , X_{10} , X_{12} , X_{13} , X_{16} , X_{17} , X_{20} , X_{21} y X_{24} son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en A, V, L, F y W y, preferentemente, son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en A, L, F y W. En otras realizaciones del polipéptido de la SEC ID N°: 11, al menos tres de X_3 , X_4 , X_{14} y X_{23} son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en R y K. En ciertas otras realizaciones, X_3 , X_5 , X_{14} y X_{23} son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en R, K, L y F, en las que al menos dos de X_3 , X_5 , X_{14} y X_{23} son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en R y K. En otras realizaciones más, X_4 , X_{11} y X_{22} son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en S, A e Y y, preferentemente, X_4 , X_{11} y X_{22} son cada uno A.

60 En otro aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:

$X_1X_2X_3SX_5X_6X_7X_8X_9X_{10}AAX_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}LAX_{23}X_{24}$ (SEC ID N°: 1)

65 en la que: X_1 , X_7 , X_8 , X_{15} , X_{18} y X_{19} son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en E y D; X_2 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F, V, L y W; X_3 , X_5 , X_{14} y X_{23} son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en R y K; X_6 , X_9 , X_{10} , X_{13} , X_{16} , X_{20} y X_{24} son aminoácidos

seleccionados independientemente del grupo que consiste en L, F y W; y X₁₇ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F, A, L y W; y en la que cada letra representa el código de aminoácido de una letra convencional. Los polipéptidos de la SEC ID N°: 1 tienen actividad de flujo de salida de colesterol, actividad de estabilización de ABCA1, actividad antioxidante, así como actividad antiinflamatoria.

En una realización particularmente preferida, los polipéptidos de la presente invención comprenden uno o más D-aminoácidos, como se describen en la presente memoria. En ciertas realizaciones, cada aminoácido (por ejemplo, cada aminoácido enantiomérico) es un D-aminoácido. Se ha descubierto que los polipéptidos que comprenden todo D-aminoácidos estimulan el flujo de salida de colesterol con gran capacidad y alta afinidad, como los polipéptidos de L-aminoácidos. Los D-aminoácidos se incorporan fácilmente en una o más posiciones en el polipéptido usando simplemente un resto aminoacídico derivatizado de forma D en la síntesis química. Los restos de forma D para la síntesis de polipéptidos en fase sólida están disponibles en el mercado de varios proveedores (véase, por ejemplo, Advanced Chem Tech, Louisville, KY; Nova Biochem, San Diego, CA; Sigma, St Louis, MO; Bachem California Inc., Torrance, CA, etc.). Los aminoácidos de forma D pueden incorporarse en cualquier posición en el polipéptido según se desee. Por lo tanto, por ejemplo, en una realización, el polipéptido puede comprender un solo D-aminoácido, mientras que en otras realizaciones, el polipéptido comprende al menos dos, generalmente al menos tres, más generalmente al menos cuatro, más generalmente al menos cinco, preferentemente al menos seis, más preferentemente al menos siete y, más preferentemente, al menos ocho D-aminoácidos. En una realización, esencialmente un aminoácido (enantiomérico) sí y otro no es un aminoácido de forma D. En ciertas realizaciones, al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95% de los aminoácidos enantioméricos son aminoácidos de forma D. En una realización particularmente preferida, esencialmente cada aminoácido enantiomérico es un aminoácido de forma D.

En otra realización más, se proporcionan peptidomiméticos de los polipéptidos de la presente invención. Un "peptidomimético" incluye cualquier forma modificada de una cadena aminoacídica, incluyendo, pero sin limitación, fosforilación, protección terminal, modificaciones de ácidos grasos, e incluyendo estructuras de cadena principal y/o cadena lateral no naturales. Será fácilmente evidente para los expertos en la materia que un peptidomimético comprende la continuación estructural entre una cadena de aminoácidos y una molécula pequeña no peptídica. Los peptidomiméticos conservan generalmente una estructura unitaria polimérica de tipo polipéptido reconocible. Por lo tanto, un peptidomimético conserva típicamente la función de unión a cualquier molécula diana a la que se une un polipéptido natural. Se describen ejemplos de peptidomiméticos adecuados en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2006/0069030. Los expertos en la materia conocerán otros peptidomiméticos y métodos de generación de los mismos.

En realizaciones preferidas, los peptidomiméticos de la presente invención se incluyen en una de dos categorías: (i) sustitutos; y (ii) análogos. Se han desarrollado numerosos sustitutos para el enlace amida de los polipéptidos. Los sustitutos aprovechados frecuentemente para el enlace amida incluyen, pero sin limitación, los grupos siguientes: (i) transolefinas, (ii) fluoroalqueno, (iii) metilenamino, (iv) fosfonamidas y (v) sulfonamidas. Se describen ejemplos de dichos sustitutos en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2006/0069030. Además, pueden usarse peptidomiméticos basados en modificaciones más sustanciales de la cadena principal de un polipéptido. Los peptidomiméticos que se engloban en esta categoría incluyen (i) análogos retro-inversos y (ii) análogos de N-alquil glicina (denominados peptoides). De nuevo, se describen ejemplos de dichos análogos en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2006/0069030.

En una realización de la presente invención, el péptido o peptidomimético es un análogo retro-inverso. Pueden generarse análogos retro-inversos de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica de una forma similar a sintetizar polipéptidos basados en L-aminoácidos. Más específicamente, se describen ejemplos de métodos adecuados para preparar dichos análogos retro-inversos en la Patente de Estados Unidos N° 4.522.752, que se expidió a Sisto *et al.* El producto final, o intermedios del mismo, pueden purificarse por HPLC o cualquier otro método cromatográfico adecuado conocido por los expertos en la materia.

En otra realización, el péptido o peptidomimético es un análogo retro-enantio. Los análogos retro-enantio pueden sintetizarse a partir de D-aminoácidos disponibles en el mercado (o análogos de los mismos) usando técnicas de síntesis de polipéptidos en fase sólida o en solución convencionales.

En otra realización más, el peptidomimético es un análogo o derivado de trans-olefina. Dichos análogos de trans-olefina de un polipéptido pueden sintetizarse fácilmente de acuerdo con el método de Shue *et al.*, Tetrahedron Lett., 28: 3225 (1987). Además, también pueden usarse otros métodos conocidos en la técnica. Se apreciará que pueden ser necesarias variaciones en el procedimiento de Sjøe *et al.*, u otros procedimientos disponibles, dependiendo de la naturaleza de los reactivos usados en la síntesis del derivado de trans-olefina.

También es posible acoplar los pseudodipéptidos sintetizados mediante el método anterior con otros pseudodipéptidos, para generar pseudopéptidos con varias funcionalidades olefinicas en lugar de funcionalidades amida. Por ejemplo, pueden generarse pseudodipéptidos correspondientes a ciertas secuencias dipeptídicas y después acoplarse entre sí mediante técnicas convencionales para dar un análogo del polipéptido que tenga enlaces olefinicos alternos entre restos.

Otra clase más de derivados peptidomiméticos incluye derivados de fosfonato. La síntesis de dichos derivados de fosfonato puede adaptarse a partir de esquemas de síntesis conocidos (véase, por ejemplo, Loots et al. en "Peptides: Chemistry and Biology", (Escom Science Publishers, Leiden, pág. 118, 1988); Petrillo et al. en "Peptides: Structure and Function (Proceedings of the 9th American Peptide Symposium)", (Pierce Chemical Co. Rockland, Ill., 1985).

En otras realizaciones, la modificación puede ser la introducción de restos carbohidrato o lipídicos. Dichas modificaciones pueden cambiar la solubilidad de los polipéptidos en diversos medios de modo que puedan prepararse ventajosamente como una composición farmacéutica adecuada. Los grupos lipídicos modificadores incluyen, pero sin limitación, grupos farnesilo y miristoilo. Los grupos carbohidrato modificadores incluyen, pero sin limitación, azúcares sencillos u oligosacáridos de cualquier azúcar de origen natural y/o sintético y alcoholes de azúcares incluyendo, por ejemplo, glucosa, galactosa, ramnosa, manosa, arabinosa y otros azúcares y sus alcoholes respectivos.

En ciertas realizaciones, los peptidomiméticos de la invención pueden comprender además modificaciones análogas a las modificaciones post-traduccionales. Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Como resultado, los peptidomiméticos modificados pueden contener elementos no aminoácidos, tales como polietilenglicoles, lípidos, poli- o monosacáridos y fosfatos. Los efectos de dichos elementos no aminoácidos sobre la funcionalidad de un peptidomimético pueden ensayarse usando los métodos de ensayo descritos en la presente memoria.

Por lo tanto, en una realización preferida, los peptidomiméticos de la presente invención tienen una conformación tridimensional que es sustancialmente similar a la de un polipéptido de SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2-5 ó SEC ID N°: 6-7. En realizaciones particulares, los peptidomiméticos incluyen al menos un enlace de cadena principal que no es un enlace amida en la dirección de amino a carboxi, tal como un polipéptido retro-inverso respecto a un polipéptido de origen natural, o al menos un enlace de cadena principal que no es un enlace amida.

Los polipéptidos, así como los peptidomiméticos de la presente invención, incluyendo, por ejemplo, los peptidomiméticos retro-inversos, pueden modificarse de modo que los grupos R en los aminoácidos constituyentes y/o los aminoácidos terminales se bloqueen, es decir, se protejan mediante un grupo protector. Se ha descubierto que el bloqueo, particularmente del extremo amino y/o carboxi terminal, mejora enormemente la administración oral y aumenta significativamente la semivida en suero. Como se usa en la presente memoria, la expresión "grupo protector" se refiere a un sustituyente temporal que protege a un grupo funcional potencialmente reactivo de transformaciones químicas no deseadas. Los ejemplos de dichos grupos protectores incluyen generalmente ésteres de ácidos carboxílicos, éteres de sililo de alcoholes y acetales y cetales de aldehídos y cetonas, respectivamente. El campo de la química de grupos protectores se ha revisado (Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2ª ed.; Wiley: Nueva York, 1991).

Un amplio número de grupos protectores son adecuados para este fin. Dichos grupos incluyen, pero sin limitación, acetilo, $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-}$, amida, Fmoc, t-butoxicarbonilo (t-BOC), grupo 9-fluorenoacetilo, grupo 1-fluorenocarboxílico, grupo 9-fluorenocarboxílico, grupo 9-fluorenona-1-carboxílico, benciloxycarbonilo, xantilo (Xan), tritilo (Trt), 4-metiltritilo (Mtt), 4-metoxitritilo (Mmt), 4-metoxi-2,3,6-trimetil-bencenosulfonilo (Mtr), mesitilen-2-sulfonilo (Mts), 4,4-dimetoxibenzhidrido (Mbh), tosilo (Tos), 2,2,5,7,8-pentametil croman-6-sulfonilo (Pmc), 4-metilbencilo (MeBzl), 4-metoxibencilo (MeOBzl), benciloxi (BzIO), bencilo (Bzl), benzoílo (Bz), 3-nitro-2-piridinossulfonilo (Npys), 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)etilo (Dde), 2,6-diclorobencilo (2,6-DiCl-Bzl), 2-clorobenciloxycarbonilo (2-Cl-Z), 2-bromobenciloxycarbonilo (2-Br-Z), benciloximetilo (Bom), ciclohexiloxi (cHxO), t-butoximetilo (Bum), t-butoxi (tBuO), t-butilo (tBu) y trifluoroacetilo (TFA). La variable "n" es un número entero de 0 a 12, típicamente de 0 a 6, tal como de 0 a 4. Se describen otros grupos protectores adecuados en la Patente de Estados Unidos N° 6.933.279.

En una realización, los grupos protectores preferidos incluyen, pero sin limitación, acetilo, amida y grupos alquilo, prefiriéndose particularmente los grupos acetilo y alquilo para la protección N-terminal, y prefiriéndose particularmente los grupos amida para la protección carboxilo terminal. En una realización preferida, se usa un grupo acetilo para proteger el extremo amino terminal y se usa un grupo amida para proteger el extremo carboxilo terminal. En esta realización, la acetilación puede efectuarse durante la síntesis cuando el polipéptido está en la resina usando anhídrido acético. La protección de amida puede conseguirse por selección de una resina apropiada para la síntesis. Por ejemplo, puede usarse una resina de amida de anillo. Después de completarse la síntesis, los grupos protectores semipermanentes en aminoácidos bifuncionales ácidos, tales como Asp y Glu, y aminoácidos básicos, tales como Lys, así como el hidroxilo de Tyr, se eliminan todos simultáneamente. Los polipéptidos liberados de dicha resina usando un tratamiento ácido salen con el N-terminal protegido como acetilo y el C-terminal protegido como NH_2 , con la eliminación simultánea de todos los demás grupos protectores.

A. Síntesis química

Los polipéptidos pueden sintetizarse químicamente usando métodos bien conocidos en la técnica incluyendo, por ejemplo, síntesis en fase sólida (véase, por ejemplo, Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963) y Abelson et al., *Methods in Enzymology*, Volumen 289: Solid-Phase Peptide Synthesis (1ª ed. 1997)). La síntesis de

polipéptidos puede realizarse usando técnicas manuales o por automatización. La síntesis automática puede conseguirse, por ejemplo, usando el sintetizador de péptidos Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer). Como alternativa, diversos fragmentos del polipéptido pueden sintetizarse químicamente por separado y después combinarse usando métodos químicos para producir el polipéptido de longitud completa. La secuencia y la masa de los polipéptidos pueden verificarse por espectroscopía de masas GC. Una vez sintetizados, los polipéptidos pueden modificarse, por ejemplo, mediante grupos acetilo N-terminales y amida C-terminales, como se ha descrito anteriormente. Los polipéptidos sintetizados pueden aislarse adicionalmente por HPLC hasta una pureza de al menos aproximadamente el 80%, preferentemente del 90% y, más preferentemente, del 95%.

B. Expresión recombinante

Los polipéptidos descritos en la presente memoria también pueden expresarse de forma recombinante, especialmente cuando los polipéptidos no comprenden restos de "D" aminoácidos. Esta realización depende de técnicas de rutina en el campo de la genética recombinante. Generalmente, la nomenclatura y los procedimientos de laboratorio en la tecnología de ADN recombinante descritos en la presente memoria son los bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica. Se usan técnicas convencionales para clonación, aislamiento de ADN y ARN, amplificación y purificación. En general, las reacciones enzimáticas que implican ADN ligasa, ADN polimerasa, endonucleasas de restricción y similares se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Los textos básicos que describen los métodos generales de uso en esta invención incluyen Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3ª ed. 2001); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); y *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., 1994)).

La reacción en cadena de la polimerasa u otros métodos de amplificación *in vitro* también pueden ser útiles, por ejemplo, para clonar secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos a expresar, para generar ácidos nucleicos para usar como sondas para detectar la presencia de ARNm codificante en muestras fisiológicas, para secuenciación de ácidos nucleicos o para otros fines. Los ácidos nucleicos amplificados mediante la reacción de PCR pueden purificarse a partir de geles de agarosa y clonarse en un vector apropiado.

La expresión génica de una secuencia de la invención también puede analizarse por técnicas conocidas en la materia, por ejemplo, transfección inversa y amplificación de ARNm, aislamiento de ARN total o ARN poli A+, transferencia de northern, transferencia puntual, hibridación *in situ*, protección de ARNasa, sondaje de matrices de microplacas de ADN y similares.

Para obtener un alto nivel de expresión de una secuencia de ácido nucleico, tal como las secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido de esta invención, típicamente se subclona una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia polipeptídica de la invención en un vector de expresión que posteriormente se transfecta en una célula hospedadora adecuada. El vector de expresión contiene típicamente un promotor fuerte o un promotor/potenciador para dirigir la transcripción, un terminador de la transcripción/traducción, y para un ácido nucleico que codifica una proteína, un sitio de unión al ribosoma para el inicio de la traducción. El promotor está unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención o una subsecuencia de la misma. Son bien conocidos en la técnica promotores bacterianos adecuados y se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.* y Ausubel *et al.* Los elementos que se incluyen típicamente en los vectores de expresión también incluyen un replicón que funciona en *E. coli*, un gen que codifica resistencia a antibiótico para permitir la selección de bacterias que alberguen plásmidos recombinantes, y sitios de restricción únicos en regiones no esenciales del plásmido para permitir la inserción de secuencias eucariotas. El gen de resistencia a antibióticos particular seleccionado no es crítico, son adecuados cualquiera de los muchos genes de resistencia conocidos en la técnica.

El vector de expresión particular usado para transportar la información genética al interior de la célula no es particularmente crítico. Puede usarse cualquiera de los vectores convencionales usados para la expresión en células eucariotas o procariotas. Los vectores de expresión bacterianos convencionales incluyen plásmidos tales como plásmidos basados en pBR322, pSKF, pET23D y sistemas de expresión de fusión tales como GST y LacZ. También pueden añadirse etiquetas epitópicas a los polipéptidos recombinantes para proporcionar métodos convenientes de aislamiento, por ejemplo, etiquetas de His. En algún caso, se añaden secuencias de escisión enzimáticas (por ejemplo, Met-(His)g-Ile-Glu-Gly-Arg que forman el sitio de escisión del Factor Xa) a los polipéptidos recombinantes. Están disponibles sistemas de expresión bacterianos para expresar los polipéptidos en, por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus sp.* y *Salmonella* (Palva et al., *Gene* 22: 229-235 (1983); Mosbach et al., *Nature* 302: 543-545 (1983). Están disponibles en el mercado kits para dichos sistemas de expresión. Los sistemas de expresión eucariotas para células de mamífero, levaduras y células de insecto son bien conocidos en la técnica y también están disponibles en el mercado.

Se usan métodos de transfección convencionales para producir líneas celulares que expresen grandes cantidades de polipéptidos de la invención, que después se purifican usando técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Colley et al., *J. Biol. Chem.*, 264: 17619-17622 (1989); *Guide to Protein Purification*, en *Methods in Enzymology*, vol. 182 (Deutscher, ed., 1990)). La transformación de células se realiza de acuerdo con técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Morrison, *J. Bact.*, 132: 349-351 (1977); Clark-Curtiss y Curtiss, *Methods in Enzymology*, 101: 347-362 (Wu et al., eds, 1983). Por ejemplo, puede usarse cualquiera de los procedimientos bien conocidos para

introducir secuencias de nucleótidos extrañas en células hospedadoras. Estos incluyen el uso de transfección con fosfato de calcio, polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, liposomas, microinyección, vectores plasmáticos, vectores virales y cualquiera de los otros métodos bien conocidos para introducir ADN genómico, ADNc, ADN sintético u otro material genético extraño clonado en una célula hospedadora (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, anteriormente). Sólo es necesario que el procedimiento de ingeniería genética particular usado sea capaz de introducir con éxito al menos un gen en la célula hospedadora capaz de expresar un polipéptido de la invención.

Después de introducirse el vector de expresión en las células, las células transfectadas se cultivan en condiciones que favorecen la expresión de un polipéptido de la invención. Los polipéptidos de la invención se recuperan del cultivo usando técnicas convencionales identificadas a continuación.

C. Purificación de polipéptidos

Los polipéptidos se purifican hasta una pureza sustancial mediante técnicas convencionales conocidas en la materia, incluyendo, por ejemplo, extracción y purificación a partir de cuerpos de inclusión, filtración diferencial por tamaño, fraccionamiento por solubilidad (es decir, precipitación selectiva con sustancias tales como sulfato de amonio); cromatografía en columna, métodos de inmunopurificación y otros (véase, por ejemplo, Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice* (1982); Patente de Estados Unidos Nº 4.673.641 ; Ausubel *et al.*, anteriormente; y Sambrook *et al.*, anteriormente).

Pueden emplearse varios procedimientos cuando se están purificando polipéptidos. Por ejemplo, los polipéptidos que tienen propiedades de adhesión molecular establecidas pueden fusionarse de forma reversible con polipéptidos recombinantes. Con el ligando apropiado, los polipéptidos recombinantes pueden adsorberse selectivamente a una columna de purificación y después liberarse de la columna en una forma relativamente pura. El polipéptido fusionado se elimina después por actividad enzimática. Por último, los polipéptidos pueden purificarse usando columnas de inmunoafinidad.

IV. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE POLIPÉPTIDOS CON LA ACTIVIDAD DESEADA

Los polipéptidos o peptidomiméticos de la presente invención pueden explorarse fácilmente por su capacidad para mediar el flujo de salida de colesterol y/o estabilizar ABCA (por ejemplo, ABCA1) usando métodos bien conocidos por los expertos en la materia.

Pueden utilizarse varios protocolos de exploración diferentes para identificar polipéptidos o peptidomiméticos de la presente invención que medien el flujo de salida de colesterol y/o estabilicen ABCA (por ejemplo, ABCA1). En una realización, los métodos de exploración implican explorar una pluralidad de polipéptidos de ensayo para identificar aquellos polipéptidos que medien el flujo de salida de colesterol y/o estabilizan ABCA (por ejemplo, ABCA1) en, por ejemplo, células de mamífero, incluyendo células humanas.

Además de explorarlos por su capacidad para mediar el flujo de salida de colesterol y/o estabilizar ABCA, los polipéptidos de ensayo candidatos también pueden explorarse para otras actividades incluyendo, por ejemplo, actividades antioxidantes y actividades antiinflamatorias. Pueden utilizarse varios protocolos de exploración diferentes para identificar polipéptidos o peptidomiméticos de la presente invención que tengan actividad antioxidante y/o actividad antiinflamatoria.

Será fácilmente evidente para los expertos en la materia que pueden usarse numerosos otros ensayos de exploración, además de los descritos en la presente memoria, para explorar los polipéptidos o peptidomiméticos de la presente invención para las actividades biológicas deseadas.

A. Exploración para actividad de flujo de salida de colesterol

Se describen ensayos de flujo de salida de colesterol adecuados en, por ejemplo, Bielicki, J. K y Oda, M. N., *Biochemistry*, 41: 2089-2096 (2002); Jia *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Common.*, 297: 206-213 (2002). En algunas realizaciones, se usa un polipéptido que se sabe que media el flujo de salida de colesterol (por ejemplo, hélice 9/10 de Apo A-I) para explorar para mediadores adicionales del flujo de salida de colesterol en un ensayo basado en células. Por ejemplo, las líneas celulares en las que puede aumentarse el flujo de salida de colesterol usando un análogo de AMPc que regule positivamente la expresión de proteína ABCA1 (por ejemplo, macrófagos J774) pueden usarse convenientemente para evaluar la capacidad de un polipéptido de la presente invención para mediar el flujo de salida de colesterol. Las células se incuban con colesterol marcado (por ejemplo, [³H]colesterol) en condiciones apropiadas para la captación de colesterol por las células. Por lo tanto, se incuban AMPc o análogos de AMPc (por ejemplo, CPT-AMPc) con las células durante un tiempo adecuado antes del inicio del flujo de salida de colesterol celular, es decir, antes de poner en contacto las células con un polipéptido de ensayo. La medición del colesterol marcado que aparece en el medio se usa para determinar la actividad de mediación del flujo de salida de colesterol del polipéptido de ensayo.

B. Exploración para actividad de estabilización de ABCA

Pueden usarse múltiples ensayos conocidos en la técnica para medir la actividad de estabilización de ABCA de un polipéptido de la invención. Por ejemplo, pueden usarse ensayos de unión para ensayar la capacidad del polipéptido de ensayo para unirse a ABCA (por ejemplo, ABCA1). Se ha descubierto que los polipéptidos que tienen actividad de estabilización de ABCA también son mediadores probables del flujo de salida de colesterol. Como tales, en una realización preferida, los polipéptidos o peptidomiméticos de la presente invención tienen la capacidad de mediar el flujo de salida de colesterol y estabilizar ABCA. En una realización de exploración, los ensayos de unión pueden ser ensayos competitivos. Otros ensayos incluyen, por ejemplo, la medición directa de ABCA (por ejemplo, proteína o ácidos nucleicos de ABCA) después del contacto con el polipéptido de ensayo.

1. Ensayos de unión

Los ensayos de unión implican habitualmente poner en contacto ABCA con uno o más polipéptidos de ensayo, y dejar un tiempo suficiente para que el ABCA y los polipéptidos de ensayo formen un complejo de unión. Cualquier complejo de unión formado puede detectarse usando cualquiera de varias técnicas analíticas establecidas. Los ensayos de unión a proteína incluyen, pero sin limitación, ensayos de unión inmunohistoquímicos, citometría de flujo u otros ensayos. En algunas realizaciones, se usan ensayos de competición para determinar si un polipéptido de ensayo tiene actividad de estabilización de ABCA. Son bien conocidos en la técnica ensayos de competición. Típicamente, un compuesto competidor, es decir, un compuesto que se sabe que se une a ABCA, se marca de modo que puedan medirse diferencias en la unión a ABCA (por ejemplo, en presencia de una cantidad creciente de un polipéptido de ensayo de la invención que pueda unirse a ABCA). El marcador o grupo detectable particular usado en el ensayo no es un aspecto crítico de la invención, siempre que no interfiera significativamente con la unión del compuesto de ensayo a ABCA. Como se describe en la presente memoria, el grupo detectable (o, como alternativa, resto o marcador detectable) puede ser cualquier material que tenga una propiedad física o química detectable. Dichos marcadores detectables se han desarrollado bien en el campo de los inmunoensayos y, en general, puede aplicarse en la presente invención casi cualquier marcador útil en dichos métodos. Por lo tanto, un marcador es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunológicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los marcadores útiles en la presente invención incluyen, pero sin limitación, perlas magnéticas (por ejemplo, DYNABEADSTM), colorantes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina y similares), radiomarcadores (por ejemplo, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C o ^{32}P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras usadas comúnmente en un ELISA) y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal o vidrio coloreado o perlas de plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

En algunas realizaciones, se usan células que expresan y no expresan ABCA para medir la actividad de estabilización de ABCA (por ejemplo, ABCA1) de un polipéptido de ensayo por medición de las afinidades de unión a ABCA relativas del polipéptido de ensayo y un compuesto competidor (por ejemplo, Apo A-I A de longitud completa o polipéptido 9/10 de Apo A-I) por ABCA. En algunas realizaciones, la afinidad de unión de Apo A-I A de longitud completa a ABCA se compara con la afinidad de unión de un polipéptido marcado de la invención como se describe en, por ejemplo, Remaley et al., *J. Lipid Res.*, 44: 828-836 (2003). Las células que expresan ABCA se incuban en presencia y ausencia del compuesto competidor y, después, se exponen a un intervalo de concentraciones de polipéptidos de ensayo marcados individuales (por ejemplo, un polipéptido radiomarcado de la invención). Típicamente, las concentraciones de polipéptidos de ensayo variarán de aproximadamente 0,1 $\mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 200 $\mu\text{g/ml}$, de aproximadamente 0,5 $\mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 100 $\mu\text{g/ml}$, de aproximadamente 1 $\mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 40 $\mu\text{g/ml}$ o de aproximadamente 5 $\mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 20 $\mu\text{g/ml}$.

2. Medición directa de ABCA

En algunas realizaciones, la estabilización de ABCA se mide por medición directa de ABCA (por ejemplo, proteína o ácido nucleico de ABCA) usando un ensayo basado en células. Los ensayos basados en células pueden realizarse en cualquier célula en la que se exprese ABCA (por ejemplo, macrófagos J774), incluyendo células que se hayan transfectado con ABCA (por ejemplo, células HeLa). Puede usarse cualquier tipo celular. Por ejemplo, pueden usarse macrófagos J774 para evaluar los niveles de proteína ABCA1 relativos en presencia y ausencia de polipéptidos de la invención. Las células se ponen en contacto primero con un compuesto que inducirá ABCA (por ejemplo, AMPc o un análogo de AMPc, tal como, 8-bromo-AMPc) para resultar positivamente la expresión de ABCA (por ejemplo, ABCA1), después se exponen a niveles de proteína ABCA1 sintética en presencia y ausencia de los polipéptidos de la invención en ausencia del estímulo de AMPc para evaluar si la proteína ABCA1 estaba estabilizada o se degradaba. Los niveles relativos de proteína ABCA1 pueden evaluarse usando cualquier medio conocido en la técnica incluyendo, por ejemplo, análisis de inmunotransferencia de membranas celulares (Oram et al., *J. Biol. Chem.*, 278: 52379-52385 (2003)) o hibridación de sondas de ácido nucleico con ARNm de ABCA.

C. Exploración para actividad antioxidante

Los polipéptidos o peptidomiméticos de la invención pueden explorarse para determinar su actividad antioxidante usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la Publicación de Patente de Estados Unidos N°

2003/0087819 describe múltiples ensayos que pueden usarse para determinar la actividad antioxidante de un polipéptido, incluyendo, por ejemplo, ensayos de sustrato de micelas. Se usa un sustrato de micelas que comprende fosfolípidos (por ejemplo, 1-palmitoil-2-linoleoilfosfatidilcolina) para medir los índices de peroxidación de lípidos catalizada por enzimas específicas (por ejemplo, lipooxigenasa de soja y/o xantina/xantina oxidasa). Las enzimas inician la peroxidación de lípidos después de la adición de polipéptidos recombinantes de la invención a la micela de fosfolípidos. Se controlan los aumentos en los dienos conjugados (un producto de la peroxidación de lípidos) por espectroscopía de absorción ultravioleta (234 nm) a 25°C. La masa de los hidroperóxidos de fosfolípidos se calcula usando el coeficiente de absorción molar ($\epsilon = 29.500 \text{ Lcm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) de los dienos conjugados. Los índices iniciales de peroxidación de lípidos mediada por lipooxigenasa se calculan a partir de las pendientes de la porción lineal de las curvas de oxidación, y los resultados pueden expresarse como nanomoles de peróxido de fosfolípido formado/min. Basándose en los niveles máximos de acumulación de peróxido de lípido obtenidos en ausencia de polipéptido (es decir, la meseta asociada con las curvas de oxidación) es posible obtener información cuantitativa respecto a la potencia de los polipéptidos de la invención (por ejemplo, una concentración de polipéptidos que da como resultado una protección del 50% frente a la peroxidación de lípidos). Otros métodos se refieren a la exploración para determinar la capacidad de los polipéptidos para prevenir la oxidación de lipoproteína ApoB como LDL, VLDL y Lp(A).

Se describen otros ensayos para explorar la actividad antioxidante en la Publicación PCT N° WO 02/15923.

D. Exploración para actividad antiinflamatoria

Los polipéptidos o peptidomiméticos de la invención pueden explorarse para determinar su actividad antiinflamatoria usando cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse ensayos para evaluar la actividad de enzimas (por ejemplo, lecitina:colesterol acetiltransferasa (LCAT) o paraoxonasa (PON)) sensibles a acontecimientos inflamatorios para evaluar la actividad antiinflamatoria de los polipéptidos de las invenciones. Se describen ensayos adecuados en, por ejemplo, Chen et al., J. Lipid Res., 23: 680-691 (1982), que describe la cuantificación de la actividad de LCAT usando un sustrato de proteoliposoma exógeno y Forte et al., J. Lipid Res., 43: 477-485 (2002), que describe la cuantificación de la actividad de PON. Otras exploraciones pueden incluir el control de la capacidad de los polipéptidos para inhibir la expresión de ARN y/o la producción de proteína de células diana después de diversas estimulaciones (por ejemplo, moléculas de adhesión, TNF- α , LPS o combinaciones de los mismos).

E. Ensayo adicional

Los polipéptidos que se identificó inicialmente que mediaban el flujo de salida de colesterol o interactuaban con ABCA pueden ensayarse adicionalmente para validar su capacidad para mediar el flujo de salida de colesterol y/o estabilizar ABCA. El formato básico de dichos métodos implica administrar un compuesto candidato identificado durante una exploración inicial a un animal que sirve como modelo. Los modelos animales utilizados en estudios de validación generalmente son mamíferos de cualquier clase. Los ejemplos específicos de animales adecuados incluyen, pero sin limitación, primates (por ejemplo, chimpancés, monos y similares) y roedores (por ejemplo, ratones, ratas, cobayas, conejos y similares). En una realización preferida, se usan ratones Apo E-/-, Apo A-II -/- o Apo C-III -/-. Se describen modelos animales adicionales en, por ejemplo, Marschang et al., Sem. Cell Dev. Biol., 14: 25-35 (2003).

F. Exploración de alto rendimiento

En una realización, se usan métodos de exploración de alto rendimiento (HTS) para identificar polipéptidos o peptidomiméticos de la presente invención que median el flujo de salida de colesterol y/o estabilizan ABCA. Los métodos de HTS implican proporcionar una biblioteca de polipéptidos combinatoria que contiene un gran número de compuestos terapéuticos potenciales (es decir, polipéptidos o peptidomiméticos que median el flujo de salida de colesterol o estabilizan ABCA). Dichas "bibliotecas" se exploran después en uno o más ensayos, como se describe en la presente memoria, para identificar esos miembros de biblioteca (es decir, polipéptidos o peptidomiméticos particulares) que presentan una actividad característica deseada. Los compuestos así identificados pueden servir como "compuestos candidatos" convencionales o que pueden usarse de por sí como agentes terapéuticos potenciales o reales.

Una biblioteca de polipéptidos combinatoria es una colección de diversos polipéptidos generados por síntesis química o síntesis biológica, por combinación de varios "componentes básicos" químicos, es decir, aminoácidos. Más particularmente, una biblioteca de polipéptidos combinatoria lineal se forma por combinación de un conjunto de componentes básicos químicos (aminoácidos) de cada forma posible para una longitud de compuesto dada (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto polipeptídico). Pueden sintetizarse millones de compuestos polipeptídicos a través de dicha mezcla combinatoria de componentes básicos químicos. En una realización preferida, se generan variantes conservativas de los polipéptidos de las SEC ID N°: 1-11 y se exploran para determinar las actividades biológicas deseadas (por ejemplo, actividad de flujo de salida de colesterol) de una forma de alto rendimiento.

Los expertos en la materia conocen dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatorias y están disponibles en el mercado de varias fuentes diferentes (véase, por ejemplo, ECIS TM, Applied BioPhysics Inc., Troy, NY, MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA).

5

V. MÉTODOS DE USO

Los polipéptidos de origen no natural de la presente invención usan la potente ruta del transporte inverso de colesterol (RCT) para mediar el flujo de salida de colesterol. Además de ser mediadores potentes y selectivos del flujo de salida de colesterol dependiente de ABCA1, los polipéptidos de la presente invención también tienen actividad de estabilización de ABCA, actividad antioxidante, así como actividad antiinflamatoria, cualquier combinación de estas actividades y, preferentemente, todas estas actividades.

En vista de sus actividades biológicas y, en particular, su capacidad para mediar el flujo de salida de colesterol, los polipéptidos de la presente invención (o peptidomiméticos de los mismos) pueden usarse para tratar niveles elevados de colesterol en un mamífero, o para tratar profilácticamente a un mamífero en riesgo de desarrollar niveles elevados de colesterol. Además, los polipéptidos o peptidomiméticos también pueden usarse para mejorar los parámetros de lípidos en un mamífero. Una mejora en los "parámetros de lípidos" incluye, por ejemplo, uno o más de una disminución en la tendencia de las lipoproteínas a adherirse a un vaso sanguíneo, una disminución en la cantidad de placa aterosclerótica (aun cuando las concentraciones plasmáticas de LDL y/o HDL pueden no cambiar significativamente), una reducción en el potencial oxidativo de una partícula de HDL o LDL, una regresión en la aterosclerosis (por ejemplo, según se mide por angiografía o ultrasonido de la carótida) y una reducción de los acontecimientos cardíacos. Por lo tanto, los polipéptidos o peptidomiméticos de la presente invención pueden usarse para tratar o prevenir (es decir, tratar profilácticamente) enfermedades y afecciones asociadas con dislipidemia, hipercolesterolemia e inflamación, o enfermedades y afecciones que sean tratables por alteración de los parámetros de lípidos, tales como las enfermedades y afecciones descritas en la presente memoria.

Además de las enfermedades y afecciones descritas específicamente en la presente memoria, los expertos en la materia conocerán otras enfermedades y afecciones asociadas con dislipidemia, hipercolesterolemia e inflamación que pueden tratarse o prevenirse usando los polipéptidos o peptidomiméticos de la presente invención.

A. Tratamiento o prevención de un síntoma o síntomas de aterosclerosis

En una realización, la presente invención se refiere a métodos para tratar, mejorar y/o prevenir uno o más síntomas de aterosclerosis. Los métodos implican preferentemente administrar a un organismo, preferentemente un mamífero y, más preferentemente un ser humano, uno o más de los polipéptidos de esta invención (o peptidomiméticos de dichos polipéptidos). El polipéptido o polipéptidos pueden administrarse, como se describe en la presente memoria, de acuerdo con cualquiera de varios métodos convencionales incluyendo, pero sin limitación, inyección, supositorio, pulverización nasal, implante de liberación prolongada, parche transdérmico, por vía oral y similares. En una realización particularmente preferida, el polipéptido o polipéptidos se administran por vía oral (por ejemplo, como un jarabe, cápsula, comprimido, etc.).

Los métodos de la presente invención no están limitados al tratamiento de humanos o animales no humanos que tengan uno o más síntomas de aterosclerosis (por ejemplo, hipertensión, estrechamiento de los vasos, formación y rotura de placas, ataque cardíaco, angina o ictus, altos niveles de colesterol en plasma, altos niveles de lipoproteínas de baja densidad, altos niveles de lipoproteínas de muy baja densidad o proteínas inflamatorias, etc.), sino que también son muy útiles en un contexto profiláctico. Por lo tanto, los polipéptidos de esta invención (o peptidomiméticos de los mismos) pueden administrarse a un organismo, tal como un ser humano o un animal no humano, para prevenir la aparición, es decir, el desarrollo, de uno o más síntomas de aterosclerosis. Los sujetos candidatos adecuados para el tratamiento profiláctico incluyen, por ejemplo, aquellos sujetos que tienen uno o más factores de riesgo para aterosclerosis (por ejemplo, historial familiar, marcadores genéticos que se correlacionen con aterosclerosis, hipertensión, obesidad, alto consumo de alcohol, tabaquismo, alto nivel de colesterol en sangre, alto nivel de triglicéridos en sangre, nivel elevado de LDL, VLDL, IDL en sangre o bajo nivel de HDL, diabetes o un historial familiar de diabetes, alto nivel de lípidos en sangre, ataque cardíaco, angina o ictus, etc.).

El tratamiento puede complementar u obviar la necesidad de cirugía vascular haciendo que el tratamiento anti-aterosclerosis sea sistémico y sostenible. Por lo tanto, el péptido puede administrarse antes de la intervención para optimizar la circulación antes de la cirugía, durante la cirugía para su administración regional en los vasos sanguíneos o en sus proximidades, o post-cirugía para disminuir la inflamación y la aterosclerosis causada por traumatismos mecánicos por intervención quirúrgica.

B. Tratamiento o prevención de un síntoma o síntomas de aterosclerosis asociados con una respuesta inflamatoria aguda

Los polipéptidos inhibidores de la aterosclerosis de esta invención también son útiles en varios otros contextos. En particular, se ha descubierto que las complicaciones cardiovasculares (por ejemplo, aterosclerosis, ictus, etc.)

acompañan o siguen con frecuencia a la aparición de una respuesta inflamatoria de fase aguda. Dicha respuesta inflamatoria de fase aguda se asocia con frecuencia con una enfermedad inflamatoria recurrente (por ejemplo, lepra, tuberculosis, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, etc.), una infección vírica (por ejemplo, influenza, VIH, etc.), una infección bacteriana, una infección fúngica, un trasplante de órganos, una herida u otro traumatismo, una prótesis implantada, una biopelícula y similares.

En vista de su actividad antioxidante, los polipéptidos descritos en la presente memoria pueden usarse para reducir o prevenir la formación de fosfolípidos oxidados durante o después de una respuesta inflamatoria de fase aguda, mitigando o eliminando de este modo las complicaciones cardiovasculares asociadas con dicha afección.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, esta invención contempla administrar uno o más de los polipéptidos de esta invención a un sujeto en riesgo de, o que incurre en una respuesta inflamatoria de fase aguda y/o en riesgo de o que incurre en un síntoma de aterosclerosis.

Los péptidos de la invención afectan a los lípidos y por lo tanto pueden ser útiles para el tratamiento de patologías en las que los lípidos y el metabolismo de los lípidos desempeñan un papel. Por lo tanto, por ejemplo, a una persona que tenga o esté en riesgo de una enfermedad coronaria se le puede administrar profilácticamente un polipéptido de esta invención durante la estación de la gripe. Un ser humano (u otro animal) sujeto a una afección inflamatoria recurrente, por ejemplo, artritis reumatoide, diversas enfermedades autoinmunes, etc., puede tratarse con un polipéptido de esta invención para mitigar o prevenir el desarrollo de aterosclerosis o ictus. De forma similar, un ser humano (u otro animal) sometido a un traumatismo, por ejemplo, a una lesión aguda, trasplante de tejido, etc., puede tratarse con un polipéptido de esta invención para mitigar o prevenir el desarrollo de aterosclerosis o ictus.

En ciertos casos, dichos métodos implicarán un diagnóstico de la aparición o riesgo de una respuesta inflamatoria aguda. La respuesta inflamatoria aguda implica típicamente alteraciones en el metabolismo y la regulación de genes en el hígado. Es un proceso homeostático dinámico que implica a todos los sistemas principales del cuerpo, además del sistema inmune, cardiovascular y del sistema nervioso central. Normalmente, la respuesta de fase aguda dura sólo unos cuantos días; sin embargo, en casos de inflamación crónica o recurrente, una continuación anormal de algunos aspectos de la respuesta de fase aguda puede contribuir al daño tisular subyacente que acompaña a la enfermedad, y también puede conducir a complicaciones adicionales, por ejemplo, enfermedades cardiovasculares o enfermedades por deposición de proteína tales como amiloidosis.

Un aspecto importante de la respuesta de fase aguda es el perfil biosintético radicalmente alterado del hígado. En circunstancias normales, el hígado sintetiza una variedad característica de proteínas plasmáticas a concentraciones estables. Muchas de estas proteínas tienen funciones importantes y son necesarios mayores niveles plasmáticos de estos reactivos de fase aguda (APR) o proteínas de fase aguda (APP) durante la respuesta de fase aguda después de un estímulo inflamatorio. Aunque la mayoría de los APR se sintetizan por los hepatocitos, algunos se producen por otros tipos celulares, incluyendo monocitos, células endoteliales, fibroblastos y adipocitos. La mayoría de los APR se inducen entre el 50% y varias veces por encima de los niveles normales. Por el contrario, los APR principales pueden aumentar hasta 1000 veces por encima de los niveles normales. Este grupo incluye amiloide A del suero (SAA) y proteína reactiva C (CRP) en seres humanos o su homóloga en ratones, componente amiloide P del suero (SAP). Los denominados APR negativos presentan una concentración disminuida en plasma durante la respuesta de fase aguda para permitir un aumento en la capacidad del hígado para sintetizar los APR inducidos.

En ciertas realizaciones, la respuesta inflamatoria de fase aguda, o el riesgo por lo tanto se evalúa midiendo una o más APP. La medición de dichos marcadores es bien conocida por los expertos en la materia y existen compañías comerciales que proporcionan dicha medición (por ejemplo, AGP medida por Cardiotech Services, Louisville, KY.). Una vez que se ha determinado que una persona está experimentando una respuesta inflamatoria de fase aguda o está en riesgo de experimentar una respuesta inflamatoria de fase aguda, los polipéptidos de la presente invención pueden administrarse para reducir o prevenir la formación de fosfolípidos oxidados durante o después de la respuesta inflamatoria de fase aguda, mitigando o eliminando de este modo las complicaciones cardiovasculares asociadas con dicha afección.

C. Tratamiento o prevención de un síntoma o síntomas o de una afección asociada con calcificación coronaria y osteoporosis

También se ha descubierto que los lípidos oxidados pueden ser una causa de calcificación coronaria y osteoporosis. También se cree que los lípidos oxidados pueden estar implicados en la patogénesis de la estenosis aórtica calcificada.

Por lo tanto, en otra realización, los polipéptidos de la presente invención se usan para tratar, inhibir o prevenir un síntoma de una enfermedad tal como polimialgia reumática, poliarteritis nodosa, esclerodermia, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Alzheimer, SIDA, calcificación coronaria, estenosis aórtica calcificada, osteoporosis y similares. En dichos métodos, los polipéptidos o peptidomiméticos de la presente invención pueden administrarse a un ser humano o animal no humano para reducir o prevenir la formación de fosfolípidos oxidados, inhibiendo o previniendo de este modo un síntoma de una enfermedad tal como polimialgia

reumática, poliarteritis nodosa, esclerodermia, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Alzheimer, SIDA, calcificación coronaria, estenosis aórtica calcificada, osteoporosis y similares.

- 5 Típicamente, todos los métodos anteriores implican la administración de un solo polipéptido de esta invención o, como alternativa, la administración de dos o más polipéptidos diferentes de esta invención. Dichos polipéptidos pueden administrarse en solitario o en combinación con otros agentes terapéuticos, tales como los descritos en la presente memoria. Los polipéptidos pueden proporcionarse como monómeros o en forma dimérica, oligomérica o polimérica. En ciertas realizaciones, las formas multiméricas pueden comprender monómeros asociados (por ejemplo, unidos iónicamente o hidrofóbicamente); mientras que en otras realizaciones, otras formas multiméricas comprenden monómeros unidos covalentemente (unidos directamente o a través de un enlazador).

- Además, aunque todos los métodos anteriores se describen en la presente memoria con respecto a seres humanos, será fácilmente evidente para los expertos en la materia que dichos métodos también son útiles para otros animales, es decir, para uso veterinario. Por lo tanto, los organismos preferidos incluyen, pero sin limitación, seres humanos, primates no humanos, caninos, equinos, felinos, porcinos, ungulados, lagomorfos y similares.

D. Estabilización de placas vulnerables

- 20 Como se explica en la presente memoria, la cardiopatía, especialmente la arteriopatía coronaria, es una causa principal de muerte, discapacidad y gastos de atención sanitaria en los Estados Unidos y otros países industrializados. Hasta recientemente, se consideraba que la mayoría de las cardiopatías eran principalmente el resultado de un aumento progresivo de placas duras en las arterias coronarias. Este proceso patológico aterosclerótico de placas duras conduce a un estrechamiento crítico (estenosis) de la arteria coronaria afectada y produce síndromes de agina, comúnmente conocidos como dolor torácico. La progresión del estrechamiento reduce el flujo sanguíneo, desencadenando la formación de un coágulo sanguíneo (trombo). El coágulo puede cortar el flujo de sangre rica en oxígeno (isquemia) hacia los músculos del corazón causando un ataque al corazón. Como alternativa, el coágulo puede desprenderse y alojarse en el vaso de otro órgano, tal como el cerebro, dando como resultado un ictus trombótico.

- 30 En la última década, sin embargo, han surgido pruebas que cambian en cierta medida el paradigma de la aterosclerosis, la arteriopatía coronaria y los ataques al corazón. Aunque la acumulación de placa dura puede producir angina e isquemia grave en las arterias coronarias, nuevos datos clínicos sugieren que la ruptura de placas vulnerables, que con frecuencia no son oclusivas, de por sí, causa la gran mayoría de los ataques al corazón. El índice se estima tan elevado como del 60-80 por ciento.

- En muchos casos, las placas vulnerables no afectan a la luz del vaso; en su lugar, de forma muy parecida a los abscesos, se incrustan dentro de la pared arterial. La mayoría de las placas vulnerables incluyen una combinación de lípidos, células musculares lisas (endoteliales) y un infiltrado denso de macrófagos/células espumosas rellenas de colesterol contenidas por un tapón fibroso fino. Se cree que la combinación de lípidos se forma como resultado de un proceso patológico que implica lipoproteínas de baja densidad (LDL), macrófagos y el proceso inflamatorio. Los macrófagos oxidan las LDL, produciendo células espumosas.

- Los macrófagos, células espumosas y células endoteliales asociadas liberan diversas sustancias, tales como factor de necrosis tumoral, factor tisular y proteinasas de la matriz, que dan como resultado una necrosis celular generalizada y apoptosis, pro-coagulación y debilitamiento del tapón fibroso. El proceso de inflamación puede debilitar el tapón fibroso hasta el punto de que una agresión mecánica suficiente, tal como la producida por un aumento de la presión arterial, puede dar como resultado una rotura. El núcleo de lípidos y otros contenidos de la placa vulnerable pueden entonces verterse hacia el torrente sanguíneo, iniciando de este modo una cascada de la coagulación. La cascada produce un coágulo sanguíneo que potencialmente da como resultado un ataque cardíaco y/o ictus. El proceso se empeora debido a la liberación de colágeno y componentes de la placa (por ejemplo, colágeno y factor tisular) que aumentan la coagulación tras su liberación.

- Se ha descubierto que los polipéptidos de la presente invención pueden estabilizar placas vulnerables reduciendo el contenido en lípidos de las placas mediante el transporte inverso de colesterol. Por lo tanto, en otra realización, la presente invención proporciona métodos para estabilizar una placa vulnerable en un vaso sanguíneo de un mamífero por administración al mamífero (y, más preferentemente, a un ser humano) de uno o más de los polipéptidos de esta invención (o peptidomiméticos de dichos polipéptidos). Una placa "vulnerable" se define en general como una placa rica en lípidos con un tapón fibroso adelgazado que carece de un soporte de colágeno y células musculares lisas apropiado. De nuevo, los polipéptidos de la presente invención pueden reducir el contenido en lípidos de la placa, estabilizando de este modo dichas placas "vulnerables".

- En una realización, el mamífero es un mamífero al que se ha diagnosticado que tiene una o más placas vulnerables. En esta realización, se han desarrollado varios ensayos de diagnóstico diferentes para la detección (por ejemplo, diagnóstico y localización) de placas vulnerables, incluyendo estrategias de detección de la temperatura, estrategias de marcaje, estrategias de formación de imágenes (por ejemplo, dispositivos que utilizan resonancia magnética,

ultrasonido, infrarrojo, fluorescencia, luz visible, ondas de radio, rayos x, etc.), estrategias generales para discriminar las placas vulnerables del tejido vascular sano de alrededor y similares (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 6.245.026, 6.475.159, 6.475.210 y 7.118.567). Una estrategia implica la medición de la temperatura dentro de un vaso sanguíneo. Por ejemplo, la temperatura tisular de las placas vulnerables está generalmente elevada en comparación con el tejido vascular sano. La medición de esta discrepancia de temperatura permite la detección de la placa vulnerable. Otra estrategia de detección implica el marcaje de la placa vulnerable con un marcador. El marcador puede ser una sustancia específica para un componente y/o característica de la placa vulnerable (tal como proteína reactiva C). Por ejemplo, el marcador puede tener una afinidad por la placa vulnerable, más que por el tejido sano. La detección del marcador puede permitir por lo tanto la detección de la placa vulnerable. Como alternativa, el marcador puede no tener necesariamente una afinidad por la placa vulnerable, sino que simplemente cambiará sus propiedades mientras esté asociado con la placa vulnerable. El cambio de propiedad puede detectarse y por lo tanto permitir la detección de la placa vulnerable.

En otra realización, el mamífero está en riesgo de tener una o más placas vulnerables. En esta realización, se ha desarrollado un síntoma clínico y/o se ha producido un acontecimiento clínico que conduce a un experto en la materia a creer que el mamífero está en riesgo de tener una o más placas vulnerables.

En relación con los métodos anteriores de estabilización de una placa vulnerable, el polipéptido o polipéptidos pueden administrarse, como se describe en la presente memoria, de acuerdo con cualquiera de varios métodos convencionales incluyendo, pero sin limitación, inyección, infusión, supositorio, pulverización nasal, implante de liberación prolongada, parche transdérmico, por vía oral y similares. En una realización particularmente preferida, el polipéptido o polipéptidos se administran por vía oral (por ejemplo, como un jarabe, cápsula, comprimido, etc.). Además, los polipéptidos (o peptidomiméticos) de la presente invención pueden usarse en solitario o en combinación con otros agentes farmacéuticos conocidos para el tratamiento de la dislipidemia, hipercolesterolemia e inflamación, para aumentar las concentraciones plasmáticas de HDL y/o para promover el transporte inverso de colesterol

VI. TERAPIA DE COMBINACIÓN

En algunas realizaciones, los polipéptidos o peptidomiméticos de la presente invención se administran en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para tratar o prevenir enfermedades y trastornos asociados con dislipidemia, hipercolesterolemia e inflamación, tal como enfermedad cardiovascular, incluyendo aterosclerosis. Por ejemplo, en una realización, se administra un polipéptido de la presente invención junto con cualquiera de los tratamientos convencionales para la aterosclerosis incluyendo, por ejemplo, estatinas (por ejemplo, atorvastatina, lovastatina, pravastatina, sinvastatina, fluvastatina o rosuvastatina); un inhibidor del canal transportador de colesterol de Nieman-Pick tipo C1 tipo 1 (por ejemplo, Ezetimibe); agentes de unión a ácidos biliares (por ejemplo, colestiramina o colestipol); inhibidores de la agregación plaquetaria (por ejemplo, aspirina, ticlopidina o clopidogrel); niacina/nicotinamida; activadores de PPAR; Vitamina E; intervención quirúrgica (por ejemplo, angioplastia, endoprótesis vasculares, endoprótesis vasculares o endarterectomía); y cambios del estilo de vida (por ejemplo, dietas bajas en grasa, pérdida de peso y ejercicio).

Más particularmente, los polipéptidos o peptidomiméticos de la presente invención pueden usarse en combinación, como unidades separadas o combinaciones fijas, con uno o más de los siguientes: un anticuerpo que se une a una molécula inflamatoria no deseada o citocina tal como interleucina 6, interleucina 8, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos y factor de necrosis tumoral α ; un inhibidor enzimático tal como un inhibidor de proteasa aprotinina o un inhibidor de ciclooxigenasa; un antibiótico tal como amoxicilina, rifampicina, eritromicina; un agente antiviral tal como aciclovir; un antiinflamatorio esteroideo tal como un glucocorticoide; un antiinflamatorio no esteroideo tal como aspirina, ibuprofeno o paracetamol; o una citocina no inflamatoria tal como interleucina 4 o interleucina 10. También pueden usarse otras citocinas y factores de crecimiento tales como interferón β , factores de necrosis tumoral, factores antiangiogénicos, eritropoyetinas, trombopoyetinas, interleucinas, factores de la maduración, proteína quimiotáctica y sus variantes y derivados que conserven actividades fisiológicas similares como agentes terapéuticos adicionales.

Los polipéptidos o peptidomiméticos de la presente invención pueden usarse en combinación con fármacos usados comúnmente para tratar trastornos lipídicos, por ejemplo, en pacientes diabéticos. Dichos fármacos incluyen, pero sin limitación, inhibidores de la HMG-CoA reductasa, ácido nicotínico, ezetimida, secuestrantes de ácidos biliares, derivados de ácido fíbrico, inhibidor de MTP, inhibidor de ACAT e inhibidores de CETP. Los ejemplos de inhibidores de HMG-CoA reductasa incluyen lovastatina, pravastina, sinvastatina, rosuvastatina, fluvastatina y atorvastatina. Los ejemplos de secuestrantes de ácidos biliares incluyen colestiramina, colestipol y colesvelam. Los ejemplos de derivados del ácido fíbrico incluyen genfibrozilo y fenofibrato.

Los polipéptidos o peptidomiméticos de la invención también pueden usarse en combinación con fármacos antihipertensores, tales como, por ejemplo, diuréticos, β -bloqueantes, inhibidores de catepsina S, metildopa, agonistas α 2-adrenérgicos, guanadrel, reserpina, antagonistas de receptores β -adrenérgicos, antagonistas de receptores α 1-adrenérgicos, hidralazina, minoxidilo, antagonistas de los canales de calcio, inhibidores de la ACE y antagonistas del receptor de angiotensina II. Los ejemplos de β -bloqueantes incluyen acebutolol, bisoprolol, esmolol,

propanolol, atenolol, labetalol, carvedilol y metoprolol. Los ejemplos de inhibidores de la ACE incluyen captopril, enalapril, lisinopril, benazepril, fosinopril, ramipril, quinapril, perindopril, trandolapril y moexipril.

Los polipéptidos o peptidomiméticos de la invención también pueden usarse en combinación con fármacos cardiovasculares tales como antagonistas de los canales de calcio, antagonistas y agonistas de los receptores β -adrenérgicos, antagonistas de aldosterona, inhibidores de la ACE, antagonistas del receptor de angiotensina II, nitrovasodilatadores y glucósidos cardíacos. Los polipéptidos o peptidomiméticos de la invención también pueden usarse en combinación con fármacos antiinflamatorios tales como antagonistas del receptor H1, agonistas y antagonistas mediados por receptor H2, inhibidores de COX-2, AINES, salicilatos, paracetamol, derivados del ácido propiónico, ácidos enólicos, fuanonas diaril sustituidas, inhibidores de la ciclooxigenasa y agonistas y antagonistas de bradiquinina.

Otros agentes terapéuticos adecuados para su uso en combinación con los polipéptidos o peptidomiméticos de la presente invención se describen en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2005/0142180, que se publicó el 30 de junio de 2005.

El polipéptido (o peptidomiméticos del mismo) y el agente terapéutico adicional pueden administrarse simultáneamente o de forma secuencial. Por ejemplo, el polipéptido puede administrarse primero, seguido del agente terapéutico adicional. Como alternativa, el agente terapéutico adicional puede administrarse primero, seguido del polipéptido de la invención. En algunos casos, el polipéptido de la invención y el agente terapéutico adicional se administran en la misma formulación. En otros casos, el polipéptido y el agente terapéutico adicional se administran en formulaciones diferentes. Cuando el polipéptido y el agente terapéutico adicional se administran en formulaciones diferentes, su administración puede ser simultánea o secuencial.

VI. FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

Para llevar a cabo los métodos de la invención, uno o más polipéptidos de esta invención o peptidomiméticos de los mismos se administran a un individuo al que se le ha diagnosticado que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad o trastorno asociado con dislipidemia, hipercolesterolemia e inflamación (por ejemplo, a un individuo al que se le ha diagnosticado que tiene uno o más síntomas de aterosclerosis, o que está en riesgo de aterosclerosis). Los polipéptidos o peptidomiméticos de los mismos pueden administrarse en su forma "nativa" o, si se desea, en forma de, por ejemplo, sales, ésteres, amidas, profármacos, derivados y similares, con tal de que la sal, éster, amida, profármaco o derivado sea farmacológicamente adecuado, es decir, eficaz en los métodos de la presente invención.

En una realización de los métodos descritos en la presente memoria, la vía de administración puede ser oral, intraperitoneal, transdérmica, subcutánea, por inyección intravenosa o intramuscular, por inhalación, tópica, intralesional, infusión; administración mediada por liposomas; tópica, intratecal, bolsillo gingival, rectal, intrabronquial, nasal; administración transmucosa, intestinal, ocular u ótica, o cualquier otro método conocido en la técnica como puede percibir fácilmente un experto en la materia. Otras realizaciones de las composiciones de la invención incorporan recubrimientos protectores de formas particuladas, inhibidores de proteasas o potenciadores de la permeación para diversas vías de administración, incluyendo parenteral, pulmonar, nasal y oral. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en una diversidad de formas de dosificación unitarias dependiendo del método/modo de administración. Las formas de dosificación unitarias adecuadas incluyen, pero sin limitación, polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, grageas, supositorios, parches, pulverizaciones nasales, inyectables, formulaciones implantables de liberación sostenida, etc.

Como tal, en otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad farmacéuticamente eficaz de un polipéptido o peptidomimético de la presente invención y un vehículo y/o excipiente aceptable. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye cualquier disolvente, medio de dispersión o recubrimiento que sea fisiológicamente compatible y que preferentemente no interfiera con o inhiba de otro modo la actividad del polipéptido o peptidomimético. Preferentemente, el vehículo es adecuado para su administración intravenosa, intramuscular, oral, intraperitoneal, transdérmica, tópica o subcutánea. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden contener uno o más compuestos fisiológicamente aceptables que actúen, por ejemplo, estabilizando la composición o aumentando o disminuyendo la absorción del agente o agentes activos. Los compuestos fisiológicamente aceptables pueden incluir, por ejemplo, carbohidratos, tales como glucosa, sacarosa o dextranos, antioxidantes tales como ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular, composiciones que reducen el aclaramiento o la hidrólisis de los agentes activos o excipientes u otros estabilizantes y/o tampones.

Otros compuestos fisiológicamente aceptables incluyen, pero sin limitación, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes dispersantes o conservantes que son particularmente útiles para prevenir el crecimiento o la acción de los microorganismos. Son bien conocidos diversos conservantes e incluyen, por ejemplo, fenol y ácido ascórbico. Un experto en la materia apreciará que la elección del vehículo o vehículos farmacéuticamente aceptables, incluyendo un compuesto fisiológicamente aceptable depende, por ejemplo, de la vía de administración del polipéptido o polipéptidos o del peptidomimético o peptidomiméticos y de las características físico-químicas

particulares del polipéptido o polipéptidos o del peptidomimético o peptidomiméticos.

En una realización preferida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es solución salina fisiológica. Son bien conocidos otros vehículos farmacéuticamente aceptables y sus formulaciones, y se describen en general en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science (18ª Ed., ed. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990). Son bien conocidos en la técnica diversos excipientes farmacéuticamente aceptables y pueden encontrarse en, por ejemplo, Handbook of Pharmaceutical Excipients (4ª ed., Ed. Rowe et al., Pharmaceutical Press, Washington, D.C.). De nuevo, la composición farmacéutica puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma, cápsula, comprimido u otra forma adecuada. El componente activo puede recubrirse en un material para protegerlo de la inactivación por el entorno antes de alcanzar el sitio de acción diana.

En ciertas realizaciones preferidas, los polipéptidos o peptidomiméticos de esta invención pueden administrarse por vía oral (por ejemplo, mediante un comprimido) o como un inyectable de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos por los expertos en la materia. En otras realizaciones preferidas, los polipéptidos o peptidomiméticos también pueden administrarse a través de la piel usando sistemas de administración de fármacos transdérmicos convencionales, es decir, "parches" transdérmicos, en los que el polipéptido o polipéptidos o el peptidomimético o peptidomiméticos están contenidos típicamente dentro de una estructura laminada que sirve como dispositivo de administración de fármaco que se fijará a la piel. En dicha estructura, la composición farmacológica está contenida típicamente en una capa o "depósito" subyacente a una capa de refuerzo superior. Se apreciará que el término "depósito" en este contexto se refiere a una cantidad de "ingrediente o ingredientes activos" que en última instancia está disponible para su administración en la superficie de la piel. Por lo tanto, por ejemplo, el "depósito" puede incluir el ingrediente o ingredientes activos en un adhesivo en una capa de refuerzo del parche, o en cualquiera de una diversidad de formulaciones de matriz diferentes conocidas por los expertos en la materia. El parche puede contener un solo depósito, o puede contener múltiples depósitos.

En una realización, el depósito comprende una matriz polimérica de un material adhesivo de contacto farmacéuticamente aceptable que sirve para fijar el sistema a la piel durante la administración del fármaco. Los ejemplos de materiales adhesivos de contacto con la piel adecuados incluyen, pero sin limitación, polietilenos, polisiloxanos, poliisobutilenos, poliacrilatos, poliuretanos y similares. Como alternativa, el depósito que contiene el fármaco y el adhesivo de contacto con la piel están presentes como capas separadas y distintas, subyaciendo el adhesivo al depósito que, en este caso, puede ser una matriz polimérica como se ha descrito anteriormente o puede ser un depósito de líquido o hidrogel, o puede adoptar alguna otra forma. La capa de refuerzo en estos laminados que sirve como la superficie superior del dispositivo funciona preferentemente como elemento estructural primario del "parche" y proporciona al dispositivo mucha de su flexibilidad. El material seleccionado para la capa de refuerzo es preferentemente sustancialmente impermeable al agente o agentes activos y cualquier otro material que esté presente.

Otras formulaciones preferidas para la administración tópica de fármacos incluyen, pero sin limitación, pomadas y cremas. Las pomadas son preparaciones semisólidas que están basadas típicamente en vaselina u otros derivados del petróleo. Las cremas que contienen el agente activo seleccionado son típicamente emulsiones líquidas viscosas o semisólidas, con frecuencia de aceite en agua o de agua en aceite. Las bases de cremas son típicamente lavables con agua y contienen una fase oleosa, un emulsionante y una fase acuosa, la fase oleosa, denominada también a veces fase "interna", está compuesta generalmente por vaselina y un alcohol graso tal como alcohol cetílico o estearílico; la fase acuosa habitualmente, aunque no necesariamente, supera en volumen a la fase oleosa y, generalmente, contiene un humectante. El emulsionante en una formulación de crema es generalmente un tensioactivo no iónico, aniónico, catiónico o anfotérico. La base de pomada o crema específica a usar, como apreciarán los expertos en la materia, es una que proporcione una administración óptima de fármaco. Como con otros vehículos o excipientes, una base de pomada debería ser inerte, estable, no irritante y no sensibilizante.

En algunas realizaciones, se usan dispositivos implantados (por ejemplo, endoprótesis arteriales e intravenosas, incluyendo endoprótesis de elución y catéteres) para administrar las formulaciones que comprenden los polipéptidos y peptidomiméticos de la invención. Por ejemplo, las soluciones acuosas que comprenden los polipéptidos y peptidomiméticos de la invención se administran directamente a través de las endoprótesis y catéteres. En algunas realizaciones, las endoprótesis y catéteres pueden estar recubiertos con formulaciones que comprenden los polipéptidos y peptidomiméticos descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, los polipéptidos y peptidomiméticos estarán en formulaciones de liberación prolongada y se eluirán a partir de las endoprótesis. Se describen endoprótesis adecuadas en, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 6.827.735; 6.827.735; 6.827.732; 6.824.561; 6.821.549; 6.821.296; 6.821.291; 6.818.247; 6.818.016; 6.818.014; 6.818.013; 6.814.749; 6.811.566; 6.805.709; 6.805.707; 6.805.705; 6.805.704; 6.802.859; 6.802.857; 6.802.856 y 6.802.849. Se describen catéteres adecuados en, por ejemplo las Patentes de Estados Unidos N° 6.829.497; 6.827.798; 6.827.730; 6.827.703; 6.824.554; 6.824.553; 6.824.551; 6.824.532 y 6.819.951.

A diferencia de las formulaciones polipeptídicas típicas, los polipéptidos de esta invención que comprenden aminoácidos de forma L o de forma D pueden administrarse, incluso por vía oral, sin protección frente a la proteólisis por los ácidos estomacales, etc. No obstante, en ciertas realizaciones, la administración del polipéptido puede mejorarse mediante el uso de excipientes protectores. Esto se logra típicamente formando un complejo del

polipéptido con una composición para hacer que sea resistente a la hidrólisis ácida y enzimática, o empaquetando el polipéptido en un vehículo apropiadamente resistente tal como un liposoma. Se conocen bien en la técnica medios de protección de polipéptidos para su administración oral (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.391.377, que describe composiciones de lípidos para la administración oral de agentes terapéuticos).

5 Una semivida en suero elevada puede mantenerse mediante el uso de sistemas de “empaquetamiento” de polipéptidos de liberación sostenida. Dichos sistemas de liberación sostenida son bien conocidos por los expertos en la materia. En una realización preferida, se usa el sistema de administración de microesferas biodegradables ProLease para proteínas y polipéptidos (Tracy, *Biotechnol. Prog.*, 14: 108 (1998); Johnson et al., *Nature Med.*, 2: 795 (1996); Herbert et al., *Pharmaceut. Res.*, 15: 357 (1998)), que implica el uso de un polvo seco compuesto por
10 microesferas poliméricas biodegradables que contienen el polipéptido en una matriz polimérica que puede prepararse como una formulación seca con o sin otros agentes.

15 El proceso de fabricación de microesferas ProLease estaba diseñado para conseguir una alta eficacia de encapsulación de polipéptido manteniendo al mismo tiempo la integridad de la proteína. El proceso consiste en (i) preparación de partículas de proteína secadas por congelación a partir de un polipéptido a granel mediante secado por congelación por pulverización de la solución farmacológica con excipientes estabilizantes, (ii) preparación de una suspensión de fármaco-polímero, seguido de sonicación u homogeneización para reducir el tamaño de partícula de fármaco, (iii) producción de microesferas de fármaco-polímero congeladas por atomización en nitrógeno líquido, (iv)
20 extracción del disolvente polimérico con etanol y (v) filtración y secado al vacío para producir el producto en polvo seco final. El polvo resultante contiene la forma sólida del polipéptido, que está homogéneamente y rígidamente dispersado dentro de partículas poliméricas porosas. El polímero usado más comúnmente en este proceso, poli(lactida-co-glicolida) (PLG) es tanto biocompatible como biodegradable.

25 La encapsulación puede conseguirse a bajas temperaturas (por ejemplo, -40°C). Durante la encapsulación, el polipéptido se mantiene en el estado sólido en ausencia de agua, minimizando de este modo la movilidad conformacional inducida por agua del polipéptido, previniendo las reacciones de degradación de polipéptidos que incluyen agua como reactivo y evitando las superficies de contacto orgánicas-acuosas en las que los polipéptidos pueden experimentar desnaturalización. Un proceso preferido usa disolventes en los que la mayoría de los
30 polipéptidos son insolubles, produciendo de este modo altas eficacias de encapsulación (por ejemplo, superiores al 95%).

En otra realización, pueden proporcionarse uno o más componentes de la solución como “concentrado”, por ejemplo, en un recipiente de almacenamiento (por ejemplo, en un volumen premedido) listo para su dilución, o en
35 una cápsula soluble lista para su adición a un volumen de agua.

En ciertas realizaciones de la presente invención, las composiciones farmacéuticas son formulaciones de liberación sostenida. Los polipéptidos o peptidomiméticos de la presente invención pueden mezclarse con polímeros o matrices biológicamente compatibles que controlan la velocidad de liberación de los copolímeros en el entorno
40 inmediato. Las composiciones de liberación controlada o sostenida incluyen la formulación en depósitos de liberación prolongada lipófilos (por ejemplo, ácidos grasos, ceras, aceites). También se contemplan por la invención composiciones particuladas recubiertas con polímeros (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas). Otras realizaciones de las composiciones de la invención incorporan formas particuladas, recubrimientos protectores, inhibidores de proteasa o potenciadores de la permeación para diversas vías de administración, incluyendo
45 parenteral, pulmonar, nasal y oral. Los vehículos aceptables incluyen carboximetilcelulosa (CMC) y CMC modificada.

La composición farmacéutica de la presente invención es preferentemente estéril y apirógena en el momento de la administración, y es preferentemente estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Estas composiciones farmacéuticas pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales bien
50 conocidas.

En aplicaciones terapéuticas, las composiciones de esta invención se administran a un individuo al que se le ha diagnosticado que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad o trastorno asociado con dislipidemia, hipercolesterolemia e inflamación (y, en realizaciones preferidas, a un individuo al que se le ha diagnosticado que
55 tiene uno o más síntomas de aterosclerosis o que está en riesgo de aterosclerosis) en una cantidad suficiente para curar o al menos prevenir o detener parcialmente la enfermedad, afección y/o sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como “dosis terapéuticamente eficaz”. Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general de salud del paciente. Pueden administrarse administraciones individuales o múltiples de las composiciones dependiendo de la dosificación y de la frecuencia
60 que sean necesarias y toleradas por el paciente. En cualquier caso, la composición debería proporcionar una cantidad suficiente de los agentes activos, es decir, polipéptidos o peptidomiméticos, de las formulaciones de esta invención para tratar eficazmente (mejorar uno o más síntomas) al individuo o paciente.

La concentración de polipéptido o peptidomimético puede variar ampliamente, y se seleccionará principalmente basándose en volúmenes de fluido, viscosidades, peso corporal, niveles circulantes en plasma del polipéptido, toxicidades del polipéptido, progresión de la enfermedad (por ejemplo, aterosclerosis), la producción de anticuerpos
65

que se unan específicamente al polipéptido y similares de acuerdo con el modo de administración particular seleccionado y las necesidades del paciente. Típicamente, la dosis equivalente de un polipéptido o peptidomimético es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg por kg, preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 mg por kg, más preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mg por kg de peso corporal. Se apreciará que dichas dosificaciones pueden variarse para optimizar un régimen terapéutico en un sujeto o grupo de sujetos particular.

Para su administración, los polipéptidos de la presente invención pueden administrarse a una velocidad determinada por la DL50 del polipéptido, y los efectos secundarios del polipéptido a diversas concentraciones, según sea aplicable a la masa y salud global del paciente. La administración puede efectuarse mediante dosis individuales o divididas, por ejemplo, dosis administradas en una base regular (por ejemplo, diariamente) durante un periodo de tiempo (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 días o 1-3 semanas o más).

Como se explica en la presente memoria, los polipéptidos o peptidomiméticos de la presente invención pueden modificarse de varias formas diferentes. Por ejemplo, los polipéptidos pueden modificarse de modo que los grupos R en los aminoácidos constituyentes y/o los aminoácidos terminales se bloqueen, es decir, se protejan mediante un grupo protector. Se ha descubierto que el bloqueo, particularmente del extremo amino y/o carboxi terminal, puede mejorar enormemente la administración oral y aumenta significativamente la semivida en suero. Además, para aumentar la administración y/o las actividades biológicas *in vivo*, pueden prepararse sales, ésteres, amidas, profármacos y otros derivados de los polipéptidos o peptidomiméticos de la presente invención usando procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia de la química orgánica sintética y descritos, por ejemplo, por March (1992) *Advanced Organic Chemistry; Reactions, Mechanisms and Structure*, 4ª Ed. N.Y. Wiley-Interscience.

Por ejemplo, se preparan sales de adición de ácido a partir de la base libre usando una metodología convencional, que implica típicamente la reacción con un ácido adecuado. En general, la forma de base del fármaco se disuelve en un disolvente orgánico polar tal como metanol o etanol y el ácido se añade al mismo. La sal resultante precipita o puede sacarse de la solución por adición de un disolvente menos polar. Los ácidos adecuados para preparar sales de adición de ácido incluyen tanto ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinnámico, ácido mándelico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares, así como ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. Una sal de adición de ácido puede reconvertirse en la base libre por tratamiento con una base adecuada. Las sales de adición de ácido particularmente preferidas de los polipéptidos descritos en la presente memoria son sales de haluros, tales como las que pueden prepararse usando ácidos clorhídrico o bromhídrico. Por el contrario, la preparación de sales básicas de los polipéptidos o peptidomiméticos de la presente invención se prepara de una forma similar usando una base farmacéuticamente aceptable tal como hidróxido sódico, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio, trimetilamina o similares. Las sales básicas particularmente preferidas incluyen sales de metales alcalinos, por ejemplo, sales de sodio y sales de cobre.

La preparación de ésteres implica típicamente la funcionalización de grupos hidroxilo y/o carboxilo que puedan estar presentes dentro de los polipéptidos o peptidomiméticos de la presente invención. Los ésteres son derivados típicamente sustituidos con acilo de grupos alcohol libres, es decir, restos que proceden de ácidos carboxílicos de la fórmula RCOOH, en la que R es alquilo y, preferentemente, alquilo inferior. Los ésteres pueden reconvertirse en los ácidos libres, si se desea, usando procedimientos de hidrogenólisis o hidrólisis convencionales.

También pueden prepararse amidas y profármacos usando técnicas conocidas por los expertos en la materia o descritas en la bibliografía pertinente. Por ejemplo, pueden prepararse amidas a partir de ésteres, usando reactivos de amina adecuados, o pueden prepararse a partir de un anhídrido o un cloruro de ácido por reacción con amoniaco o una amina de alquilo inferior. Los profármacos se preparan típicamente por unión covalente de un resto que da como resultado un compuesto que es terapéuticamente inactivo hasta que se modifique por el sistema metabólico de un individuo.

Las formulaciones y los métodos de administración anteriores están claramente destinados a ser ilustrativos y no limitantes de ningún modo. Se apreciará que, usando los contenidos proporcionados en la presente memoria, pueden concebirse fácilmente otras formulaciones y modos de administración adecuados.

VIII. FORMULACIONES BASADAS EN LÍPIDOS

En otro aspecto, los polipéptidos y peptidomiméticos de la presente invención se administran preferentemente junto con uno o más lípidos. Los lípidos pueden formularse como un excipiente para proteger y/o aumentar el transporte/captación de los polipéptidos o peptidomiméticos, o pueden administrarse por separado.

Los lípidos pueden formularse en liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas de lípidos y similares. Dichas formulaciones de lípidos pueden usarse para encapsular los polipéptidos y

peptidomiméticos de la presente invención, y/o pueden simplemente formar complejos/mezclarse con dichos polipéptidos y peptidomiméticos. Los expertos en la materia sabrán cómo usar dichas formulaciones de lípidos para encapsular o formar complejos con los polipéptidos o peptidomiméticos de la presente invención. Por ejemplo, la formación y uso de liposomas se conoce en general por los expertos en la materia. Recientemente, se desarrollaron liposomas con una estabilidad en suero y semividas en circulación mejoradas (véase, la Patente de Estados Unidos N° 5.741.516). Además, se han revisado diversos métodos de liposomas y preparaciones de tipo liposoma como vehículos farmacológicos potenciales (véanse, las Patentes de Estados Unidos N° 5.567.434; 5.552.157; 5.565.213; 5.738.868 y 5.795.587).

En una realización, los polipéptidos o peptidomiméticos de la presente invención están formando un complejo con un lípido, tal como un fosfolípido (por ejemplo, 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-fosfatidilcolina ("POPC") de una forma similar a la descrita en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2005/0142180, que se publicó el 30 de junio de 2005. Se ha descubierto sorprendentemente que cuando los polipéptidos y peptidomiméticos de la presente invención están formando complejos con, por ejemplo, POPC a proporciones que varían de aproximadamente 1:0,5 a aproximadamente 1:5 (polipéptido:POPC), se forman partículas de lípido-polipéptido distintas que tienen tamaños de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 nm, que dan como resultado una capacidad significativamente aumentada, es decir, capacidad para el flujo de salida de colesterol de las células.

Como tal, la presente invención proporciona complejos de polipéptidos-lípidos (o, como alternativa, complejos de peptidomiméticos-lípidos) que tienen una capacidad aumentada para el flujo de salida de colesterol de las células. Típicamente, el lípido se mezcla con el polipéptido antes de la administración. Los polipéptidos de la presente invención y los lípidos pueden mezclarse en una solución acuosa en proporciones apropiadas y pueden formar complejos por método conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, secado por congelación, solubilización en detergente seguida de diálisis, microfluidificación, sonicación y homogeneización. La eficacia del complejo puede optimizarse, por ejemplo, variando la presión, la frecuencia ultrasónica o la concentración de detergente. Un ejemplo de un detergente usado comúnmente para preparar complejos de polipéptidos-lípidos es colato sódico.

En ciertas realizaciones, el complejo de polipéptido-lípido (por ejemplo, fosfolípidos) puede estar en solución con un diluyente o vehículo farmacéutico apropiado. En otras realizaciones, las preparaciones secadas por congelación o liofilizadas de los complejos de polipéptidos-lípidos pueden hidratarse o reconstituirse con un diluyente farmacéutico apropiado antes de la administración. En otra realización, los complejos de polipéptidos-lípidos pueden ser preparaciones congeladas que se descongelan hasta que se consigue una solución homogénea antes de la administración a un sujeto que lo necesite.

El lípido puede ser cualquier lípido adecuado conocido por los expertos en la materia. En una realización, pueden usarse lípidos que no contengan fósforo, incluyendo estearilamina, dodecilamina, palmitato de acetilo, (1,3)-D-manosil-(1,3)diglicérido, aminofenilglucósido, glucolípidos de éter 3-colesteril-6'-(glicosilto)hexílico, cloruro de N-(2,3-di(9-(Z)-octadeceniloxi))-prop-1-il-N,N,N-trimetilamonio y amidas de ácidos grasos.

En otra realización, se usan fosfolípidos o una mezcla de fosfolípidos. Los fosfolípidos adecuados incluyen, pero sin limitación, un fosfolípido de cadena de alquilo pequeña, fosfatidilcolina, fosfatidilcolina de huevo, fosfatidilcolina de soja, dipalmitoilfosfatidilcolina, fosfatidilglicerol de soja, fosfatidilglicerol de huevo, diestearoilfosfatidilglicerol, dimiristoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina, dilaurilfosfatidilcolina, 1-miristoil-2-palmitoilfosfatidilcolina, 1-palmitoil-2-miristoilfosfatidilcolina, 1-palmitoil-2-estearoilfosfatidilcolina, 1-estearoil-2-palmitoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina, 1-oleoil-2-palmitoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidiletanolamina, dilaurilfosfatidilglicerol, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol, dimiristoilfosfatidilglicerol, dipalmitoilfosfatidilglicerol, diestearoilfosfatidilglicerol, dioleoilfosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, ácido dimiristoilfosfatídico, ácido dipalmitoilfosfatídico, dimiristoilfosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidiletanolamina, dimiristoilfosfatidilserina, dipalmitoilfosfatidilserina, fosfatidilserina cerebral, esfingomielina, esfingolípidos, esfingomielina cerebral, dipalmitoilesfingomielina, diestearoilesfingomielina, galactocerebrósido, gangliósidos, cerebrósidos, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, lisolecitina, lisofosfatidiletanolamina, cefalina, cardiolipina; dicetilfosfato, diestearoil-fosfatidiletanolamina y colesterol y sus derivados. De forma similar, el fosfolípido puede ser un derivado o análogo de cualquiera de los fosfolípidos anteriores o, de nuevo, una mezcla de dos o más de cualquiera de los fosfolípidos anteriores. Dichos fosfolípidos pueden obtenerse a partir de fuentes comerciales, fuentes naturales o por medios sintéticos o semisintéticos conocidos por los expertos en la materia.

En realizaciones preferidas, el complejo de polipéptido-lípido es un complejo de polipéptido-fosfolípido. En una realización más preferida, el lípido es 1-palmitoil-2-oleoil fosfatidilcolina ("POPC") o ("1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina").

Será fácilmente evidente por los expertos en la materia que el complejo que comprende un polipéptido de la presente invención y un lípido, preferentemente un fosfolípido, puede comprender cualquier cantidad de lípido y cualquier cantidad del polipéptido, con tal de que el complejo sea eficaz para mediar el flujo de salida de colesterol y, a su vez, para tratar enfermedades o síntomas asociados con el mismo. Como se ha mencionado previamente, se

ha descubierto sorprendentemente que cuando los polipéptidos de la presente invención están formando complejos con, por ejemplo, POPC a proporciones que varían de aproximadamente 1:0,5 a aproximadamente 1:5 (polipéptido:POPC), se forman partículas de lípido-polipéptido distintas que tienen tamaños de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 nm, que dan como resultado una capacidad significativamente aumentada, es decir, la capacidad para el flujo de salida de colesterol de las células. Sin embargo, los complejos de polipéptidos-lípidos de la presente invención pueden comprender complejos con otras proporciones de fosfolípido respecto a polipéptido, tales como de aproximadamente 100:1, de aproximadamente 10:1, de aproximadamente 5:1, de aproximadamente 3:1, de aproximadamente 2:1, de aproximadamente 1:1, de aproximadamente 1:2, de aproximadamente 1:3, de aproximadamente 1:5, de aproximadamente 1:10 y de aproximadamente 1:100 (peso de polipéptido/peso de lípido).

Los complejos de polipéptidos-lípidos de la presente invención pueden prepararse por cualquier método conocido por un experto en la materia. En algunos casos, es deseable mezclar el lípido y el polipéptido antes de la administración. Los lípidos pueden estar en solución o en forma de liposomas o emulsiones formadas usando técnicas convencionales, tales como homogeneización, sonicación o extrusión. La sonicación se realiza generalmente con un sonicador de punta, tal como un sonicador de punta Branson, en un baño de hielo. Típicamente, la suspensión se somete a varios ciclos de sonicación. La extrusión puede llevarse a cabo mediante extrusores de biomembrana, tales como el extrusor de biomembrana Lipex TM. (Lipex Biomembrane Extruder, Inc. Vancouver, Canadá). El tamaño de poro definido en los filtros de extrusión puede generar vesículas liposomales unilaminares de tamaños específicos. Los liposomas también pueden formarse por extrusión a través de un filtro cerámico asimétrico, tal como Ceraflow Microfilter.TM., que está disponible en el mercado de la Norton Company, Worcester, MA, o a través de un filtro de policarbonato u otros tipos de materiales polimerizados (es decir, plásticos) conocidos por los expertos en la materia.

Como se ha mencionado previamente, los complejos de polipéptidos-lípidos de la presente invención pueden prepararse de una diversidad de formas incluyendo, pero sin limitación, vesículas, liposomas o proteoliposomas. Pueden usarse una diversidad de métodos bien conocidos por los expertos en la materia para preparar los complejos de polipéptidos-lípidos. Pueden usarse varias técnicas disponibles para preparar liposomas o proteoliposomas. Por ejemplo, un polipéptido de la presente invención (por ejemplo, un polipéptido de las SEC ID N°: 1-11) y, preferentemente, un polipéptido de las SEC ID N°: 4-7) puede cosonicarse usando un sonicador de baño o sonda) con el lípido apropiado para formar los complejos de polipéptidos-lípidos. En ciertas realizaciones, el polipéptido puede combinarse con vesículas de lípidos preformadas, dando como resultado la formación espontánea de un complejo de polipéptido-lípido. En otra realización, el complejo de polipéptido-lípido también puede prepararse mediante un método de diálisis con detergente. En este método, una mezcla del polipéptido, lípido y un detergente, tal como colato sódico, puede dializarse para eliminar el detergente y reconstituirse para generar los complejos de polipéptidos-lípidos (véase, por ejemplo, Jonas et al, Methods Enzymol, 128: 553-82 (1986)).

En otras realizaciones, los complejos de polipéptido-lípido pueden generarse por coliofilización, como se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 6.287.590 y 6.455.088. Se describen otros métodos, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 6.004.925, 6.037.323 y 6.046.166. Otros métodos de preparación de complejos de polipéptidos-lípidos serán evidentes para los expertos en la materia.

En una realización preferida, los complejos de polipéptidos-lípidos pueden generarse por homogeneización.

IX. ÁCIDOS NUCLEICOS Y TERAPIA GÉNICA

Pueden generarse ácidos nucleicos aislados que codifican los polipéptidos descritos en la presente memoria, vectores de expresión que comprenden los ácidos nucleicos y células hospedadoras que comprenden los vectores de expresión. Más particularmente, los ácidos nucleicos aislados pueden codificar los polipéptidos de la presente invención que tienen actividades de flujo de salida de colesterol similares a las de las apolipoproteínas de longitud completa en una base por molécula, y que tienen alta selectividad por ABAC1 de una forma similar a las apolipoproteínas de longitud completa, incluyendo los polipéptidos, pero sin limitación, los polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende las SEC ID N°: 1-11.

En ciertas realizaciones, se usan ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la invención para la transfección de células *in vitro* e *in vivo*. Estos ácidos nucleicos pueden insertarse en cualquiera de varios vectores bien conocidos para la transfección de células diana y organismos como se describe a continuación. Los ácidos nucleicos se transfectan en células, *ex vivo* o *in vivo*, a través de la interacción del vector y la célula diana. Los ácidos nucleicos, bajo el control de un promotor, expresan entonces un polipéptido de la presente invención, mitigando de este modo los efectos de una enfermedad asociada con dislipidemia, hipercolesterolemia e inflamación.

Dichos procedimientos de terapia génica se han usado para corregir defectos genéticos adquiridos y heredados, cáncer y otras enfermedades en varios contextos. La capacidad para expresar genes artificiales en seres humanos facilita la prevención y/o cura de muchas enfermedades humanas importantes, incluyendo muchas enfermedades que no son susceptibles a tratamiento mediante otras terapias (para una revisión de procedimientos de terapia génica véase Anderson, Science, 256: 808-813 (1992); Nabel et al., TIBTECH, 11: 211-217 (1993); Mitani et al.,

TIBTECH, 11: 162-166 (1993); Mulligan, Science, 926-932 (1993); Dillon, TIBTECH, 11: 167-175 (1993); Miller, Nature, 357: 455-460 (1992); Van Brunt, Biotechnology, 6(10): 1149-1154 (1998); Vigne, Restorative Neurology and Neuroscience, 8: 35-36 (1995); Kremer et al., British Medical Bulletin, 51 (1): 31-44 (1995); Haddada et al., en Current Topics In Microbiology and Immunology (Doerfler & Böhm eds., 1995) y Yu et al., Gene Therapy, 1: 13-26 (1994)).

Para la administración de ácidos nucleicos pueden usarse vectores virales. Los vectores adecuados incluyen, por ejemplo, vectores de virus herpes simple como se describen en Lilley et al., Curr. Gene Ther., 1(4): 339-58 (2001), replicones de partículas y ADN de alfavirus como se describen en, por ejemplo, Polo et al., Dev. Biol. (Basel), 104: 181-5 (2000), vectores plasmídicos basados en el virus Epstein-Barr (EBV) como se describen en, por ejemplo, Mazda, Curr. Gene Ther., 2(3): 379-92 (2002), sistemas de vector de replicón de EBV como se describen en, por ejemplo, Otomo et al., J. Gene Med., 3(4): 345-52 (2001), virus asociados a adenovirus de monos rhesus como se describen en, por ejemplo, Gao et al., PNAS USA., 99(18): 11854 (2002), vectores virales adenoasociados y adenovirales como se describen en, por ejemplo, Nicklin et al., Curr. Gene Ther., 2(3): 273-93 (2002). Otros sistemas de vector de virus adenoasociado (AAV) adecuados pueden construirse fácilmente usando técnicas bien conocidas en la materia (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nº 5.173.414 y 5.139.941; Publicaciones PCT Nº WO 92/01070 y WO 93/03769; Lebkowski et al., Mol. Cell. Biol., 8: 3988-3996 (1988); Vincent et al. (1990) Vaccines 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, Current Opinion In Biotechnology 3: 533-539 (1992); Muzyczka, Current Topics in Microbiol. and Immunol., 158: 97-129 (1992); Kotin, Human Gene Therapy, 5: 793-801 (1994); Shelling et al., Gene Therapy, 1: 165-169 (1994); y Zhou et al., J. Exp. Med., 179: 1867-1875 (1994)). Los vectores adecuados adicionales incluyen adenovirus de replicación atenuada de gen E1B descritos en, por ejemplo, Kim et al., Cancer Gene Ther., 9(9): 725-36 (2002) y vectores adenovirales que no se replican descritos en, por ejemplo, Pascual et al., J. Immunol., 160(9): 4465-72 (1998). Pueden construirse vectores ejemplares como se describen por Okayama et al., Mol. Cell. Biol., 3: 280 (1983).

También pueden usarse vectores conjugados moleculares, tales como los vectores quiméricos de adenovirus descritos en Michael et al., J. Biol. Chem., 268: 6866-6869 (1993) y Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 6099-6103 (1992) para la administración de genes de acuerdo con los métodos de la invención.

En una realización ilustrativa, los retrovirus proporcionan una plataforma conveniente y eficaz para sistemas de administración de genes. Una secuencia de nucleótidos seleccionada que codifica un polipéptido de la invención se inserta en un vector y se empaqueta en partículas retrovirales usando técnicas conocidas en la materia. El virus recombinante puede aislarse entonces y administrarse a un sujeto. Los vectores adecuados incluyen vectores lentivirales como se describen en, por ejemplo, Scherr et al., Curr. Gene Ther., 2(1): 45-55 (2002). Se han descrito sistemas retrovirales ilustrativos adicionales (por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 5.219.740; Miller et al., BioTechniques, 7: 980-990 (1989); Miller, Human Gene Therapy, 1: 5-14 (1990); Scarpa et al., Virology, 180: 849-852 (1991); Bums et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 8033-8037 (1993) y Boris-Lawrie et al., Curr. Opin. Genet. Develop., 3: 102-109 (1993).

Otros sistemas de administración basados en virus conocidos se describen en, por ejemplo, Fisher-Hoch et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 317-321 (1989); Flexner et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 569: 86-103 (1989); Flexner et al., Vaccine, 8: 17-21 (1990); Patentes de Estados Unidos Nº 4.603.112, 4.769.330 y 5.017.487; documento WO 89/01973; Patente de Estados Unidos Nº 4.777.127; documento GB 2.200.651; documento EP 0.345.242; documento WO 91/02805; Berkner, Biotechniques, 6: 616-627 (1988); Rosenfeld et al., Science, 252: 431-434 (1991); Kolls et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 215-219 (1994); Kass-Eisler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 11498-11502 (1993); Guzman et al., Circulation, 88: 2838-2848 (1993); Guzman et al., Cir. Res., 73: 1202-1207 (1993) y Lotze et al., Cancer Gene Ther., 9(8): 692-9 (2002).

X. USO COMO HERRAMIENTAS DE INVESTIGACIÓN Y EN MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Los polipéptidos y peptidomiméticos de la invención también son útiles como herramientas de investigación. Por ejemplo, los polipéptidos o peptidomiméticos de la invención pueden usarse para investigar interacciones de lipoproteína-receptor en animales y modelos animales, particularmente cuando un polipéptido o peptidomimético del mismo está marcado con un resto detectable, por ejemplo, un marcador radiactivo, un marcador fluorescente, etc. Además, los polipéptidos de la invención también pueden usarse para identificar modelos animales apropiados para la elucidación de rutas metabólicas de lípidos. Por ejemplo, los polipéptidos pueden usarse para identificar modelos animales en los que la peroxidación de lípidos contribuye a la progresión de la aterosclerosis. Además, los polipéptidos de la invención pueden usarse para evaluar el potencial anti-aterosclerótico de otros compuestos (incluyendo, por ejemplo, variantes polipeptídicas y otros peptidomiméticos).

En algunos casos los polipéptidos o peptidomiméticos de la invención se usan para dirigir agentes terapéuticos a células y tejidos que expresan ABCA.

En otras realizaciones, los polipéptidos o peptidomiméticos de la invención pueden usarse en métodos de diagnóstico de enfermedades y trastornos asociados con un flujo de salida de colesterol anormal o con ABCA. Por ejemplo, los péptidos pueden usarse en ensayos para diagnosticar una deficiencia en el transporte inverso de

colesterol y para identificar individuos que se espera que respondan al tratamiento con péptidos. Dichos ensayos de diagnóstico incluyen ensayos *in vitro*. Por ejemplo, el flujo de salida de colesterol puede evaluarse en un ensayo en el que un polipéptido de la invención, por ejemplo, uno cualquiera de la SEC ID N°: 1-15, se mezcla con plasma de un sujeto y se expone a células para indicar si un sujeto respondería al tratamiento (por ejemplo, un gran aumento en el flujo de salida en presencia del péptido en comparación con el flujo de salida mediado por plasma en ausencia del péptido sugiere que el sujeto respondería).

De forma similar, un polipéptido de la invención, por ejemplo, uno cualquiera de SEC ID N°: 1-15, puede mezclarse con plasma de un sujeto para detectar cambios en la distribución de subclase de HDL y/o para detectar cambios en las propiedades antioxidativas del plasma en presencia del péptido.

En algunas realizaciones, los polipéptidos o peptidomiméticos se usan para métodos de formación de imágenes *in vivo*. Los polipéptidos o peptidomiméticos se conjugan con un resto detectable y se administran a un sujeto (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano). La detección del resto detectable permite la formación de imágenes de una célula, tejido u órgano de interés, incluyendo, por ejemplo, una lesión aterosclerótica o una placa amiloide).

El término "formación de imágenes" se refiere a un procedimiento o modalidad para generar una imagen de un resto detectable *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*, como se describe en la presente memoria o conocido por un experto en la materia. Los ejemplos de modalidades de formación de imágenes incluyen, pero sin limitación, resonancia magnética, resonancia magnética nuclear, radioescintigrafía, tomografía por emisión de positrones, tomografía computarizada, fluorescencia en el infrarrojo cercano, rayos X, ultrasonido, luz ultravioleta o luz visible (véase, por ejemplo, Dahnert, Radiology Review Manual (4ª ed. 1999); Brant et al., Fundamentals of Diagnostic Radiobiology (2ª ed. 1999); Weissleder et al., Primer of Diagnostic Imaging (2ª ed. 1997); Buddinger et al., Medical Magnetic Resonance A Primer, Society of Magnetic Resonance, Inc. (1988) y Weissleder et al., Nature Biotech., 17: 375-378 (1999)).

La expresión "resto detectable", como se usa en la presente memoria, se refiere a un resto o marcador del que pueden formarse imágenes y/o que puede detectarse *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* mediante un procedimiento o modalidad descrito en la presente memoria o conocido por un experto en la materia. Como se usa en la presente memoria, el resto detectable puede estar unido directa o indirectamente a un polipéptido o peptidomimético de la invención. Un enlazador puede servir para unir el polipéptido o peptidomimético a un resto detectable. Como alternativa, un enlazador puede unir el polipéptido a más de un resto detectable. Asimismo, un resto detectable puede estar unido a más de un enlazador. El uso de una pluralidad de restos detectables unidos a un polipéptido permite que se aumente la capacidad de detección del resto detectable (por ejemplo, aumentando su radioopacidad, ecogenicidad o relaxividad) o, como alternativa, puede permitir que el polipéptido se detecte en más de una modalidad de formación de imágenes.

La unión de un resto detectable a un polipéptido o peptidomimético de la invención puede conseguirse por medios covalentes o no covalentes, que implican habitualmente la interacción con uno o más grupos funcionales localizados en el resto detectable, el enlazador y/o el polipéptido. Los ejemplos de grupos funcionales químicamente reactivos que pueden emplearse para este fin incluyen, pero sin limitación, grupos amino, hidroxilo, sulfhidrilo, carboxilo y carbonilo, así como grupos carbohidrato, diales vecinales, tioéteres, 2-amino alcoholes, 2-amino tioles, grupos guanidilo, imidazolilo y fenólico. En algunas realizaciones, se usan enlaces lábiles, por ejemplo, que contienen brazos espaciadores que son biodegradables o químicamente sensibles o que incorporan sitios de escisión enzimática. El enlazador particular no es un aspecto crítico de la invención. Puede usarse cualquier enlazador conocido en la técnica siempre que una el polipéptido o peptidomimético y el resto detectable entre sí durante un periodo adecuado, es decir, un periodo suficiente para que el polipéptido se una a la diana deseada y se detecte.

Los restos detectables usados en los métodos de la presente invención pueden ser cualquier resto capaz de detección directa o indirectamente en un procedimiento de formación de imágenes descrito en la presente memoria o conocido por un experto en la materia. Por ejemplo, pueden usarse los siguientes restos detectables: restos que emiten o puede provocarse que emitan una radiación detectable (por ejemplo, por desintegración radiactiva, excitación de fluorescencia, excitación de resonancia de espín, etc.), restos que afectan a los campos electromagnéticos locales (por ejemplo, especies paramagnéticas, superparamagnéticas, ferrimagnéticas o ferromagnéticas), restos que absorban o dispersen energía de radiación (por ejemplo, cromóforos, partículas (incluyendo vesículas que contienen gas o líquido), elementos pesados y compuestos de los mismos, etc.) y restos que generen una sustancia detectable (por ejemplo, generadores de microburbujas de gas).

Se conocen a partir de la técnica una variedad muy amplia de materiales detectables por modalidades de formación de imágenes, y el resto detectable se seleccionará de acuerdo con la modalidad de formación de imágenes a usar. Por lo tanto, por ejemplo, para la formación de imágenes de ultrasonido, normalmente se seleccionará un material ecogénico o un material capaz de generar un material ecogénico; para la formación de imágenes de rayos X, el resto detectable será o contendrá generalmente un átomo pesado (por ejemplo, de peso atómico 38 o superior); para la formación de imágenes de RM, el resto detectable será un isótopo de espín nuclear distinto de cero (tal como ¹⁹F) o un material que tenga espines de electrones desapareados y, por lo tanto, propiedades paramagnéticas, superparamagnéticas, ferrimagnéticas o ferromagnéticas; para la formación de imágenes de luz, el resto detectable será un dispersador de luz (por ejemplo, una partícula coloreada o no coloreada), un absorbente de luz o un emisor

de luz; para la formación de imágenes magnetométricas, el resto detectable tendrá propiedades magnéticas detectables; para la formación de imágenes de impedancia eléctrica, el resto detectable afectará a la impedancia eléctrica; y para la escintigrafía, SPECT, PET, etc., el resto detectable será un radionúclido.

- 5 Los ejemplos de restos detectables adecuados que son bien conocidos a partir de la bibliografía de formación de imágenes de diagnóstico incluyen, por ejemplo, partículas de óxido de hierro magnéticas, vesículas que contienen gas, metales paramagnéticos quelados (tales como Gd, Dy, Mn, Fe, etc.) (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nº 5.228.446; 4.647.447; 4.863.715; 4.770.183 y 5.387.080; Publicaciones PCT Nº WO 97/25073, WO 96/09840, WO 85/02772, WO 92/17212, WO 97/29783, WO 91/15243, WO 93/05818, WO 96/23524, WO 10 95/26205 y WO 96/17628; EP-A-55421 y GB 9624918.0; radionúclidos metálicos, iones de metales paramagnéticos, iones de metales fluorescentes, iones de metales pesados e iones de racimo como se describen en las Publicaciones PCT Nº WO 91/14460, WO 89/00557, WO 92/17215, WO 96/40287 y WO 96/22914; y Patentes de Estados Unidos 4.647.447, 5.367.080 y 5.364.613; restos atómicos no metálicos tales como, por ejemplo, ¹²³I, ¹³¹I y ¹⁸F y átomos pesados tales como I; restos cromofóricos o fluorofóricos orgánicos como se describen en Matsuoka, 15 Topics In Applied Chemistry: Infrared absorbing dyes (1990); Waring et al., Topics in Applied Chemistry: The Chemistry and Application of Dyes (1990); "Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals" Haugland, Molecular Probes Inc, 1996, documentos DE-A-4445065, DE-A-4326466, JP-A-3/228046, Narayanan et al., J. Org. Chem., 60: 2391-2395 (1995), Lipowska et al., Heterocyclic Comm., 1: 427-430 (1995), Fabian et al., Chem. Rev., 92: 1197 (1992); Publicación PCT Nº W096/23525: Strekowska et al., J. Org. Chem., 57: 4578-4580 (1992); y 20 Publicación PCT Nº WO 96/17628; colorantes visibles como se describen en Waring y Hallas, The Chemistry and Application of Dyes, Topics In Applied Chemistry (1990); Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6ª ed. 1996).

- Los ejemplos de modalidades de formación de imágenes adecuadas para detectar el resto detectable unido al 25 ligando incluyen, pero sin limitación, resonancia magnética, resonancia magnética nuclear, radioescintigrafía, tomografía por emisión de positrones, tomografía computarizada, fluorescencia en el infrarrojo cercano, rayos X, ultrasonidos, luz ultravioleta o luz visible, en las que la imagen del resto detectable es indicativa de la actividad de una proteasa extracelular específica (véase, por ejemplo, Dahnert, Radiology Review Manual (4ª ed. 1999); Brant et al., Fundamentals of Diagnostic Radiobiology, (2ª ed. 1999); Welssleder et al., Primer of Diagnostic Imaging, (2ª 30 ed. 1997); Buddinger et al., Medical Magnetic Resonance A Primer, Society of Magnetic Resonance, Inc.(1988); y Welssleder et al., Nature Biotech., 17: 375-378 (1999)).

- En determinadas circunstancias, puede ser deseable que el enlazador se biodegrade después de la administración. Por selección de un enlazador apropiadamente biodegradable es posible modificar los patrones de biodistribución y 35 bioeliminación para el polipéptido y/o resto detectable. Cuando el polipéptido y/o el resto detectable son biológicamente activos o son capaces de ejercer efectos no deseados si se retienen después de que haya terminado el procedimiento de formación de imágenes, puede ser deseable diseñar la biodegradabilidad del enlazador que asegure una bioeliminación o degradación metabólica apropiada del polipéptido y/o restos detectables. Por lo tanto, un enlazador puede contener una función biodegradable que tras su degradación produzca productos de 40 degradación con patrones de biodistribución modificados que sean el resultado de la liberación del resto detectable del polipéptido o de la fragmentación de una estructura macromolecular. A modo de ejemplo, los enlazadores que llevan restos de iones metálicos quelados, es posible que tengan un enlazador que incorpore una función biodegradable que tras la degradación libere un compuesto de quelato excretable que contenga el resto detectable. Por consiguiente, si se desea las funciones biodegradables pueden incorporarse dentro de la estructura del 45 enlazador, preferentemente en sitios que sean (a) sitios de ramificación, (b) en o próximo a sitios de unión para ligandos o restos detectables, o (c) de modo que la biodegradación produzca fragmentos fisiológicamente tolerables o rápidamente excretables.

XI. KITS

- 50 En otro aspecto, la presente invención proporciona kits para el tratamiento, es decir, la mejoría de uno o más síntomas de aterosclerosis. Los kits comprenden preferentemente un recipiente que contiene uno o más de los polipéptidos (o peptidomiméticos) de esta invención. El polipéptido o peptidomimético puede proporcionarse en una formulación de dosificación unitaria (por ejemplo, comprimido, comprimido encapsulado, parche, supositorio, etc.) 55 y/o puede combinarse opcionalmente con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

- El kit puede comprender además, opcionalmente, uno o más de otros agentes usados en el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con dislipidemia, hipercolesterolemia e inflamación (tal como cardiopatía y/o aterosclerosis). Dichos agentes incluyen, pero sin limitación, los expuestos anteriormente en relación con la sección 60 de "Terapia de Combinación". Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el kit puede incluir beta-bloqueantes, vasodilatadores, aspirina, estatinas, inhibidores de la ACE o inhibidores del receptor de la ACE (ARB) y similares.

- Además los kits pueden incluir opcionalmente materiales de etiquetado y/o instrucciones que proporcionen 65 instrucciones (es decir, protocolos) para la práctica de los métodos o el uso de los "agentes terapéuticos" o "agentes profilácticos" de esta invención. Los materiales de instrucciones preferidos describen el uso de uno o más polipéptidos o peptidomiméticos de esta invención, por ejemplo, para mitigar uno o más síntomas de aterosclerosis

y/o para prevenir la aparición o aumento de uno o más de dichos síntomas en un individuo en riesgo de aterosclerosis. Los materiales de instrucciones también pueden mostrar, opcionalmente, dosificaciones/regímenes terapéuticos preferidos, indicaciones de mostrador y similares.

Aunque los materiales de instrucciones comprenden típicamente materiales escritos o impresos, no se limitan a tales. Se contempla en esta invención cualquier medio capaz de almacenar dichas instrucciones y de comunicarlas a un usuario final. Dichos medios incluyen, pero sin limitación, medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, microchips, etc.), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM) y similares. Dichos medios pueden incluir direcciones a sitios de internet que proporcionen dichos materiales de instrucciones.

La invención se describirá en mayor detalle por medio de ejemplos específicos. Los ejemplos siguientes se ofrecen con fines ilustrativos y no pretenden limitar la invención de ningún modo. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente una diversidad de parámetros no críticos que pueden cambiarse o modificarse para dar esencialmente los mismos resultados.

XII. EJEMPLOS

Ejemplo 1

Actividad de flujo de salida de colesterol del polipéptido de la SEC ID N°: 4

Los polipéptidos de la presente invención se sintetizaron usando técnicas convencionales y se purificaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento. Se usaron polipéptidos compuestos todos por L-aminoácidos de origen natural para llevar a cabo todos los ejemplos siguientes, a menos que se indique otra cosa.

Para establecer características relacionadas con la actividad biológica del polipéptido de la SEC ID N°: 4, se realizaron experimentos de flujo de salida de colesterol con macrófagos que expresaban ABCA1. Macrófagos de ratón J774 marcados con [³H]colesterol se trataron (20 h) con 22-hidroxicolesterol (10 μM)/ácido cis-retinoico (10 μM) para regular positivamente la proteína ABCA1 celular. Las células con regulación positiva se lavaron y después se expusieron a concentraciones crecientes del polipéptido de SEC ID N°: 4 añadido al medio de cultivo (sin suero) en forma sin lípidos. El polipéptido estimulaba el flujo de salida de colesterol de una forma dependiente de la concentración, promoviendo niveles máximos de flujo de salida a 3 μg/ml (véase la Figura 1). El flujo de salida de colesterol se saturaba a lo largo de un estrecho intervalo de concentraciones (de 0,1 a 3 μg/ml) y se obtuvo una curva de flujo de salida de forma sigmoidea, que refleja una alta afinidad y un proceso cooperativo que implica a ABCA1.

Ejemplo 2

Actividad de flujo de salida de colesterol del polipéptido de la SEC ID N°: 4 en comparación con ApoA-I

Se realizaron experimentos para determinar la potencia relativa del polipéptido de SEC ID N°: 4 y la magnitud de su respuesta de flujo de salida de colesterol en comparación con la apoA-I de longitud completa. Macrófagos de ratón marcados con [³H]colesterol se trataron para regular positivamente la ABCA1 como se ha descrito en el Ejemplo 1. Los macrófagos marcados se expusieron posteriormente a concentraciones crecientes del polipéptido de SEC ID N°: 4 y ApoA-I basándose en la masa. El polipéptido estimulaba niveles relativamente altos de flujo de salida de colesterol a concentraciones en las que la ApoA-I era enormemente ineficaz (véase la Figura 2). Por encima de su intervalo de concentración de trabajo, el polipéptido de SEC ID N°: 4 era al menos el 300% más potente que la ApoA-I en la estimulación del flujo de salida de colesterol a partir de macrófagos que expresaban ABCA1.

Ejemplo 3

Actividad de flujo de salida de alta afinidad de los polipéptidos de las SEC ID N°: 4-6

La afinidad de los polipéptidos de las SEC ID N°: 4, 5 y 6 por ABCA1 se evaluó por determinación de los valores de Km para la actividad de promoción del flujo de salida de colesterol celular. Los macrófagos de ratón se marcaron con [³H]colesterol y se trataron con un análogo de AMPc para inducir la expresión de ABCA1. Se realizaron experimentos de flujo de salida de colesterol (4 h) con las células marcadas y por aumento de la concentración de los polipéptidos de las SEC ID N°: 4-6 y de apoA-I y apoE3 de longitud completa en el medio extracelular. Se calcularon los valores de Km usando la ecuación de Michaelis-Menton y el programa informático GraphPad Prism4. Los valores de Km para los péptidos eran considerablemente inferiores (4-5 veces) que para las apolipoproteínas intactas cuando se expresaban en base a masa (es decir, μg/ml), reflejando altos niveles de flujo de salida de colesterol a concentraciones relativamente bajas de los polipéptidos de las SEC ID N°: 4-6 (véase la Figura 3). La acción ejemplar de estos polipéptidos estaba reflejada por los valores de Km expresados en unidades molares. Los polipéptidos de las SEC ID N°: 4-6 estimulaban el flujo de salida de colesterol a partir de macrófagos que expresaban ABCA1 con gran eficacia con una actividad similar a la de Apo A-I, Apo E de longitud completa, y el

dominio C-terminal (CT) de Apo E en una base por molécula.

Ejemplo 4

5 Actividad dirigida a ABCA1 de los polipéptidos de las SEC ID N°: 4 y 5

Para verificar que los péptidos de la presente invención, como se ejemplifica por los polipéptidos de la SEC ID N°: 4 y de la SEC ID N°: 5, presentaban una actividad dirigida hacia ABCA1, se usaron macrófagos de ratón (véase el panel izquierdo de la Figura 4) y células HeLa transfectadas con ADNc de ABCA1 (véase el panel derecho de la Figura 4) en experimentos de flujo de salida de colesterol. La capacidad de los polipéptidos de las SEC ID N°: 4-6 para estimular el flujo de salida de colesterol (8 horas) en ausencia y presencia de ABCA1 se evaluó usando concentraciones saturantes relativamente elevadas de péptidos que estaban en un exceso >30 veces respecto a los valores de Km. El gran exceso de polipéptidos se proporcionó para determinar el grado (si existía) de flujo de salida inespecífico en ausencia de inducción de ABCA1. En estas condiciones, los polipéptidos requerían ABCA1 para su actividad, al igual que las apolipoproteínas E2, E3, E4 y A-I. Además, la actividad inespecífica en ausencia de ABCA1 era mínima y similar a la de las apolipoproteínas de longitud completa nativas.

Ejemplo 5

20 El polipéptido de la SEC ID N°: 4 estabiliza la proteína ABCA1 de macrófagos

Para ensayar si los polipéptidos de la presente invención estabilizan las concentraciones de proteína ABCA1 celular, macrófagos de ratón J774 se trataron con un análogo de AMPc (24 h) para regular positivamente la expresión de ABCA1. Las células se incubaron posteriormente durante 6 horas en medio sin suero (sin estímulo de AMPc) con y sin el polipéptido de la SEC ID N°: 4. Se determinó la proteína ABCA1 en lisados celulares por análisis de transferencia de Western. La incubación con medio sin suero en solitario producía una disminución marcada en la proteína ABCA1 en comparación con los niveles basales en macrófagos expuestos continuamente a AMPc en suero bovino fetal al 1%. La presencia del polipéptido de la SEC ID N°: 4 en el medio extracelular prevenía la desaparición de proteína ABCA1 de forma similar a la Apo A-I, lo que concuerda con la actividad de estabilización de ABCA1 y a diferencia de las incubaciones con medio sin suero solamente (véase la Figura 5).

Ejemplo 6

35 El pretratamiento con polipéptido de SEC ID N°: 4 de macrófagos aumenta el flujo de salida de colesterol respecto a Apo A-I

Para determinar si el acondicionamiento de macrófagos con el polipéptido de SEC ID N°: 4 regula positivamente el flujo de salida de colesterol respecto a las apolipoproteínas nativas, macrófagos J774 marcados con [³H]colesterol se indujeron para la respuesta de ABCA1 usando un análogo de AMPc (24 h). Esto estaba seguido de un tratamiento de 4 horas (sin AMPc) con medio sin suero solamente o medio que contenía el polipéptido de SEC ID N°: 4. Después de 4 h sin AMPc, se inició el flujo de salida de colesterol por adición de medio recién preparado que contenía Apo A-I (10 µg/ml). El pretratamiento con polipéptido de SEC ID N°: 4 produjo un aumento del 40% en el flujo de salida de colesterol mediado por Apo A-I de los macrófagos en comparación con el pretratamiento con medio sin suero solamente (véase la Figura 6). Se obtuvo un aumento similar en el flujo de salida de colesterol mediado por Apo A-I cuando los macrófagos se preexpusieron a complejos de polipéptido de SEC ID N°: 4:POPC.

Ejemplo 7

50 Actividad de flujo de salida de colesterol de los polipéptidos de la presente invención

Se realizaron experimentos adicionales para determinar si los polipéptidos de la presente invención presentaban cada uno una alta capacidad para estimular el flujo de salida de colesterol a partir de macrófagos que expresaban ABCA1. Cuando se añadían a macrófagos de ratón marcados con [³H]colesterol en forma sin lípidos a una concentración de 3 µg/ml, los polipéptidos de las SEC ID N°: 4-7 estimulaban altos niveles de flujo de salida de colesterol celular (véase la Figura 7). Por lo tanto, cada uno de los polipéptidos ejemplares de la presente invención con sustituciones conservativas de aminoácidos hidrófobos presentaba la misma capacidad para estimular el flujo de salida de colesterol.

Ejemplo 8

60 Actividad de flujo de salida de colesterol de polipéptidos truncados

Para evaluar el impacto de la delección de aminoácidos, se eliminaron de forma secuencial aminoácidos individuales del extremo C-terminal del polipéptido de la SEC ID N°: 5. Macrófagos de ratón marcados con [³H]colesterol se trataron para regular positivamente la proteína ABCA1 como se ha descrito en el Ejemplo 1. Los macrófagos que expresaban ABCA1 se expusieron a 3 µg/ml del polipéptido sin lípidos de SEC ID N°: 5 y a sus formas truncadas.

Los polipéptidos de 25 y 24 aminoácidos que carecían de la Ser26 y de la Lys25-Ser26 C-terminales, respectivamente, conservaban una alta capacidad para estimular el flujo de salida de colesterol como el polipéptido de 26 aminoácidos de la SEC ID N°: 5 (véase la Figura 8). Por el contrario, la delección de tres o más restos del extremo C-terminal (de 23, 22 y 18 aminoácidos) producía polipéptidos que eran débilmente activos. El polipéptido de 24 aminoácidos de SEC ID N°: 5 estimulaba el flujo de salida de colesterol de una forma dependiente de ABCA1 (panel del medio) y con gran eficacia (panel derecho), alcanzando niveles máximos de flujo de salida a partir de macrófagos que expresaban ABCA1 a 3 µg/ml. Por lo tanto, los restos aminoacídicos 1-24 constituyen una secuencia de núcleo que es capaz de mantener la actividad biológica.

Ejemplo 9

Análogos retroinvertidos y de D-aminoácidos del polipéptido de la SEC ID N°: 4 estimulan el flujo de salida de colesterol de ABCA1

Se ensayaron péptidos de secuencia invertida sintetizados con todo L-aminoácidos y todo D-aminoácidos para determinar la actividad de flujo de salida de colesterol usando macrófagos J774 que expresaban ABCA1. La secuencia de los péptidos invertidos era la siguiente: SKLRALFEEAFERFAAFWEELKSRVE, que son los aminoácidos de la SEC ID N°: 4 (es decir, AT15261) en orden inverso. Con fines comparativos, el polipéptido de la SEC ID N°: 4 se sintetizó con todo D-aminoácidos y se ensayó para determinar la actividad de flujo de salida de colesterol. A concentraciones extracelulares relativamente altas (30 µg/ml), los péptidos de secuencia invertida (formas de L- y D-aminoácidos) estimulaban el flujo de salida de colesterol de una forma dependiente de ABCA1 (véase la Figura 9). De forma similar, el polipéptido de la SEC ID N°: 4 compuesto todo por D-aminoácidos promovía el flujo de salida de colesterol de ABCA1 como el polipéptido de la SEC ID N°: 4 compuesto todo por L-aminoácidos. Además, los análogos de L y D-aminoácidos del polipéptido de la SEC ID N°: 4 estimulaban el flujo de salida de colesterol eficazmente, alcanzando niveles máximos de flujo de salida a 3 µg/ml.

Ejemplo 10

Los restos de ácido aspártico pueden sustituir al glutamato sin pérdida de actividad

Se realizaron experimentos usando el polipéptido de la SEC ID N°: 5 para determinar si sustituciones de aminoácidos conservativas que implicaban a aminoácidos ácidos podían mantener la actividad de flujo de salida de colesterol de ABCA1. Se obtuvieron por ingeniería genética dos análogos peptídicos; el primero sustituyendo los restos de ácido glutámico (E) en las posiciones 8 y 15 con restos de ácido aspártico (D), es decir, polipéptidos E8, 15>D, y el segundo, sustituyendo E1, 7, 8, 15, 18, 19 con D, es decir, un polipéptido de todo D (Asp). Se determinó la actividad de flujo de salida de colesterol usando macrófagos J774 tratados con y sin un análogo de AMPc para modular la expresión de ABCA1. Ambos mutantes polipeptídicos con sustituciones de ácido aspártico conservaban una alta capacidad para estimular el flujo de salida de colesterol de una forma dependiente de ABCA1 similar a la del polipéptido de la SEC ID N°: 5 (es decir, el polipéptido S1) (véase la Figura 10). Se consiguieron niveles máximos de flujo de salida de colesterol a concentraciones de 3 µg/ml usando los polipéptidos de ácido aspártico y macrófagos tratados con AMPc, lo que indica que los análogos polipeptídicos con sustituciones de restos ácidos conservativas estimulaban eficazmente el flujo de salida de colesterol de ABCA1.

Ejemplo 11

Importancia de restos ácidos en los polipéptidos de la presente invención

Para ensayar si eran necesarios aminoácidos ácidos para conferir la actividad de flujo de salida de colesterol de ABCA1, se usó el polipéptido de la SEC ID N°: 5 para crear mutantes específicos de sitio. Se descubrió que la actividad de flujo de salida de ABCA1 dependía del número de restos ácidos en el polipéptido de la SEC ID N°: 5. La sustitución de un solo resto de glutamato (E) con un resto de glutamina (Q), que no está cargado, aumentaba la actividad inespecífica del polipéptido de la SEC ID N°: 5 a juzgar por un aumento en el flujo de salida de colesterol en ausencia de regulación positiva de ABCA1 en los macrófagos (véase la Figura 11). El aumento en el flujo de salida inespecífico se aumentaba adicionalmente cuando dos restos de glutamato ácidos en el polipéptido de la SEC ID N°: 5 se sustituían con restos de glutamina (E8, 15→Q8, 15). Estos datos indican que la especificidad por ABCA1 se correlaciona con el número de restos ácidos, tales como restos de glutamato (o restos de aspartato) en el polipéptido.

Ejemplo 12

Los restos de lisina pueden sustituir a arginina en los polipéptidos de la presente invención sin pérdida de actividad

Para ensayar si sustituciones de aminoácidos conservativas que implicaban a restos cargados positivamente afectaban a la actividad de flujo de salida de colesterol, los polipéptidos de la presente invención, ejemplificados por

el polipéptido de la SEC ID N°: 5, se sintetizaron con restos de lisina (K) en lugar de arginina (R) en las posiciones 3, 14 y 23. El análogo del polipéptido de la SEC ID N°: 5 que poseía las triples sustituciones R3, 14, 23→K3, 14, 23 estimulaba el flujo de salida de colesterol de ABCA1 a partir de macrófagos tratados con AMPc de forma similar al polipéptido precursor de SEC ID N°: 5 (véase la Figura 12). Se observó un flujo de salida reducido con ambos polipéptidos usando células no inducidas para la respuesta de ABCA1 (es decir, sin AMPc). El polipéptido con sustituciones de lisina también estimulaba el flujo de salida de colesterol de ABCA1 eficazmente, alcanzando niveles máximos de flujo de salida a 3 µg/ml de polipéptido.

Ejemplo 13

Importancia de los restos catiónicos para la actividad de flujo de salida de colesterol de ABCA1

El polipéptido de la SEC ID N°: 5 se obtuvo por ingeniería genética con sustituciones de arginina (R) a glutamina (Q) para determinar si eran necesarios restos cargados positivamente para mediar el flujo de salida de colesterol de ABCA1. Se realizaron sustituciones individuales de R→Q en las posiciones 3, 14 y 23 en la secuencia lineal del polipéptido de SEC ID N°: 5, sustituyendo de este modo un aminoácido cargado positivamente con un aminoácido polar sin carga. Los polipéptidos con una sola sustitución de R→Q, R3→Q, R14→Q y R23→Q, mediaban todos el flujo de salida de colesterol de una forma dependiente de ABCA1 similar a la del polipéptido precursor de SEC ID N°: 5 cuando se usaban a una concentración de 30 µg/ml (véase la Figura 13). Además, los polipéptidos con la sustitución de glutamina única estimulaban el flujo de salida de colesterol de ABCA1 con gran eficacia a juzgar por las curvas de dependencia de la concentración. Por el contrario, cuando se cambiaban simultáneamente múltiples restos de arginina a glutamina dentro del polipéptido de la SEC ID N°: 5, es decir, triple R3, 14, 23→Q3, 14, 23, el polipéptido tenía una capacidad de flujo de salida enormemente reducida y una eficacia de flujo de salida reducida.

Ejemplo 14

El polipéptido de la SEC ID N°: 4 soporta sustituciones de aminoácidos hidrófobos en la superficie de contacto de lípido-agua

Se usaron polipéptidos de 26 y 24 aminoácidos correspondientes al polipéptido de la SEC ID N°: 4 para explorar adicionalmente la importancia de las cargas positivas de superficies de contacto, sustituyendo la arginina en la posición 3 con aminoácidos hidrófobos, es decir, polipéptidos R3>L y R3>F, ampliando de este modo el área de unión a lípidos no polar del polipéptido. El impacto de la sustitución A12>L también se ensayó para determinar su actividad, que también ampliaba el área de superficie no polar. En consonancia con los resultados presentados en el Ejemplo 13 anterior, los polipéptidos de sustitución R3 estimulaban niveles relativamente altos de flujo de salida de colesterol a partir de macrófagos que expresaban ABCA1 (es decir, más AMPc); mientras que se observaron bajos niveles de flujo de salida de colesterol a partir de macrófagos no inducidos para la respuesta de ABCA1 (sin AMPc) (véase la Figura 14). Los análogos de sustitución A12>L del polipéptido de la SEC ID N°: 4, es decir, las formas de 26 y 24 aminoácidos, también estimulaban el flujo de salida de colesterol de macrófagos de una forma dependiente de ABCA1.

Ejemplo 15

Las sustituciones de aminoácidos polares sin carga mantienen la actividad de flujo de salida de ABCA1

Se ensayaron sustituciones que implicaban a restos polares sin carga localizados hacia la mitad de la superficie polar del polipéptido de la SEC ID N°: 4 para determinar la retención de la actividad de flujo de salida de colesterol de ABCA1. La sustitución de serina con tirosina (Y) en la posición 26 creaba un polipéptido, es decir, S26>Y, que estimulaba el flujo de salida de colesterol de ABCA1 como el polipéptido de 26 aminoácidos precursor de la SEC ID N°: 4 (panel derecho de la Figura 15). De una forma similar, las sustituciones de serina a alanina en las posiciones 4 y 26 producían un polipéptido (S4, 26>A) que conservaba la actividad de flujo de salida de colesterol dependiente de ABCA1. El péptido de núcleo de 24 aminoácidos con la sustitución S4>A también conservaba una alta capacidad para estimular el flujo de salida de colesterol de ABCA1; mientras que se obtuvieron bajos niveles de flujo de salida de colesterol en ausencia de regulación positiva de ABCA1 (sin AMPc). Todos los polipéptidos con sustituciones S>A o S>Y estimulaban el flujo de salida de colesterol eficazmente a partir de macrófagos que expresaban ABCA1, alcanzando niveles máximos de flujo de salida a concentraciones de 3 µg/ml (panel izquierdo de la Figura 15).

Ejemplo 16

Las sustituciones con aminoácidos sin carga polares y no polares mantienen la actividad de flujo de salida de ABCA1

La posición 11, es decir, A, en el polipéptido de la SEC ID N°: 4 puede sustituirse con otros aminoácidos no polares (hidrófobos), así como con otros aminoácidos sin carga polares. Por ejemplo, la sustitución A11>Y11 da como resultado un polipéptido que tiene propiedades farmacocinéticas idénticas usando un modelo de desintegración

monofásico (véase la Figura 16).

Ejemplo 17

5 La actividad de flujo de salida de colesterol de complejos de polipéptidos-fosfolípidos

Se usó 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (POPC) para evaluar las propiedades de flujo de salida de colesterol de un polipéptido formulado de la presente invención. El polipéptido de la SEC ID N°: 4 se combinó con POPC para crear partículas sintéticas usando un procedimiento de diálisis con colato modificado. La electroforesis en gradiente no desnaturalizante (geles de poliacrilamida al 4-20%) indicaba que los complejos de polipéptidos:POPC tenían un tamaño de 7-8 nm. En condiciones de tiempos de procesamiento cortos, el polipéptido sin lípidos migraba como una sola banda y más hacia el gel en comparación con los complejos de polipéptidos-POPC. Estos resultados proporcionan pruebas de que las preparaciones de complejos de POPC no estaban contaminadas con polipéptido sin lípidos. Para ensayar la actividad de flujo de salida de colesterol, se marcaron macrófagos de ratón J774 con [³H]colesterol y se trataron con y sin AMPc para modular la expresión de ABCA1. El polipéptido formulado con POPC poseía una capacidad ~5 veces mayor para estimular el flujo de salida de colesterol en comparación con el polipéptido sin lípidos de la SEC ID N°: 5 cuando se usaba a concentraciones de 50 y 100 µg/ml (véase la Figura 17). Curiosamente, un componente de la respuesta de flujo de salida a los complejos de polipéptidos:POPC dependía de la actividad de ABCA1, ya que se observaba un mayor flujo de salida de colesterol a partir de macrófagos tratados con AMPc en comparación con macrófagos de control (sin AMPc).

Ejemplo 18

Efectos *in vivo* del polipéptido de la SEC ID N°: 4 sobre la aterosclerosis establecida

Ratones macho deficientes en apolipoproteína E (Apo E -/-) (seis semanas de edad) se alimentaron con una dieta de alto contenido en grasa durante 26 semanas. Durante las últimas 6 semanas con la dieta de alto contenido en grasa, los ratones recibieron inyecciones intraperitoneales (IP) de solución salina o del polipéptido de la SEC ID N°: 4 (10 mg/kg) a intervalos de 2 días. Los ratones a los que se les inyectó solamente solución salina (control) poseían una aterosclerosis un 38% superior en comparación con ratones que recibían el polipéptido de la SEC ID N°: 4. El efecto del polipéptido reduciendo la aterosclerosis establecida era altamente significativo, a juzgar por el contenido de lípidos de las placas en el seno aórtico (véase la Figura 8). Esto se logró usando el polipéptido sin lípidos de la SEC ID N°: 4 compuesto todo por L-aminoácidos administrado en presencia continua de la agresión dietética. Por lo tanto, el polipéptido de SEC ID N°: 4 reducía el contenido de lípidos de placas aórticas en ratones hipercolesterolémicos que poseían niveles sustanciales de aterosclerosis.

Ejemplo 19

Los polipéptidos de la presente invención tienen efectos ateroscleróticos significativos

El polipéptido de la SEC ID N°: 4 y su análogo Y26 se han evaluado con respecto a la capacidad para inhibir la aterosclerosis en ratones *knock out* para apolipoproteína E. A los ratones se les administró una dieta occidental durante 18 semanas y después se aleatorizaron para recibir solución salina, polipéptido libre o complejo de polipéptido-fosfolípido. La dosis de 30 mg/kg de peso corporal de polipéptido administrado IP, basándose en la biodisponibilidad del 40%, corresponde a una inyección IV de 12 mg/kg y se administró cada dos días durante 6 semanas en los primeros dos estudios y cada día durante 3 semanas en el tercer estudio. El grado de aterosclerosis se determinó después en toda la aorta y en raíz/seno aórtico. Se realizaron tres series experimentales. Los datos combinados mostraban que tanto el polipéptido libre como el complejo de polipéptido-fosfolípido tenían efectos anti-ateroscleróticos significativos (véanse las Figura 19A y 19B). Los resultados son iguales o mejores que los que se han obtenido previamente con infusiones IV de complejo de apolipoproteína **A-I** Milano/fosfolípidos 40 mg/kg en ratones *knock out* para Apo E (Shah et al., Circ., 97: 780-5, 1998).

Como se ha señalado anteriormente, se combinaron los datos de tres series experimentales. La combinación de datos está justificada ya que sólo se realizaron cambios minoritarios en los procedimientos (21 inyecciones a 30 mg/kg durante 42 y 21 días, respectivamente) y los regímenes dietéticos y fuentes de ratones y polipéptido, respectivamente, eran los mismos. En el primer experimento el S26 sustituyó al Y26.

Ejemplo 20

60 Efectos *in vivo* del polipéptido de SEC ID N°: 4 sobre el flujo de salida de colesterol y el RCT

Se usaron ratones deficientes en apolipoproteína E (ApoE -/-) a los 6 meses de edad para evaluar la capacidad del polipéptido de SEC ID N°: 4 para estimular el flujo de salida de colesterol y el Transporte Inverso de Colesterol (RCT) *in vivo*. Se inyectaron macrófagos-células espumosas marcados con [³H]colesterol (es decir, cargadas con LDL acetiladas) en la cavidad intraperitoneal (IP) de ratones Apo E -/- en presencia y ausencia del polipéptido de SEC ID N°: 4 (20 mg/kg). El polipéptido estimulaba el flujo de salida de colesterol *in vivo*, a juzgar por un aumento

pronunciado (2 veces) en los niveles de [3 H]colesterol derivado de macrófagos que aparecían en plasma a las 8 y 24 horas post-inyección en comparación con vehículo de solución salina solamente (véase la Figura 20). Esto estaba acompañado por un aumento superior a 2 veces en la secreción de esterol fecal a las 8 y 24 h. En general, los efectos del péptido eran relativamente duraderos, persistiendo hasta 48 h.

Ejemplo 21

El polipéptido de la SEC ID N°: 4 y los complejos de polipéptido N°: 4:POPC reducen la aterosclerosis establecida en ratones

Comenzando a las 6 semanas de edad, ratones *knock out* para LDLr se alimentaron con una dieta occidental de alto contenido en grasa durante 26 semanas. Después de la exposición dietética, los ratones se cambiaron a pienso convencional durante 6 semanas. Durante las 6 semanas con dieta de pienso, a los ratones se les inyectó IP cada día el polipéptido de la SEC ID N°: 4 o complejos de un polipéptido de SEC ID N°: 4:POPC a una dosis de 30 mg/kg. Los ratones de control recibieron inyecciones IP con vehículo de PBS solamente. Después se evaluó la presencia de lesiones de placas en toda la aorta. Los resultados muestran que después de 6 semanas de tratamiento, el polipéptido de la SEC ID N°: 4 reducía el área de lesiones de placas a lo largo de toda la aorta. Se observó una reducción similar en la aterosclerosis en animales que recibieron los complejos de polipéptido de SEC ID N°: 4:POPC.

Ejemplo 22

Los polipéptidos de la presente invención tienen propiedades antiinflamatorias

A ratones deficientes en apolipoproteína E (ApoE -/-) a las 6 semanas de edad se les administró una dieta occidental durante 18 semanas antes de comenzar el tratamiento. Una vez al día se administraron inyecciones intraperitoneales como solución salina o el polipéptido de la SEC ID N°: 4 (n = 6-7 por grupo). A la finalización se recogió el suero y se analizó para determinar la concentración de interleucina 6 mediante un inmunoensayo de perlas fluorescentes que utilizaba citometría de flujo (BMS820FF). Los ratones tratados con el polipéptido de la SEC ID N°: 4 tenían niveles en suero de IL-6 aproximadamente un 68% inferiores (véase la Figura 22).

Ejemplo 23

El polipéptido de la SEC ID N°: 4 tiene una semivida en suero prolongada

Este ejemplo demuestra que los péptidos de la invención tienen una semivida en suero prolongada. Una versión yodada del polipéptido de la SEC ID N°: 4, que se modificó para que tuviera un resto Y en el extremo C-terminal, se administró por vía intravenosa a ratas Sprague-Dawley. La cinética reflejó una eliminación bifásica, que es típica de los péptidos. Después de una fase de eliminación inicial durante las primeras 2,5 horas, con una semivida de 4,5 horas, se observó una semivida terminal de aproximadamente 34 horas. Este patrón de distribución se parece al que se ha descrito para ApoA-I y HDL. Se calculó que la semivida del péptido cuando se administraba IP era de aproximadamente 11,2 horas (véase la Figura 23).

La Tabla I muestra los parámetros farmacocinéticos obtenidos cuando el péptido AT5261/Y26 se administraba IP. La Tabla 2 muestra los parámetros farmacocinéticos para el péptido AT5261/Y26 cuando se administraba IV.

Tabla I. Parámetros farmacocinéticos para la administración IP. Intervalo de tiempo, 0-30 horas.

Parámetro	Péptido de SEC ID N°: 4/26
Correlación	-1,00
Semivida, horas	11,2
AUC Residual	15,9
Biodisponibilidad, %	37,6

La biodisponibilidad en porcentaje se calculó a partir del área bajo la curva IP como divida por el área bajo la curva IV después del ajuste para la actividad residual, y la biodisponibilidad era de aproximadamente el 40%.

Tabla II. Parámetros farmacocinéticos para la administración IV. Se toma un intervalo de 0-2,5 horas como primera fase y de 2,5-24 horas como segunda fase.

Parámetro	SEC ID Nº: 4/Y26 0-2,5 horas	SEC ID Nº: 4/Y26 2,5-24 horas
Correlación	-0,95	-0,95
Semivida, horas	4,5	33,7
Aclaramiento ml/kg/hora		1,2
Volumen de distribución ml/kg		55,7
AUC residual		61,5

5 La distribución de volumen calculada es aproximadamente el doble de grande que el volumen plasmático, lo que indica una distribución extravascular sustancial.

10 Los datos ejemplares proporcionados anteriormente, por ejemplo, demuestran que los polipéptidos de la invención tienen una semivida prolongada y demuestran su eficacia *in vivo*. Además, los estudios de toxicología no muestran signos de rotura celular o hemólisis a pesar de la exposición por inyecciones de dosis >10x la dosis terapéutica. Mediante un bajo flujo de salida de colesterol inespecífico y la ausencia de efectos de detergente, la estabilidad de la membrana celular se conserva a pesar de la potente eliminación de colesterol de las células.

15 Debe entenderse que la descripción anterior pretende ser ilustrativa y no restrictiva. Serán evidentes muchas realizaciones para los expertos en la materia tras leer la descripción anterior. El alcance de la invención debería determinarse, por lo tanto, no con referencia a la descripción anterior, sino que en su lugar debería determinarse con referencia a las reivindicaciones adjuntas, junto con el alcance completo de los equivalentes a los que dan derecho dichas reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado que tiene actividad de flujo de salida de colesterol y actividad de estabilización de ABCA1, en el que el polipéptido comprende:

(a) la secuencia de aminoácidos siguiente:

X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄ (SEC ID N°: 11)

en la que:

X₁, X₇, X₈, X₁₅, X₁₈ y X₁₉ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en E y D;

X₂, X₆, X₉, X₁₀, X₁₂, X₁₃, X₁₆, X₁₇, X₂₀, X₂₁ y X₂₄ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en A, V, L, I, F, W, M y P;

X₃, X₅, X₁₄ y X₂₃ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en R, K, A, V, L, I, F, W, M, P, G, S, T, C, Y, N y Q, en la que al menos dos de X₃, X₅, X₁₄ y X₂₃ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en R y K; y

X₄, X₁₁ y X₂₂ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en S, T, G, A e Y;

en la que cuando está presente una prolina, está presente en una sola posición; o

(b) la variante de la SEC ID N°: 4, 5, 6 ó 7 que está sustituida con restos aminoacídicos conservativos y tiene una identidad de al menos el 75%, al menos el 85% o al menos el 90% con EVRSKLEEWFAAFREFFAEEFLARLKS (SEC ID N°: 4), EVRSKLEEWFAAFREFFEFLARLKS (SEC ID N°: 5), EFRSKLEEWFAAFREFFEFLARLKS (SEC ID N°: 6); o EFRSKLEEWFAAFREFFAEEFLARLKS (SEC ID N°: 7); en la que cuando está presente una prolina, está presente en una sola posición.

2. El polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 1 parte (a), en el que

(a) X₂, X₆, X₉, X₁₀, X₁₂, X₁₃, X₁₆, X₁₇, X₂₀, X₂₁ y X₂₄ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en A, V, L, F y W, o

X₂, X₆, X₉, X₁₀, X₁₂, X₁₃, X₁₆, X₁₇, X₂₀, X₂₁ y X₂₄ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en A, L, F y W; y/o

(b) al menos tres de X₃, X₅, X₁₄ y X₂₃ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en R y K, o

X₃, X₅, X₁₄ y X₂₃ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en R, K, L y F, en el que al menos dos de X₃, X₅, X₁₄ y X₂₃ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en R y K; y/o

(c) X₄, X₁₁ y X₂₂ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en S, A e Y, o X₄, X₁₁ y X₂₂ son cada uno A.

3. El polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 1 parte (a), en el que dicho polipéptido aislado comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:

X₁X₂X₃SX₅X₆X₇X₈X₉X₁₀AAX₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀LAX₂₃X₂₄ (SEC ID N°: 1) en la que:

X₁, X₇, X₈, X₁₅, X₁₈ y X₁₉ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en E y D;

X₂ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F, V, L y W;

X₃, X₅, X₁₄ y X₂₃ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en R y K;

X₆, X₉, X₁₀, X₁₃, X₁₆, X₂₀ y X₂₄ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en L, F y W; y

X₁₇ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F, A, L y W.

4. El polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho polipéptido aislado comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:

X₁X₂X₃SX₅LX₇X₈WFAAFX₁₄X₁₅FX₁₇X₁₈X₁₉FLAX₂₃L (SEC ID N°: 2)

en la que:

X₁, X₇, X₈, X₁₅, X₁₈ y X₁₉ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en E y D;

X₂ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F y V;

X₃, X₅, X₁₄ y X₂₃ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en R y K; y

X₁₇ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F y A.

5. El polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho polipéptido aislado comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:

EX₂RSKLEEWFAAFREFX₁₇EEFLARL (SEC ID N°: 3) en la que:

X₂ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F y V; y

X₁₇ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F y A.

6. El polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 1 parte (a) o cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, que comprende además X₂₅ y X₂₆ en el extremo carboxi terminal, en el que X₂₅ es un aminoácido seleccionado independientemente del grupo que consiste en R, K, A, V, L, I, F, W, M, P, G, S, T, C, Y, N y Q, y X₂₆ es un aminoácido seleccionado independientemente del grupo que consiste en S, C, T, G, A e Y, opcionalmente en el que

(a) X₂₅ es K y X₂₆ es S; o

(b) X₂₅ o X₂₆ es C.

7. El polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 1 parte (a) o cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que el polipéptido

(a) tiene una identidad de al menos el 75% con

EVRSKLEEWFAAFREFAEFLARLKS (SEC ID N°: 4) ,

EVRSKLEEWFAAFREFFEFLARLKS (SEC ID N°: 5),

EFRSKLEEWFAAFREFFEFLARLKS (SEC ID N°: 6); o

EFRSKLEEWFAAFREFAEFLARLKS (SEC ID N°: 7);

(b) comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6 o SEC ID N°: 7;

(c) tiene una identidad de al menos el 75%, de al menos el 85% o de al menos el 90% con

EVRSKLEEWFAAFREFAEFLARL (SEC ID N°: 12),

EVRSKLEEWFAAFREFFEFLARL (SEC ID N°: 13),

EFRSKLEEWFAAFREFFEFLARL (SEC ID N°: 14), o

EFRSKLEEWFAAFREFAEFLARL (SEC ID N°: 15); o

(d) comprende la secuencia de aminos de la SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13, SEC ID N°: 14 o SEC ID N°: 15.

8. El polipéptido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido comprende además un grupo protector, opcionalmente en el que:

el grupo protector es un grupo protector seleccionado del grupo que consiste en acetilo (Ac), amida, grupos alquilo de 3 a 20 carbonos, Fmoc, t-butoxicarbonilo (Tboc), grupo 9-fluorenoacetilo, grupo 1-fluorenocarboxílico, grupo 9-fluorenocarboxílico, grupo 9-fluorenona-1-carboxílico, benciloxicarbonilo, xantilo (Xan), tritilo (Trt), 4-metiltritilo (Mtt), 4-metoxitritilo (Mmt), 4-metoxi-2,3,6-trimetil-bencenosulfonilo (Mtr), mesitilen-2-sulfonilo (Mts), 4,4-dimetoxibenzhidrido (Mbh), tosilo (Tos), 2,2,5,7,8-pentametil croman-6-sulfonilo (Pmc), 4-metilbencilo (MeBzl), 4-metoxibencilo (MeOBzl), benciloxi (BzIO), bencilo (Bzl), benzoílo (Bz), 3-nitro-2-piridinosulfonilo (Npys), 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)etilo (Dde), 2,6-diclorobencilo (2,6-DiCl-Bzl), 2-clorobenciloxicarbonilo (2-Cl-Z), 2-bromobenciloxicarbonilo (2-Br-Z), benciloximetilo (Bom), ciclohexiloxi (cHxO), t-butoximetilo (Bum), t-butoxi (tBuO), t-butilo (tBu) y trifluoroacetilo (TFA); y, opcionalmente, en el que

(a) el grupo protector está acoplado con el extremo amino o carboxi terminal;

(b) el polipéptido comprende un primer grupo protector acoplado al extremo amino terminal y un segundo grupo protector acoplado al extremo carboxilo terminal;

(c) el polipéptido comprende un primer grupo protector acoplado al extremo amino terminal y un segundo grupo protector acoplado al extremo carboxilo terminal, en el que dicho primer grupo protector es un grupo protector seleccionado del grupo que consiste en acetilo, propionilo y un alquilo de 3 a 20 carbonos;

(d) el polipéptido comprende un primer grupo protector acoplado al extremo amino terminal y un segundo grupo protector acoplado al extremo carboxilo terminal, en el que dicho primer grupo protector es un acetilo; o

(e) el polipéptido comprende un primer grupo protector acoplado al extremo amino terminal y un segundo grupo protector acoplado al extremo carboxilo terminal, en el que dicho segundo grupo protector es una amida.

9. El polipéptido aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que

(a) todos los aminoácidos enantioméricos son "D" aminoácidos; o

(b) los aminoácidos enantioméricos son una mezcla de "L" aminoácidos y "D" aminoácidos.

10. El polipéptido aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido

(a) protege a los fosfolípidos de la oxidación por un agente oxidante; y/o

(b) tiene actividad antiinflamatoria.

11. Un peptidomimético de un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el peptidomimético tiene actividad de flujo de salida de colesterol y actividad estabilizante de ABCA1 y

el peptidomimético es el análogo retro-inverso o el análogo retro-enantio del polipéptido; o

el peptidomimético incluye al menos un enlace de cadena principal que no es un enlace amida en la dirección de

amino a carboxi respecto al polipéptido de origen natural, o al menos un enlace de cadena principal que no es un enlace amida.

5 12. Una composición que comprende un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o un peptidomimético de la reivindicación 11 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, opcionalmente en el que dicha composición comprende además un agente terapéutico para tratar una enfermedad cardiovascular, tal como un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en una estatina, un agente de unión a ácidos biliares, un inhibidor de la agregación plaquetaria, nicotinamida, un activador de PPAR, vitamina E y combinaciones de los mismos.

10 13. Una composición que comprende un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o un peptidomimético de la reivindicación 11 formando un complejo con un lípido, en el que opcionalmente dicho lípido es un fosfolípido tal como 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina ("POPC").

15 14. Un método de generación de una variante polipeptídica que tenga actividad de flujo de salida de colesterol y/o actividad de estabilización de ABCA, comprendiendo dicho método:

(a) proporcionar un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10;
 20 (b) modificar al menos una posición de aminoácido de dicho polipéptido para generar una variante polipeptídica;
 (c) explorar dicha variante polipeptídica para determinar la actividad de flujo de salida de colesterol y/o la actividad de estabilización de ABCA;
 (d) seleccionar dicha variante polipeptídica que tiene al menos el 80% de la actividad de flujo de salida de colesterol del polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y/o seleccionar dicha variante
 25 polipeptídica que tiene al menos el 80% de la actividad de estabilización de ABCA del polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10; y
 sintetizar la variante polipeptídica seleccionada.

30 15. Un kit para tratar un síntoma de aterosclerosis, comprendiendo dicho kit un recipiente que contiene un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o un peptidomimético de la reivindicación 11, opcionalmente en el que

(a) el kit comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable; o
 35 (b) dicho polipéptido está combinado con un vehículo farmacéuticamente aceptable en una formulación de dosificación unitaria.

16. Un polipéptido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o un peptidomimético de la reivindicación 11 para su uso en un método de terapia para un trastorno tal como:

40 (a) un trastorno asociado con dislipidemia;
 (b) un trastorno del flujo de salida de colesterol;
 (c) hipercolesterolemia;
 (d) inflamación;
 (e) aterosclerosis o un síntoma de aterosclerosis; o
 45 (f) una placa vulnerable.

17. Uso de un polipéptido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o un peptidomimético de la reivindicación 11 para unirse a ABCA *in vitro*.

50 18. Un ligando de afinidad detectable que comprende un polipéptido aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o un peptidomimético de la reivindicación 11 unido directa o indirectamente a un resto detectable, opcionalmente en el que dicho marcador se selecciona del grupo que consiste en colorantes fluorescentes, metales, colorantes cromofóricos, compuestos quimioluminiscentes, proteínas bioluminiscentes, enzimas, radioisótopos, partículas de óxido de hierro magnético, vesículas que contienen gas y puntos cuánticos.

55

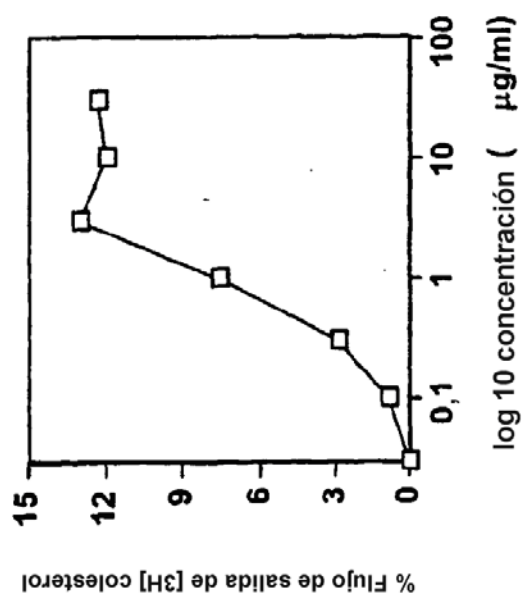


FIGURA 1

FIGURA 2

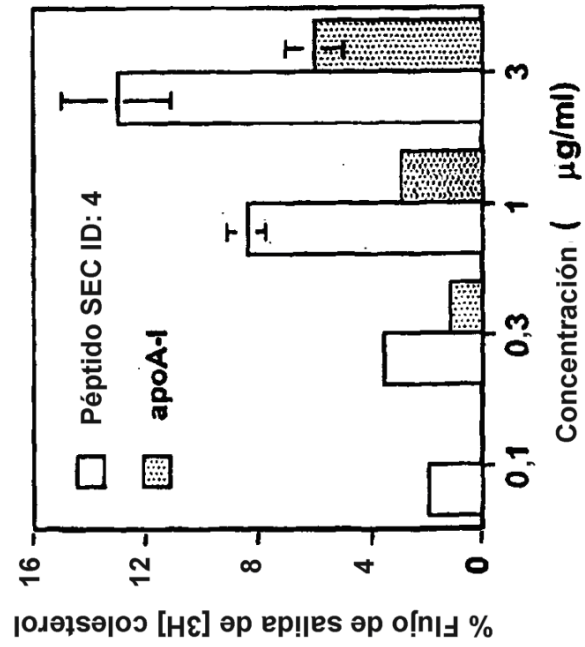


FIGURA 3

TABLA 1- Eficacia de flujo de salida de colesterol		
	Valores de Km	
	$\mu\text{g/ml}$	μM
* apoA1	$3,4 \pm 0,6$	$0,12 \pm 0,02$
apoE3	$4,5 \pm 0,8$	$0,13 \pm 0,02$
CT	$2,5 \pm 0,2$	$0,21 \pm 0,02$
SEC ID:4	$0,86 \pm 0,3$	$0,26 \pm 0,12$
SEC ID:5	$0,84 \pm 0,2$	$0,25 \pm 0,10$
SEC ID:6	$0,72 \pm 0,1$	$0,21 \pm 0,03$

* apo A-1 y E se refieren a las proteínas de longitud completa

CT se refiere al dominio C-terminal aa 192-299 de apoE3

Los valores son las medias $\pm$ DT

FIGURA 4

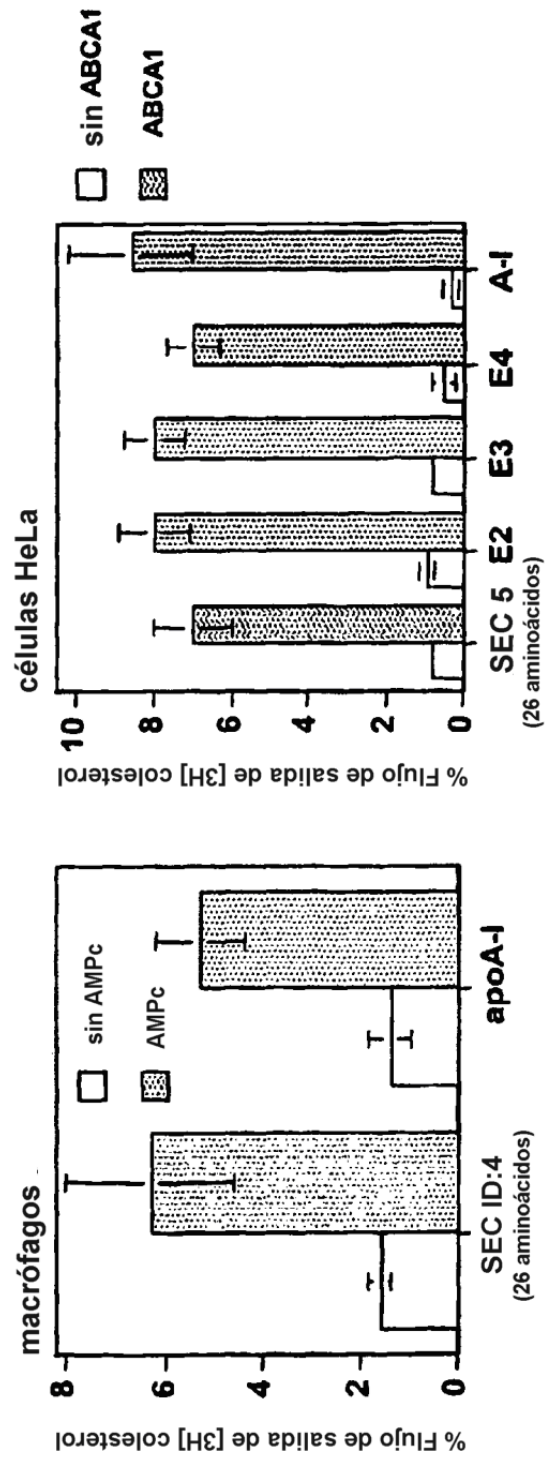
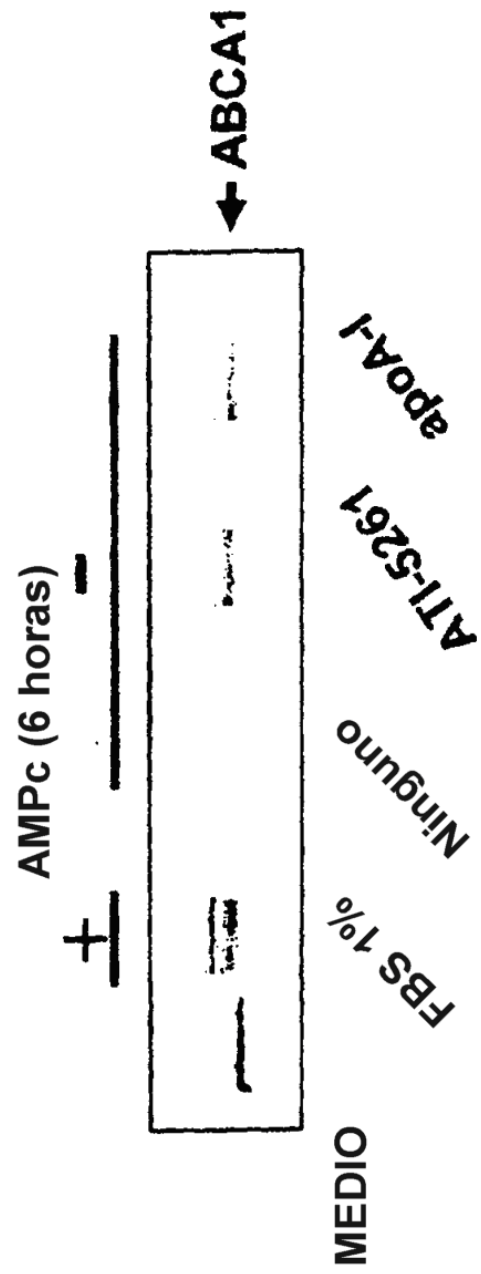


FIGURA 5



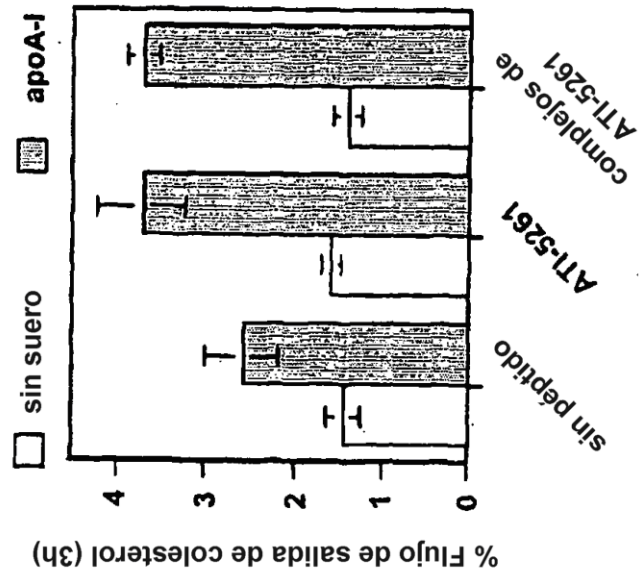


FIGURA 6

FIGURA 7

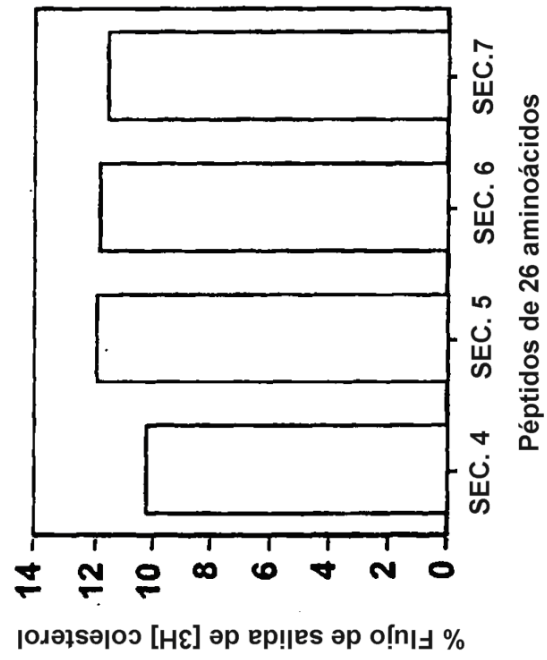


FIGURA 8

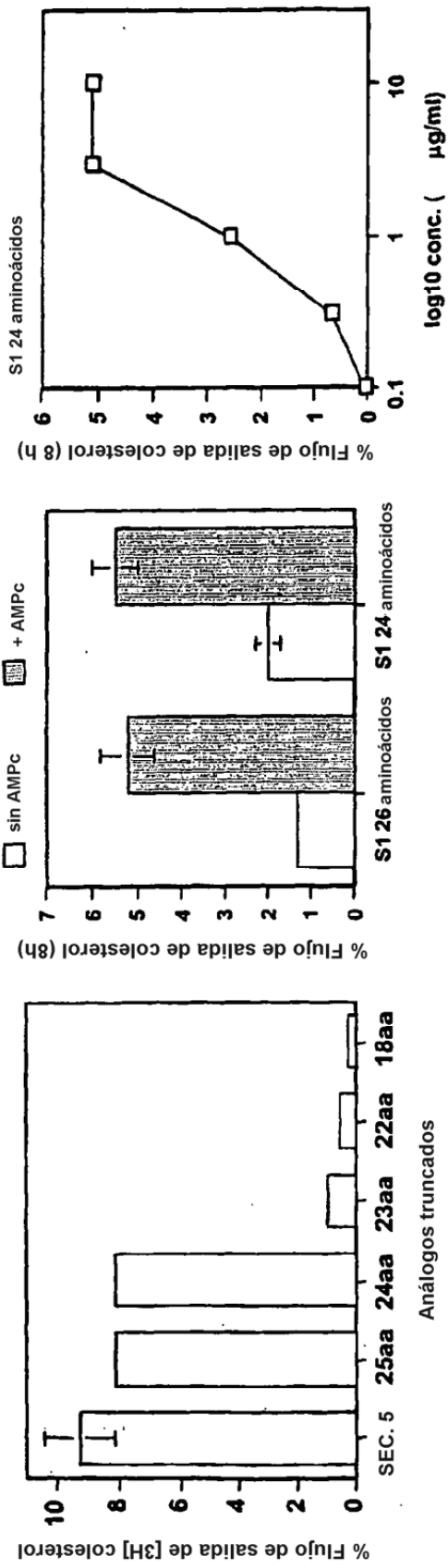


FIGURA 9

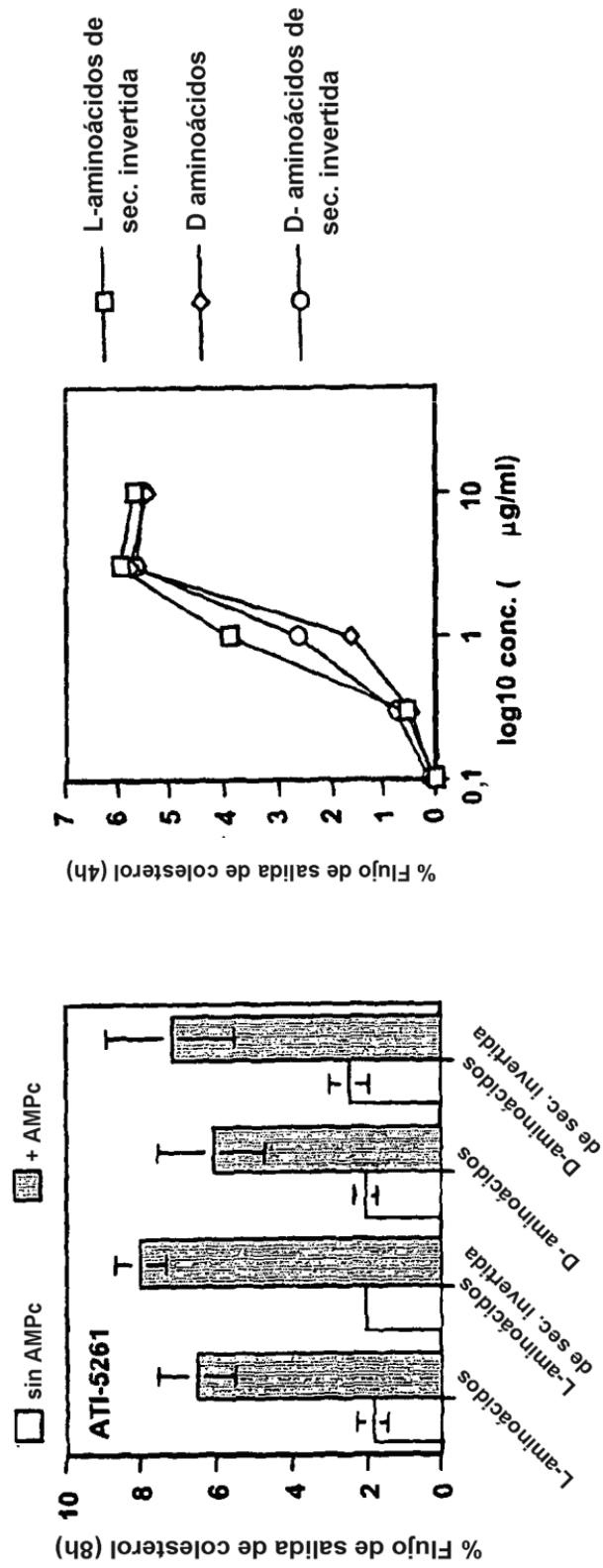


FIGURA 10

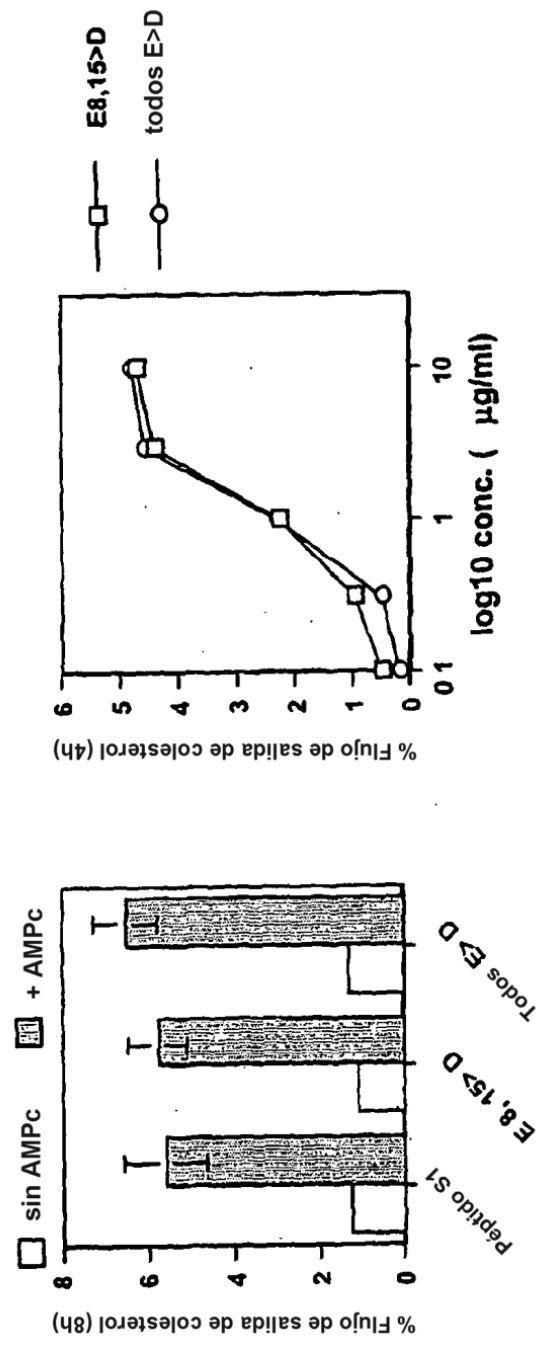


FIGURA 11

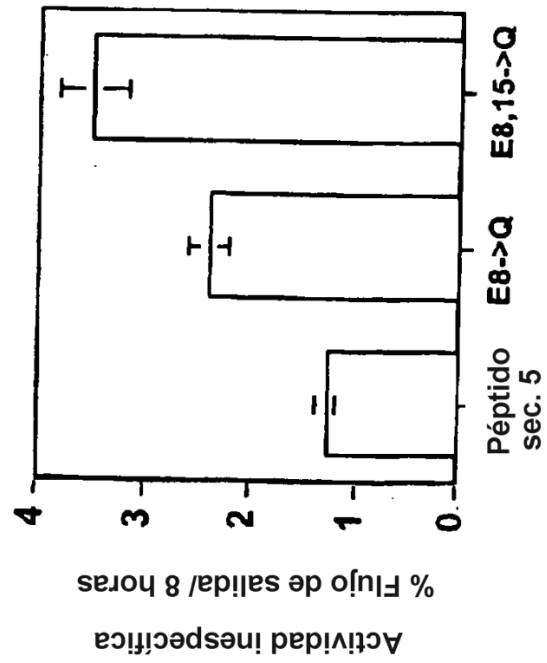


FIGURA 12

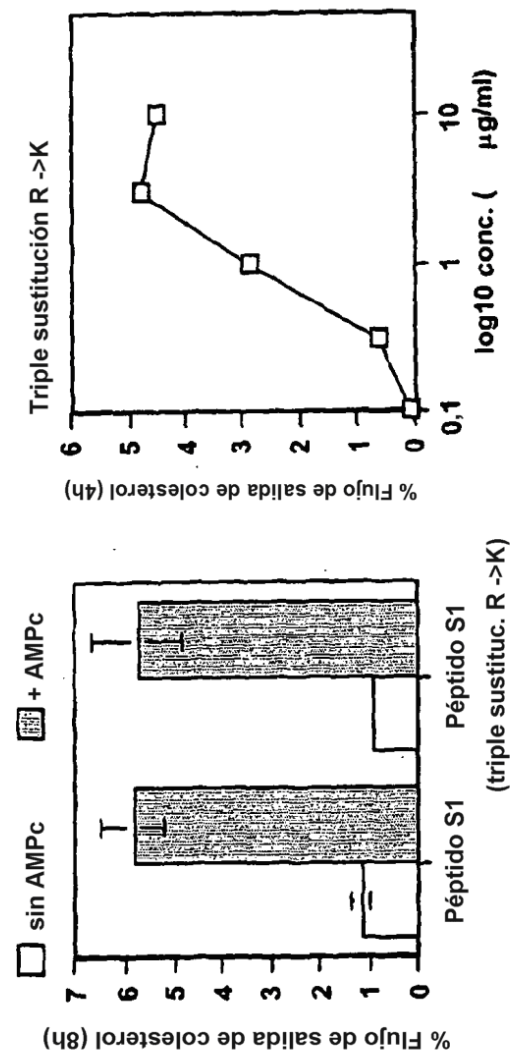
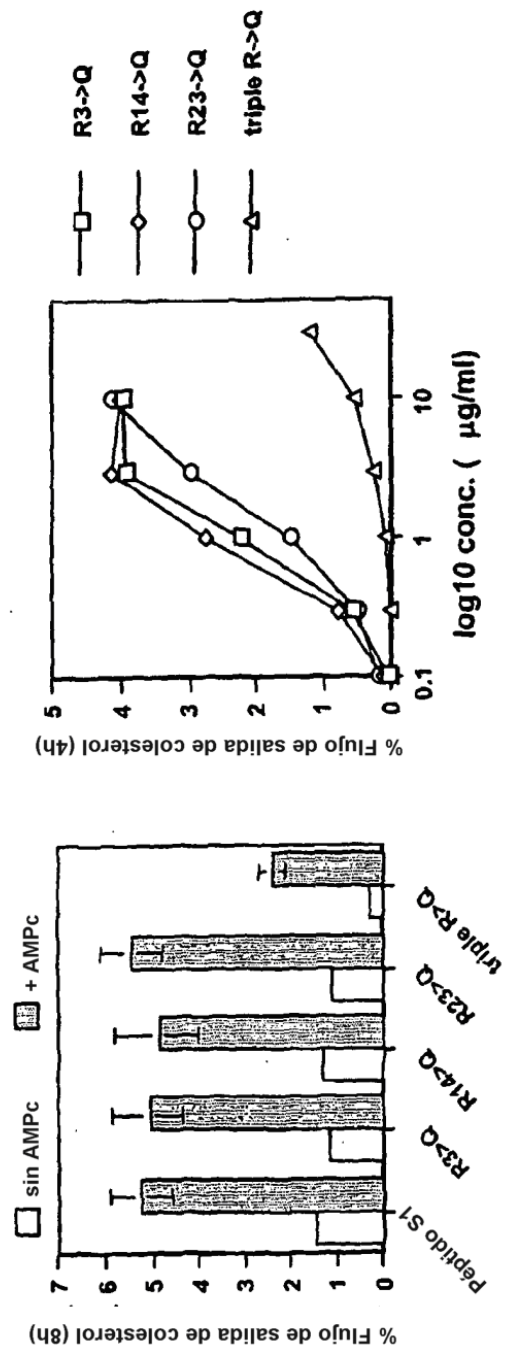


FIGURA 13



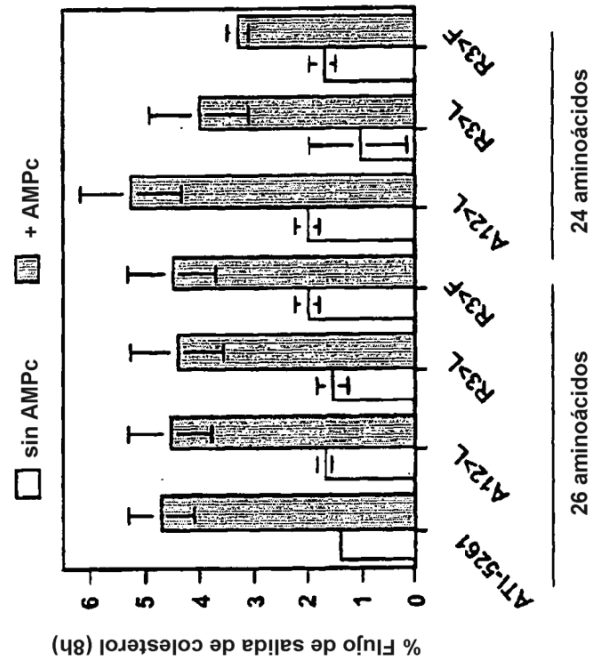


FIGURA 14

FIGURA 15

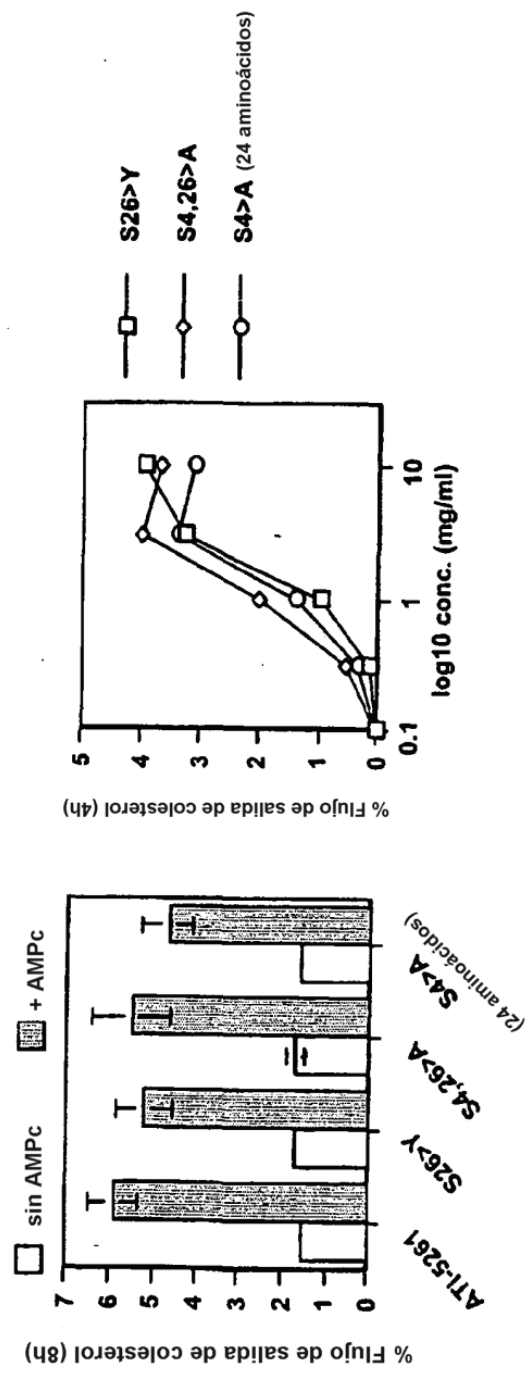


FIGURA 16

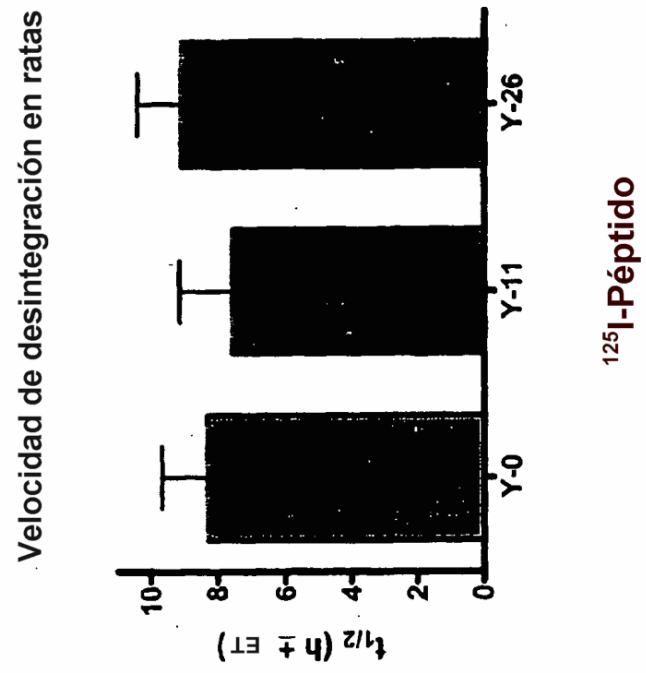


FIGURA 17

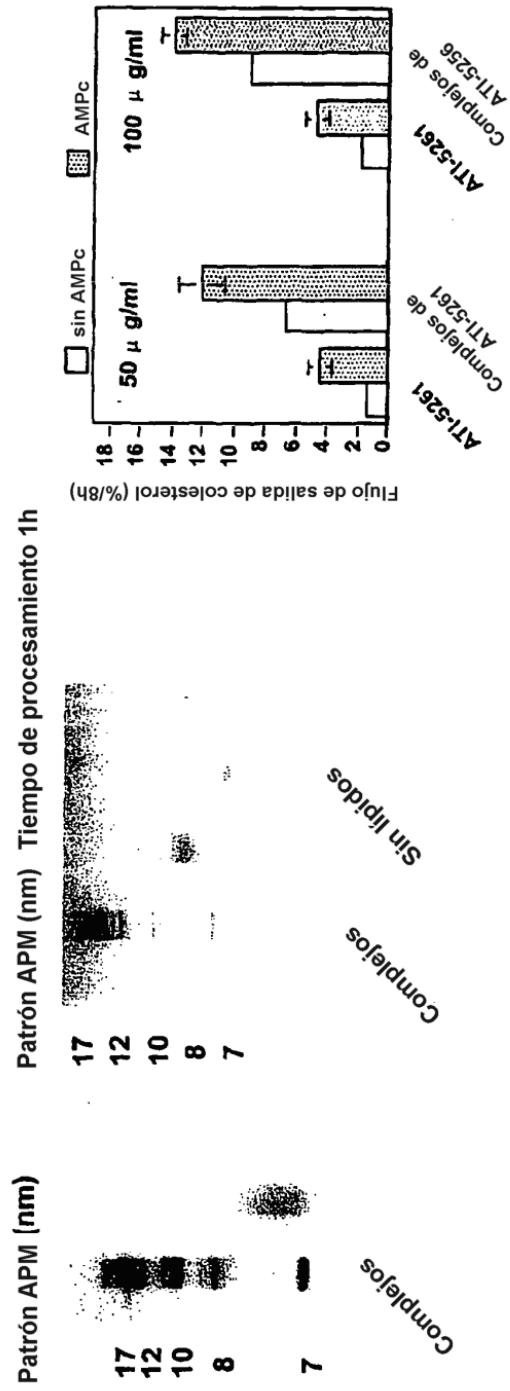


FIGURA 18



FIGURA 19A

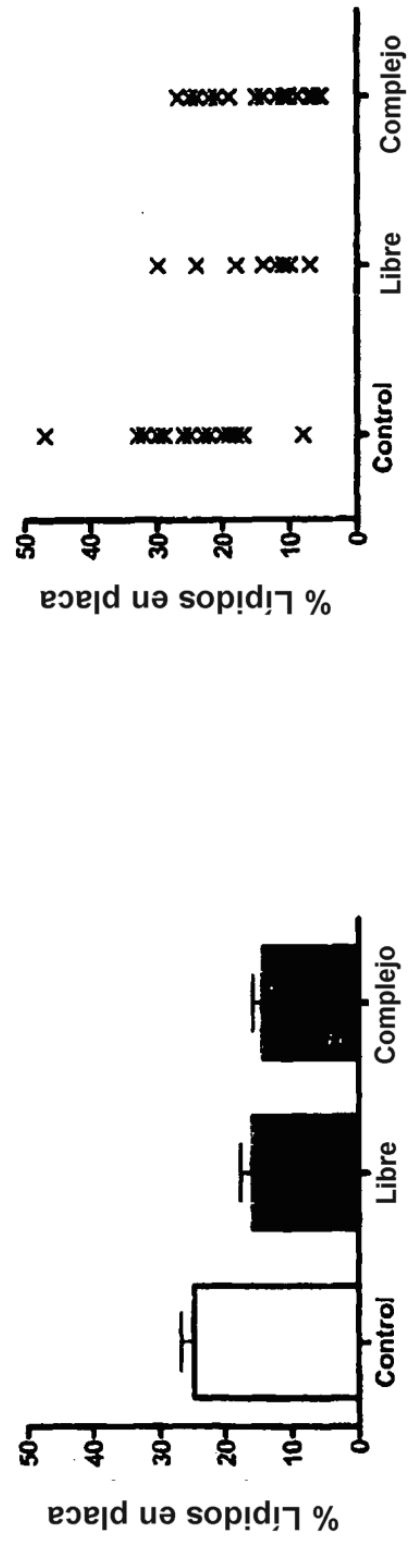


FIGURA 19-B



FIGURA 20

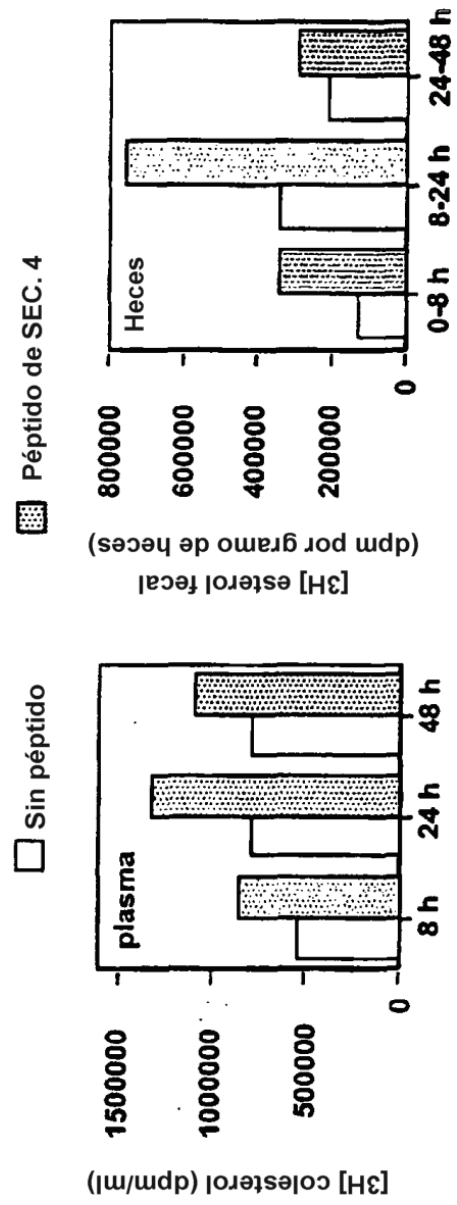
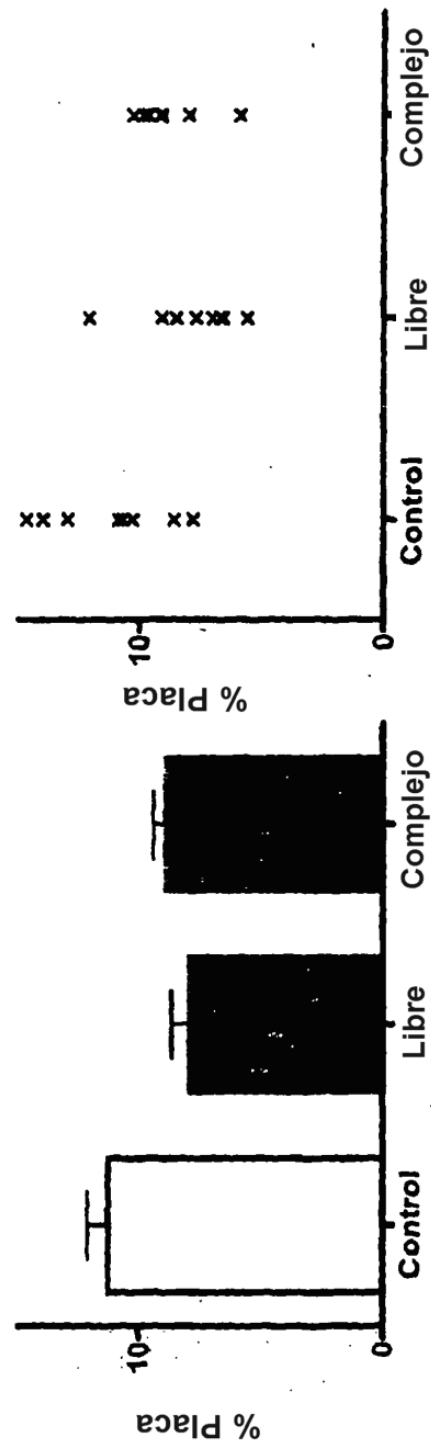


FIGURA 21



Libre respecto a control: $p < 0,0105$, Control respecto a complejo: $p < 0,0345$

Libre respecto a complejo: $p < 0,2749$

FIGURA 22

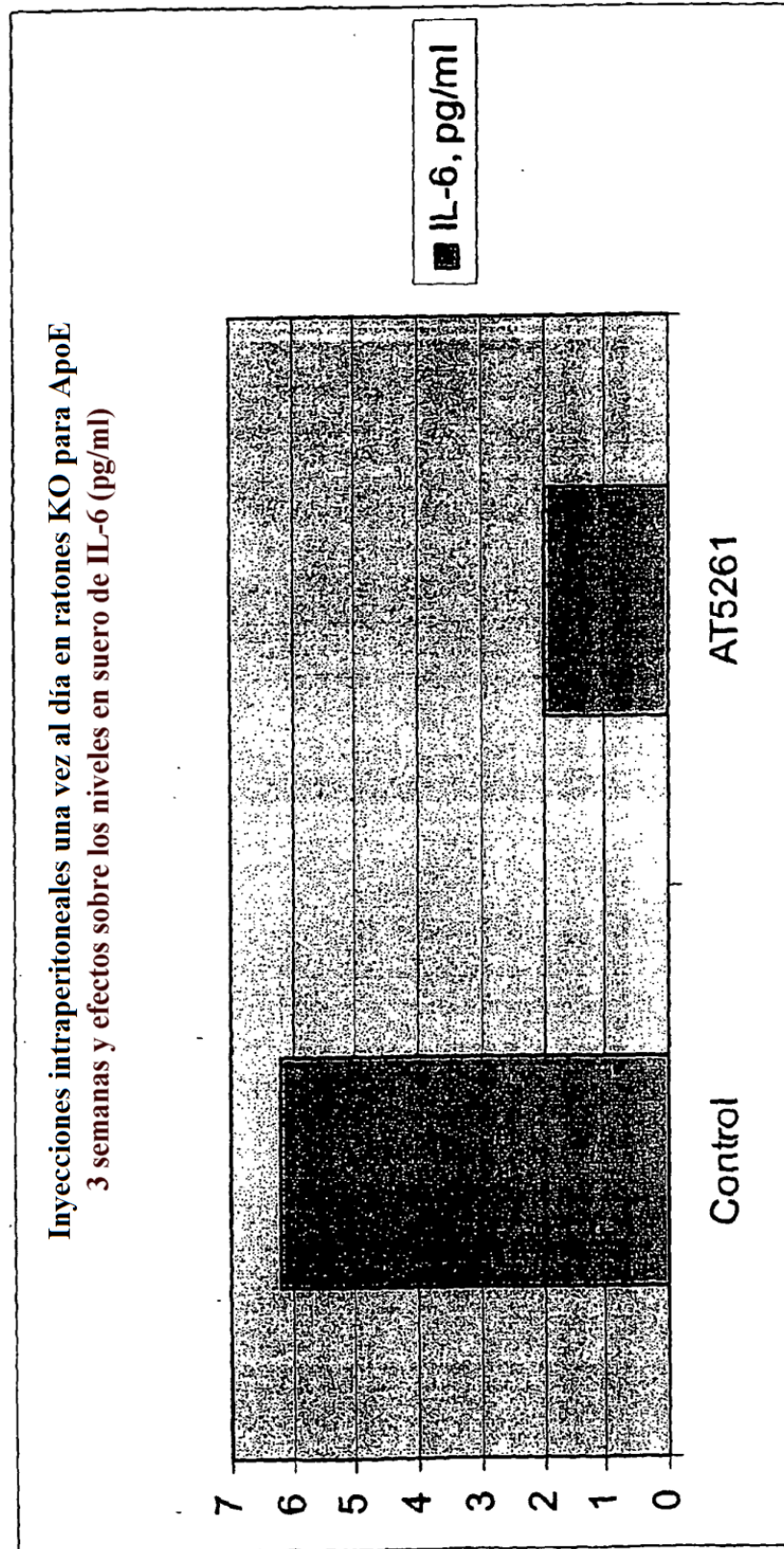


FIGURA 23

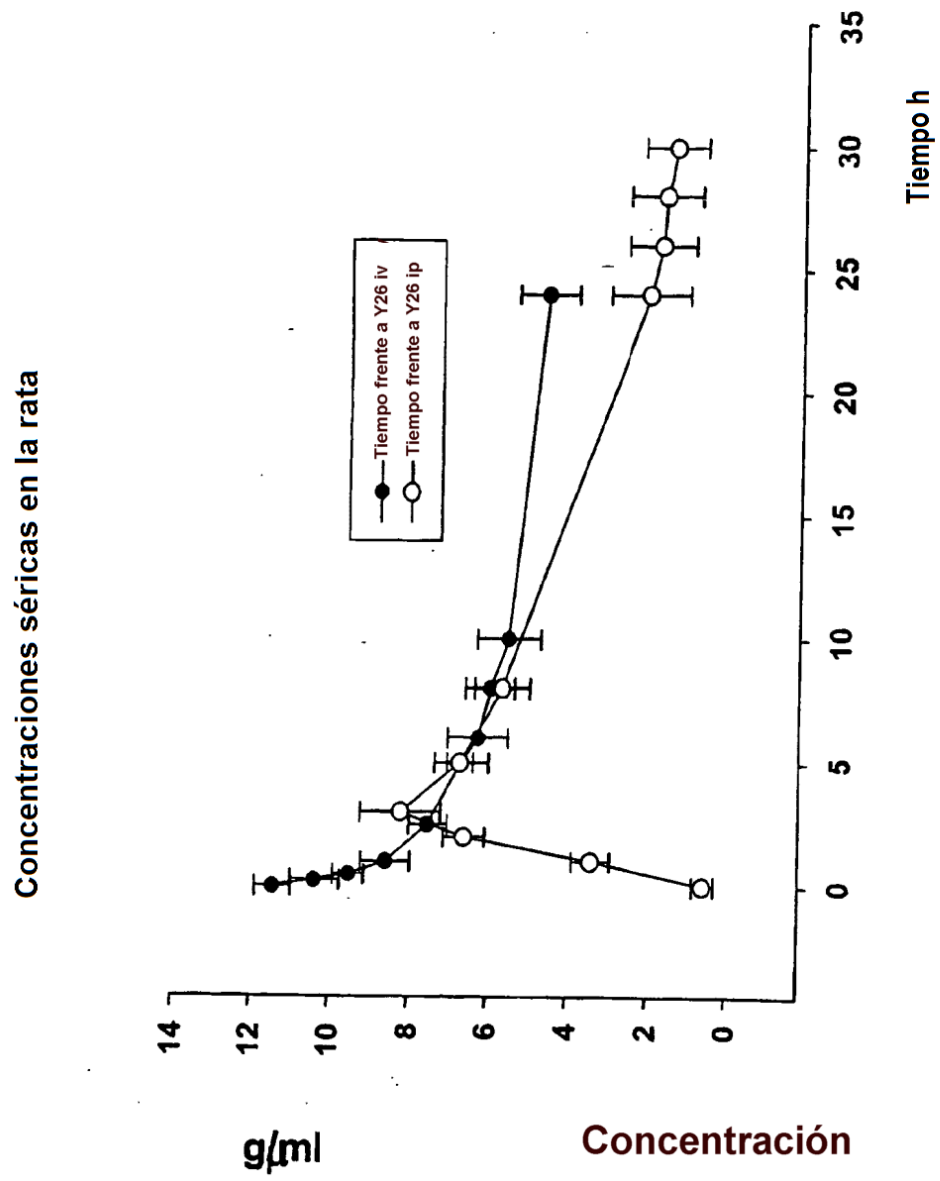


FIGURA 24

