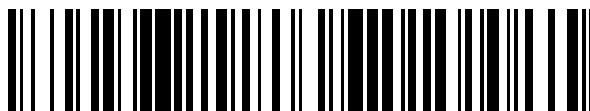


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 739**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2006 E 06785628 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 1907564**

54 Título: **Procedimiento de prueba de ligando LXR**

30 Prioridad:

28.06.2005 US 694806 P

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

20.01.2014

73 Titular/es:

**DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.0%)
5-1, NIHONBASHI HONCHO 3-CHOME CHUO-KU
TOKYO 103-8426, JP**

72 Inventor/es:

**TERASAKA, NAOKI;
HONZUMI, SHOKO;
SCHULMAN, IRA GLENN;
WAGNER, BRANDEE LYNN y
WILLY, PATRICIA J.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 438 739 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de prueba de ligando LXR

Antecedentes de la invención

Descripción de la técnica relacionada

- 5 Se sabe que los triglicéridos y el colesterol LDL en plasma son factores de riesgo para arteriosclerosis. La hiperlipidemia, en la que concentraciones en sangre de triglicéridos y colesterol LDL son elevadas, es una enfermedad que no solo produce alteración de células endoteliales vasculares, sino que también produce deposición de colesterol sobre las paredes vasculares.
- 10 Como el transportador A1 de unión a ATP (ABCA1) tiene una función que elimina el colesterol depositado sobre las paredes vasculares, se cree que aumentar la cantidad expresada de ABCA1 haría posible prevenir la progresión de o mejorar la arteriosclerosis (Bodzioch, M. y col. *Nat. Genet.*, 22, 347-351, 1999).
- El receptor nuclear, el receptor X del hígado (LXR), controla la transcripción del gen regulador del colesterol y el metabolismo de los lípidos. Como los agonistas de LXR tienen la capacidad de aumentar la expresión de ABCA1, se espera que los agonistas de LXR sean útiles como agentes antiarterioscleróticos novedosos.
- 15 Se sabe que LXR tiene dos isoformas que consisten en LXR α y LXR β . LXR α se expresa altamente en el hígado, intestino, adipocitos y riñón, y solo se expresa ligeramente en las células suprarrenales, musculares y hematopoyéticas. Por otra parte, LXR β se expresa universalmente ubicuamente.
- 20 Cuando se administró un agonista de pan-LXR a ratones naturales, ratones deficientes en LXR α o ratones deficientes en LXR β , el agonista de pan-LXR elevó los niveles de triglicéridos en plasma en ratones naturales y ratones deficientes en LXR α , mientras que el agonista de pan-LXR no afectó los niveles de triglicéridos en plasma. De estos resultados se ha desvelado un procedimiento para adquirir agonistas selectivos para LXR β (documento US2003/0073614A1).
- 25 Cuando un ligando se une a un receptor nuclear, la estructura tridimensional del receptor nuclear cambia, y se sabe que estos cambios conformacionales se producen en la unión entre el receptor nuclear y el factor que se asocia a la transcripción, concretamente una proteína co-activadora o co-represora. El tipo de coactivador que se une al receptor nuclear varía según el tipo de célula y tejido. Además, si el ligando que se une al receptor nuclear se diferencia, entonces el cambio en la estructura tridimensional del receptor nuclear también se diferencia, y como resultado, también se diferencian los tipos y números de coactivadores que se unen al receptor nuclear.
- 30 Aunque ejemplos conocidos de proteínas coactivadoras para LXR incluyen PGC-1 α (receptor activado por proliferador de peroxisomas de Homo sapiens, gamma, coactivador 1, alfa: *Proc Natl Acad Sci USA.* 100, 5419-24, 2003), TIF-2 (coactivador 2 de receptor nuclear de Homo sapiens) (*EMBO J.*, 23, 2083-2091, 2004), ASC-2 (cointegrador 2 de señal activante) (*Mol. Cell Biol.*, 23, 3583-3592, 2003), SRC-1 (coactivador 1 de receptor esteroide humano) (*Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, 24, 703-708, 2004), DAX1 (región crítica de hipoplasia suprarrenal congénita (AHC) de inversión de sexo sensible a la dosificación sobre el cromosoma X, gen 1) (*Mol. Endocrinol.*, 17, 994-1004, 2003), PNRC (proteína coreguladora de receptor nuclear rico en prolina) (*Mol. Endocrinol.*, 14, 986-998, 2000), TRAP220 (proteína 220 asociada a receptor de la hormona tiroidea) (*J. Biol. Chem.*, 280, 1625-1633, 2005), PERC (coactivador 1 gamma de receptor activado por proliferador de peroxisomas beta) (*J. Biol. Chem.*, 281, 14537-14546, 2006), ACTR (coactivador 3 de receptor esteroideo) (*J. Biol. Chem.*, 281, 14787-14795, 2006), todavía tiene que realizarse investigación sobre ligandos LXR en vista de la interacción entre estos coactivadores y LXR, además de ligandos LXR.
- 35 Pelton y col., "Nuclear receptors as potential targets for modulating reverse cholesterol transport" *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 5, nº 3, 2005, pág 265-281, es una revisión que describe la función de receptores nucleares en la regulación de genes que participan en el transporte de colesterol y moduladores sintéticos de estos receptores. Informa que se ha mostrado que receptores nucleares de la familia de heterodímeros RXR regulan genes clave que participan en el metabolismo de HDL e invierten el transporte de colesterol. Informa adicionalmente que los moduladores de la familia de receptores heterodímeros RXR podrían producir el desarrollo de terapias novedosas altamente eficaces para la prevención y tratamiento de enfermedad aterosclerótica.
- 40
- 45

Resumen de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento de identificación de ligandos LXR que no produzcan un efecto, por ejemplo, aumento, en concentraciones de colesterol LDL y/o triglicérido en plasma en un mamífero.

- 50 Además, otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento de medir fácilmente los efectos de ligandos LXR sobre lípidos plasmáticos.

Además, otro objeto de la presente invención es proporcionar un kit que pueda usarse para identificar ligandos LXR que no produzcan un efecto, por ejemplo, aumento, en la concentración de colesterol LDL y/o triglicéridos en plasma en un mamífero.

5 Como resultado de realizar amplios estudios para resolver los problemas anteriormente mencionados, los inventores de la presente invención encontraron que entre agonistas de LXR, ciertos agonistas de LXR tienen la función de aumentar la concentración de colesterol por lipoproteínas de baja densidad (LDL), y que no se observan ligandos LXR para los que hay baja actividad de unión entre LXR α y un coactivador específico o solo se observa que aumentan ligeramente las concentraciones de triglicéridos en plasma y/o colesterol LDL.

10 Los inventores de la presente invención también descubrieron un procedimiento de medir fácilmente si un ligando LXR tiene o no la función de aumentar la concentración de triglicéridos en plasma y/o la concentración de colesterol LDL utilizando la actividad de unión entre LXR y un coactivador.

15 Además, los inventores de la presente invención descubrieron un procedimiento de identificación de ligandos LXR que no tienen la función de afectar, por ejemplo, aumentar, la concentración de triglicéridos en plasma y/o la concentración de colesterol LDL en un mamífero utilizando la actividad de unión entre LXR y un coactivador, conduciendo así a la completitud de la presente invención.

La presente invención proporciona un procedimiento para medir fácilmente si un ligando LXR tiene o no la función de afectar, por ejemplo, aumentar, la concentración de triglicéridos en plasma y/o la concentración de colesterol LDL en un mamífero.

20 Además, la presente invención proporciona un procedimiento de identificación de ligandos LXR que no tienen la función de afectar, por ejemplo, aumentar, la concentración de triglicéridos en plasma y/o la concentración de colesterol LDL en un mamífero.

Además, la presente invención proporciona un kit que puede usarse en un procedimiento de identificación de ligandos LXR que no produce un efecto significativo, por ejemplo, aumento, en la concentración de la concentración de colesterol LDL y/o de triglicéridos en plasma en un mamífero.

25 Estas invenciones son del siguiente modo:

1) Un procedimiento de identificación de un agente terapéutico o preventivo que afecta la concentración de colesterol LDL y/o de triglicéridos en plasma en un mamífero, comprendiendo el procedimiento:

- (i) proporcionar un heterodímero que comprende LXR α y RXR α ,
- (ii) poner en contacto una sustancia de prueba con el heterodímero en presencia de un coactivador de LXR;
- 30 (iii) medir la cantidad de coactivador unido al heterodímero;
- (iv) comparar la cantidad de coactivador medida en la etapa (iii) con la cantidad de coactivador unido al heterodímero en un control; y
- (v) correlacionar la diferencia entre la cantidad de coactivador unido en presencia de la sustancia de prueba y la cantidad de coactivador unido en el control en el que un aumento en la cantidad de coactivador unido en presencia de la sustancia de prueba en comparación con el control es indicativo de que la sustancia de prueba tiene el efecto de aumentar la concentración de colesterol LDL y/o de triglicéridos en plasma en un mamífero.

2) El procedimiento según 1), en el que el procedimiento es para identificar un agente terapéutico o preventivo que no produce un aumento en colesterol LDL y/o plasma en un mamífero.

40 3) El procedimiento según 1), en el que la sustancia de prueba es un ligando LXR.

4) El procedimiento según 1) en el que el agente terapéutico o preventivo es para tratar o prevenir una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en arteriosclerosis, aterosclerosis, hiperlipidemia, enfermedades relacionadas con los lípidos, una enfermedad inflamatoria mediada por citocinas inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedad cardiovascular, enfermedad cerebrovascular, enfermedad renal, diabetes mellitus, complicaciones diabéticas, obesidad, nefritis, hepatitis y enfermedad de Alzheimer.

45 5) El procedimiento según 1), en el que el coactivador está seleccionado del grupo que consiste en PGC-1 α (receptor activado por proliferador de peroxisomas de Homo sapiens, coactivador gamma 1, alfa), TIF-2 (coactivador 2 de receptor nuclear de Homo sapiens), ASC-2 (cointegrador 2 de señal activante), SRC-1 (coactivador 1 de receptor esteroide humano), DAN1 (región crítica de hipoplasia suprarrenal congénita (AHC) de inversión de sexo sensible a la

dosificación sobre el cromosoma X, gen 1), PNRC (proteína correguladora de receptor nuclear rico en prolina), TRAP220 (proteína 220 asociada a receptor de la hormona tiroidea), PERC (coactivador 1 gamma de receptor activado por proliferador de peroxisomas beta) y ACTR (coactivador 3 de receptor esteroideo).

- 5 6) El procedimiento según 1), en el que el coactivador es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 22, SEC ID N°: 23, SEC ID N°: 24, SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 26, SEC ID N°: 27, SEC ID N°: 28 y variantes de las mismas.
- 10 7) El procedimiento según 1), en el que el LXR α es un polipéptido LXR α de longitud completa humano que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 o una variante de la misma que tiene al menos el 80% de identidad con SEC ID N°: 2, o una proteína fusionada que contiene dicho polipéptido.
- 15 8) El procedimiento según 1), en el que el LXR α es un sitio de unión a ligando de LXR α de longitud completa humano que tiene la secuencia de aminoácidos del aminoácido n° 164 a 447 de SEC ID N°: 2 o una variante de la misma que tiene al menos el 80% de identidad con el aminoácido n° 164 a 447 de SEC ID N°: 2, o una proteína fusionada que contiene dicho polipéptido.
- 20 9) El procedimiento según 1), en el que el RXR α es un polipéptido RXR α de longitud completa humano que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4 o una variante de la misma que tiene al menos el 80% de identidad con SEC ID N°: 4, o una proteína fusionada que contiene dicho polipéptido.
- 10) El procedimiento según 1), en el que el RXR α es un sitio de unión a ligando de RXR α de longitud completa humano que tiene la secuencia de aminoácidos del aminoácido n° 201 a 462 de SEC ID N°: 4 o una variante de la misma que tiene al menos el 80% de identidad con el aminoácido n° 201 a 462 de SEC ID N°: 4, o una proteína fusionada que contiene dicho polipéptido.
- 25 11) El procedimiento según 1), en el que la cantidad de coactivador unido al heterodímero se mide usando un ensayo de FRET.
- 12) El procedimiento según 1), en el que LXR α y/o RXR α se proporcionan usando células que expresan LXR α y/o RXR α .
- 13) El procedimiento según 1), en el que LXR α y/o RXR α se proporcionan usando células que expresan LXR α y/o RXR α como una proteína exógena.
- 14) El procedimiento según 1), en el que LXR α y/o RXR α se proporcionan usando células que expresan LXR α y/o el RXR α como una proteína endógena.
- 30 15) Un kit que se usa para una cualquiera de 1) a 14), comprendiendo el kit un primer polipéptido que comprende un sitio de unión a ligando de un polipéptido LXR α humano que comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido n° 164 a 447 de SEC ID N° 2 o una variante de la misma que tiene al menos el 80% de identidad con el aminoácido n° 164 a 447 de SEC ID N° 2; un segundo polipéptido que comprende un sitio de unión a ligando de un polipéptido RXR α de longitud completa humano que comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido n° 201 a 462 de SEC ID N° 4 o una variante de la misma que tiene al menos el 80% de identidad con el aminoácido n° 201 a 462 de SEC ID N° 4; y un coactivador seleccionado del grupo que consiste en PGC-1 α (receptor activado por proliferador de peroxisomas de Homo sapiens, coactivador gamma 1, alfa), TIF-2 (coactivador 2 de receptor nuclear de Homo sapiens), ASC-2 (cointegrador 2 de señal activante), SRC-1 (coactivador 1 de receptor esteroide humano), DAX1 (región crítica de hipoplasia suprarrenal congénita (AHC) de inversión de sexo sensible a la dosificación sobre el cromosoma X, gen 1), PNRC (proteína correguladora de receptor nuclear rico en prolina), TRAP220 (proteína 220 asociada a receptor de la hormona tiroidea), PERC (coactivador 1 gamma de receptor activado por proliferador de peroxisomas beta) y ACTR (coactivador 3 de receptor esteroideo).
- 35 16) Un kit según 15), en el que el primer polipéptido comprende un polipéptido LXR α de longitud completa humano que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2 o una variante de la misma que tiene al menos el 80% de identidad con SEC ID N° 2; y el segundo polipéptido comprende un polipéptido RXR α de longitud completa humano que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 4 o una variante de la misma que tiene al menos el 80% de identidad con SEC ID N° 4, en el que el polipéptido LXR α de longitud completa humano comprende el sitio de unión a ligando del polipéptido LXR α humano y el polipéptido RXR α de longitud completa humano comprende el sitio de unión a ligando del polipéptido RXR α humano.
- 40 17) Un kit según 15), en el que el primer y segundo polipéptidos forman juntos un polipéptido fusionado.
- 45 18) Un kit que comprende primer y segundo polinucleótidos que codifican el primer y segundo polipéptidos como se define en cualquiera de 15) a 17), respectivamente; y un coactivador seleccionado del grupo que consiste en PGC-1 α .
- 50

- (receptor activado por proliferador de peroxisomas de Homo sapiens, coactivador gamma 1, alfa), TIF-2 (coactivador 2 de receptor nuclear de Homo sapiens), ASC-2 (cointegrador 2 de señal activante), SRC-1 (coactivador 1 de receptor esteroide humano), DAX1 (región crítica de hipoplasia suprarrenal congénita (AHC) de inversión de sexo sensible a la dosificación sobre el cromosoma X, gen 1), PNRC (proteína correguladora de receptor nuclear rico en prolina), TRAP220 (proteína 220 asociada a receptor de la hormona tiroidea), PERC (coactivador 1 gamma de receptor activado por proliferador de peroxisomas beta) y ACTR (coactivador 3 de receptor esteroideo).
- 5
- 19) Un kit según cualquiera de 15 a 18, en el que el coactivador es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N° 16, SEC ID N° 17, SEC ID N° 18, SEC ID N° 19, SEC ID N° 20, SEC ID N° 21, SEC ID N° 22, SEC ID N° 23, SEC ID N° 24, SEC ID N° 25, SEC ID N° 26, SEC ID N° 27, SEC ID N° 28 y variantes de las mismas.
- 10
- 20) Un kit que comprende un vector recombinante que contiene el primer y segundo polinucleótidos como se define en 18) y un coactivador seleccionado del grupo que consiste en PGC-1 α (receptor activado por proliferador de peroxisomas de Homo sapiens, coactivador gamma 1, alfa), TIF-2 (coactivador 2 de receptor nuclear de Homo sapiens), ASC-2 (cointegrador 2 de señal activante), SRC-1 (coactivador 1 de receptor esteroide humano), DAX1 (región crítica de hipoplasia suprarrenal congénita (AHC) de inversión de sexo sensible a la dosificación sobre el cromosoma X, gen 1), PNRC (proteína correguladora de receptor nuclear rico en prolina), TRAP220 (proteína 220 asociada a receptor de la hormona tiroidea), PERC (coactivador 1 gamma de receptor activado por proliferador de peroxisomas beta) y ACTR (coactivador 3 de receptor esteroideo).
- 15
- 21) Un kit según 20) en el que el vector recombinante es un vector de expresión.
- 20
- 22) Un kit que comprende células huésped transformadas con un vector recombinante como se define en 20) o 21), y un coactivador seleccionado del grupo que consiste en PGC-1 α (receptor activado por proliferador de peroxisomas de Homo sapiens, coactivador gamma 1, alfa), TIF-2 (coactivador 2 de receptor nuclear de Homo sapiens), ASC-2 (cointegrador 2 de señal activante), SRC-1 (coactivador 1 de receptor esteroide humano), DAX1 (región crítica de hipoplasia suprarrenal congénita (AHC) de inversión de sexo sensible a la dosificación sobre el cromosoma X, gen 1), PNRC (proteína correguladora de receptor nuclear rico en prolina), TRAP220 (proteína 220 asociada a receptor de la hormona tiroidea), PERC (coactivador 1 gamma de receptor activado por proliferador de peroxisomas beta) y ACTR (coactivador 3 de receptor esteroideo).
- 25
- 23) Un kit según 22), en el que las células huésped son células de mamífero.
- 30
- 24) Un procedimiento de detección de un aumento en el nivel de concentración de colesterol LDL y/o de triglicéridos en plasma en un mamífero que comprende:
- (i) poner en contacto una muestra biológica, por ejemplo, sangre, plasma, hígado, intestino, grasa, riñón, glándula suprarrenal, músculo o células del sistema hematopoyético, recogidas de un mamífero con un heterodímero que comprende LXR α y RXR α , en presencia de un coactivador de LXR,
- (ii) repetir dicha etapa de puesta en contacto (i) con una muestra de control;
- 35
- (iii) medir la cantidad de coactivador unido al heterodímero;
- (iv) comparar la cantidad de coactivador unido al heterodímero en la muestra biológica recogida del mamífero y el coactivador unido al heterodímero en la muestra de control; y
- (v) determinar que el mamífero tiene un elevado nivel de concentración de colesterol LDL y/o de triglicéridos en plasma cuando la cantidad de coactivador unido al heterodímero en la muestra biológica es mayor que la cantidad de coactivador unido al heterodímero en el control.
- 40
- 25) Un procedimiento de diagnóstico de un estado de enfermedad en un mamífero que comprende:
- (i) poner en contacto una muestra biológica, por ejemplo, sangre, plasma, hígado, intestino, grasa, riñón, glándula suprarrenal, músculo o células del sistema hematopoyético, recogidas de un mamífero con un heterodímero que comprende LXR α y RXR α , en presencia de un coactivador de LXR;
- 45
- (ii) repetir dicha etapa de puesta en contacto (i) con una muestra de control;
- (iii) medir la cantidad de coactivador unido al heterodímero;
- (iv) comparar la cantidad de coactivador unido al heterodímero en la muestra biológica recogida del mamífero y el coactivador unido al heterodímero en la muestra de control; y
- (v) determinar que el mamífero está en un estado de enfermedad cuando la cantidad de coactivador unido al

heterodímero en la muestra biológica es mayor que la cantidad de coactivador unido al heterodímero en el control, que es indicativo de un aumento en el nivel de concentración de colesterol LDL y/o de triglicéridos en plasma, en el mamífero, en el que el estado de enfermedad está seleccionado del grupo que consiste en (a) arteriosclerosis, (b) aterosclerosis, (c) hiperlipidemia, (d) una enfermedad relacionada con los lípidos, (e) una enfermedad inflamatoria mediada por una citocina inflamatoria, (f) una enfermedad autoinmunitaria, (g) una enfermedad cardiovascular, (h) una enfermedad cerebrovascular, (i) una enfermedad renal, (j) diabetes mellitus, (k) una complicación diabética, (l) obesidad, (m) nefritis, (n) hepatitis, (o) un tumor, (p) enfermedad de Alzheimer y (q) arteriosclerosis producida por una o más de las enfermedades (c) a (o).

26) El procedimiento según 24) o 25), en el que el mamífero es un ser humano.

27) El procedimiento según 26), en el que la muestra biológica es una muestra de sangre.

28) El procedimiento según 27), en el que el coactivador es un coactivador de LXR.

29) El procedimiento según 28), en el que el coactivador está seleccionado del grupo que consiste en PGC-1 α (receptor activado por proliferador de peroxisomas de Homo sapiens, coactivador gamma 1, alfa), TIF-2 (coactivador 2 de receptor nuclear de Homo sapiens), ASC-2 (cointegrador 2 de señal activante), SRC-1 (coactivador 1 de receptor esteroide humano), DAX1 (región crítica de hipoplasia suprarrenal congénita (AHC) de inversión de sexo sensible a la dosificación sobre el cromosoma X, gen 1), PNRC (proteína correguladora de receptor nuclear rico en prolina), TRAP220 (proteína 220 asociada a receptor de la hormona tiroidea), PERC (coactivador 1 gamma de receptor activado por proliferador de peroxisomas beta) y ACTR (coactivador 3 de receptor esteroideo).

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

1. Explicación de términos

El término "afectan la concentración de triglicéridos en plasma" como se usa en el presente documento pretende significar el uso de ligando LXR como agente terapéutico o preventivo en regular/monitorizar los niveles de concentración de colesterol LDL y de triglicéridos en plasma en un mamífero, inhibiendo, previniendo, mejorando o reduciendo así el riesgo de manifestación de una condición de enfermedad metabólica, tal como aterosclerosis o un evento de enfermedad aterosclerótica.

En la presente memoria descriptiva, el término "enfermedades relacionadas con la arteriosclerosis" se refiere a enfermedades que están presentes con síntomas de arteriosclerosis durante la evolución de la enfermedad desde el momento de la aparición, o enfermedades producidas por arteriosclerosis. Además, en la presente memoria descriptiva, enfermedades relacionadas con la arteriosclerosis se refieren a enfermedades para las que todos o una parte de los síntomas mejoran suprimiendo la exacerbación de síntomas de arteriosclerosis, mejorando síntomas de arteriosclerosis, curando síntomas de arteriosclerosis, previniendo la aparición de síntomas de arteriosclerosis o tratando la enfermedad causante.

Ejemplos de enfermedades relacionadas con la arteriosclerosis incluyen arteriosclerosis, aterosclerosis, hiperlipidemia, enfermedades relacionadas con los lípidos, enfermedades inflamatorias mediadas por citocinas inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades cardiovasculares, enfermedades cerebrovasculares.

La arteriosclerosis producida por una o más enfermedades seleccionadas de hiperlipidemia, enfermedades relacionadas con los lípidos, enfermedades inflamatorias mediadas por citocinas inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades cardiovasculares, enfermedades cerebrovasculares, enfermedades renales, diabetes mellitus, complicaciones diabéticas, obesidad también se incluyen en las enfermedades relacionadas con arteriosclerosis de la presente invención.

2. Ligandos LXR

Aunque ejemplos de ligandos LXR incluyen los compuestos indicados a continuación, no hay limitaciones particulares sobre tales compuestos en tanto que sean ligandos LXR. Por ejemplo, sustancias identificadas como ligandos LXR basándose en la función de promover la expresión de ARNm de ABCA1, la cantidad de colesterol saliente, la actividad de salida de colesterol o mediante el procedimiento descrito en un ensayo de co-transfección, por ejemplo (documento WO2003/106435, Ejemplo 3 de prueba) también pueden usarse como ligandos LXR en la presente invención.

Ejemplos de ligandos LXR incluyen: el Compuesto 12 descrito en la página 55 de la Publicación internacional WO2000/054759 (N-(2,2,2-trifluoroetil)-N-{4-[2,2,2-trifluoro-1-hidroxi-1-(trifluorometil)etil]fenil}bencenosulfonamida), ácido 3-cloro-4-(3-(2-propil-3-trifluorometil-6-benz-[4,5]-isooxazoloxi)propiltio)fenilacético descrito en el Ejemplo 20 en la página 70 del documento WO1997/028137, 1-(2-metoxietil)-4-[(4-metoxifenil)amino]-3-fenil-5-tioxi-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona descrita en la página 41 de la Publicación internacional WO2005/005416, 2-metil-N-{5-[2,2,2-trifluoro-1-hidroxi-1-(trifluorometil)etil]-1,3-tiazol-2il}propanamida descrita en la página 37 del documento WO03/090869, 1-[(6-fluoro(2H,4H-

benzo[e]1,3-dioxin-8-il)]metoxi]-2-nitrobenceno descrito en la página 27 del documento WO02/46181, 1-[1-(4-ciclohexilbenzoil)-4-fenilpiperidin-4-il]etanona descrita en la página 20 del documento WO2004/076418, ácido 2-(3-{3-[[2-cloro-3-(trifluorometil)bencil](2,2-difeniletil)amino]propoxi]-fenil)acético descrito en la página 46 del documento WO02/24632, 4-amino-1-(2-cloro-6-fluorobencil)-2-piperidin-1-il-1H-imidazol-5-carboxilato de metilo descrito en la página 59 del documento WO2004/009091, 2,4-dihidroxi-3-propil-1',1',1'-trifluoroacetofenona descrita en la página 24 del documento WO03/045382, ácido 3-cloro-4-(3-(3-etil-7-propil-6-benz-[4,5]-isoxazoloxi)propiltio)fenilacético descrito en la página 42 del documento WO97/28137, 3-[[2-[(2,2-dimetilpropanoil)tio]metil]-N-(4-metoxibencil)benzamida descrita en la página 24 del documento WO2004/026816, N-(2-[[6-cloro-1,3-benzodioxol-5-il]metil]tiofenil)-2,2,2-trifluoroacetamida descrita en la página 29 del documento WO03/059874, sal de clorhidrato de 2-(3-{3-[(2-cloro-3-(trifluorometil)-bencil)-(2,2-difenil)-amino]-propoxi]fenil)-1-morfolin-4-il-etanona descrita en la página 45 del documento WO2004/043939, sal de clorhidrato de ácido (*R*)-2-(3-{3-[[cloro-3-(trifluorometil)bencil](2,2-difeniletil)amino]-2-metil-propoxi]-fenil)acético descrita en la página 43 del documento WO03/082802, N-óxido de ácido 2-(3-{3-[[2-cloro-3-(trifluorometil)bencil](2,2-difeniletil)amino]propoxi]-fenil)acético descrito en la página 55 del documento WO03/082205, N-(4-{1-hidroxi-1-[1-(2-metoxietil)-1*H*-pirrol-2-il]-etil]-fenil)-N-metil-bencenosulfonamida descrita en la página 33 del documento WO03/063796, N-metil-N-[2-metil-4-(2,2,2-trifluoro-1-hidroxi-1-fenetil)]-bencenosulfonamida descrita en la página 29 del documento WO03/063576, ácido [4-({3-[[3-bencil-8-(trifluorometil)quinolin-4-il]fenoxi]metil]fenil]acético descrito en la página 86 del documento WO05/058834, ácido [4-({3-(2-metil-7-(trifluorometil)-2H-indazol-3-il)fenoxi]metil]fenil]acético descrito en la página 251 del documento WO06/017384.

Ejemplos de ligandos LXR también incluyen compuestos que tienen la estructura (1) a (165) mostrada en "Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery, 2006, 1, 21-46".

3. Preparación de LXR α , LXR β y RXR α

LXR α , LXR β y RXR α humanos no se limitan a sus proteínas de longitud completa, sino que también pueden ser péptidos parciales que comprenden sus secuencias parciales en tanto que contengan el dominio de unión a ligando. Un LXR α de longitud completa humano tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N $^{\circ}$: 2 o una variante de la misma que tiene la capacidad de unirse a ligando. Un RXR α de longitud completa humano tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N $^{\circ}$: 4 o una variante de la misma que tiene la capacidad de unirse a ligando. Un LXR β de longitud completa humano tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N $^{\circ}$: 6 o una variante de la misma que tiene la capacidad de unirse a ligando. Adecuadamente, el grado de identidad de variantes de polipéptido con SEC ID N $^{\circ}$: 2 o 4 ó 6 es al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% o el 100%. El grado de identidad de una variante se evalúa preferentemente por software informático, tal como el programa BLAST que usa un algoritmo para realizar búsquedas de homología. Además, también pueden ser proteínas que se producen naturalmente adquiridas de células derivadas de humano, y también pueden ser proteínas adquiridas de células recombinantes génicas diseñadas para expresar dicha proteína por un gen que se ha clonado por PCR, etc. Además, estas proteínas pueden purificarse o purificarse solo parcialmente.

Además, proteínas fusionadas, en las que otras secuencias de aminoácidos se han añadido a LXR α humano, LXR β humano y RXR α humano o sus péptidos parciales, también están incluidas en LXR α humano, LXR β humano, RXR α humano y sus péptidos parciales. Ejemplos de proteínas fusionadas incluyen, pero no se limitan a, proteínas fusionadas a marca de histidina, proteínas fusionadas a FLAG y proteínas fusionadas a GFP y otras fluorescentes.

El gen LXR α humano está registrado en GenBank como el número de acceso U22662 (véase P.J. Willy y col., Genes Dev. 9 (9), 1033-1045, 1995, números de nucleótidos 597 a 1379).

El gen LXR β humano está registrado en GenBank como el número de acceso U07132 (véase P.J. Willy y col., Genes Dev. 9 (9), 1033-1045, 1995).

El gen RXR α humano está registrado en GenBank como el número de acceso X52773.

4. Preparación del coactivador

Ejemplos de coactivadores de LXR incluyen PGC-1 α (receptor activado por proliferador de peroxisomas de Homo sapiens, gamma, coactivador 1, alfa), TIF-2 (coactivador 2 de receptor nuclear de Homo sapiens), ASC-2 (cointegrador 2 de señal activante), SRC-1 (coactivador 1 de receptor esteroide humano), DAX1 (región crítica de hipoplasia suprarrenal congénita (AHC) de inversión de sexo sensible a la dosificación sobre el cromosoma X, gen 1), PNRC (proteína correguladora de receptor nuclear rico en prolina), TRAP220 (proteína 220 asociada a receptor de la hormona tiroidea), PERC (coactivador 1 gamma de receptor activado por proliferador de peroxisomas beta), ACTR (coactivador 3 de receptor esteroideo). Los coactivadores no se limitan a proteínas de longitud completa, sino que también pueden usarse péptidos parciales que contienen un motivo LXXLL (en el que L representa leucina y X representa un aminoácido arbitrario). El péptido seleccionado del grupo que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N $^{\circ}$: 16, SEC ID N $^{\circ}$: 17, SEC ID N $^{\circ}$: 18, SEC ID N $^{\circ}$: 19, SEC ID N $^{\circ}$: 20, SEC ID N $^{\circ}$: 21, SEC ID N $^{\circ}$: 22, SEC ID N $^{\circ}$: 23, SEC ID N $^{\circ}$: 24, SEC ID N $^{\circ}$: 25, SEC ID N $^{\circ}$: 26, SEC ID N $^{\circ}$: 27, SEC ID N $^{\circ}$: 28 y variantes de las mismas que contienen un motivo

LXXLL también puede usarse como coactivador. Adecuadamente, el grado de identidad de variantes de polipéptido para SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 22, SEC ID N°: 23, SEC ID N°: 24, SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 26, SEC ID N°: 27, o SEC ID N°: 28 es al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% o el 100%. Estas proteínas también pueden ser proteínas que se producen naturalmente adquiridas de células derivadas de humano, y también pueden ser proteínas adquiridas de células recombinantes de genes diseñadas para expresar dicha proteína por un gen que se ha clonado por PCR, etc. Además, pueden usarse proteínas químicamente sintetizadas.

La secuencia de nucleótidos de PGC-1 α está registrada en GenBank como n° de acceso NM_013261. La secuencia de nucleótidos de TIF-2 está registrada en GenBank como n° de acceso NM_006540. La secuencia de nucleótidos de ASC-2 está registrada en GenBank como n° de acceso AF177388. La secuencia de nucleótidos de SRC-1 está registrada en GenBank como n° de acceso U90661. La secuencia de nucleótidos de DAX1 está registrada en GenBank como n° de acceso NP_000466. La secuencia de nucleótidos de PNRC está registrada en GenBank como n° de acceso NM_000044. La secuencia de nucleótidos de TRAP220 está registrada en GenBank como n° de acceso NM_004774. La secuencia de nucleótidos de PERC está registrada en GenBank como n° de acceso NM_133263. La secuencia de nucleótidos de ACTR está registrada en GenBank como n° de acceso AF012108.

5. Procedimiento de evaluación de la función de aumentar los niveles de colesterol LDL y/o de triglicéridos en plasma por ligandos LXR

Si un ligando LXR tiene o no la función de aumentar las concentraciones de colesterol LDL en plasma y/o triglicéridos en plasma puede evaluarse por si dicho ligando LXR aumenta o no la cantidad de unión entre LXR α y al menos un coactivador seleccionado de PGC-1 α , TIF-2, ASC-2, SRC-1, DAX1, PNRC, TRAP220, PERC y ACTR. Más específicamente, este procedimiento contiene las siguientes etapas de 1) o 2):

1)

i) una etapa de poner en contacto un heterodímero que comprende LXR α y RXR α con un coactivador de LXR y una sustancia de prueba;

ii) una etapa de medir la cantidad de coactivador unido al heterodímero; y,

iii) una etapa de comparar la cantidad de coactivador medida en la etapa ii) con la cantidad de coactivador unido al heterodímero medida en el caso de no poner en contacto el heterodímero con la sustancia de prueba.

2)

i) una etapa de poner en contacto un heterodímero que comprende LXR α y RXR α con un coactivador de LXR y una sustancia de prueba;

ii) una etapa de medir la cantidad de coactivador unido al heterodímero;

iii) una etapa de comparar la cantidad de coactivador medida en la etapa ii) con la cantidad de coactivador unido al heterodímero medida en el caso de no poner en contacto el heterodímero con la sustancia de prueba; y,

iv) una etapa de juzgar el ligando LXR para que tenga la función de aumentar la concentración de colesterol LDL en plasma y/o de triglicéridos en plasma en el caso de que la cantidad de coactivador medida en la etapa ii) aumente en comparación con la cantidad de coactivador unido al heterodímero medida en el caso de no poner en contacto el heterodímero con la sustancia de prueba.

Lo siguiente proporciona una explicación de cada etapa.

1)

Etapas 1)-i):

Un heterodímero que comprende LXR α y RXR α puede obtenerse mezclando LXR α y RXR α adquiridos según el procedimiento descrito en la sección anteriormente mencionada titulada "3. Preparación de LXR α , LXR β y RXR α ".

Además, un heterodímero de LXR α y RXR α puede adquirirse, por ejemplo, produciendo un vector que co-expresa una proteína fusionada del dominio de unión a ligando (aminoácido n° 164 a 447 de SEC ID N°: 2 del Listado de secuencias) de LXR α humano (SEC ID N°: 2) y marca tag, y una proteína fusionada del dominio de unión a ligando (aminoácido n° 201 a 462 de SEC ID N°: 4 del Listado de secuencias) de RXR α (SEC ID N°: 4) y FLAG, y purificando la proteína expresada por un recombinante transformado con dicho vector de expresión.

Además, un heterodímero que comprende LXRβ y RXRα usado para un experimento comparativo puede adquirirse, por ejemplo, produciendo un vector que co-expresa una proteína fusionada del dominio de unión a ligando (aminoácido nº 155 a 461 de SEC ID Nº: 6 del Listado de secuencias) de LXRβ humano (SEC ID Nº: 6) y marca tag, y una proteína fusionada del dominio de unión a ligando (aminoácido nº 201 a 462 de SEC ID Nº: 4 del Listado de secuencias) de RXRα (SEC ID Nº: 4) y FLAG, y purificando la proteína expresada por un recombinante transformado con dicho vector de expresión.

Los coactivadores de LXR explicados en la sección titulada "4. Preparación de coactivador" pueden usarse para el coactivador de LXR.

Las sustancias descritas en la sección titulada "2. Ligandos LXR" pueden usarse para la sustancia de prueba.

Además, un tampón para controlar el pH, o anticuerpo para detectar la proteína fusionada, puede añadirse a la disolución de reacción según sea necesario.

Estos materiales se mezclan entonces y se someten a la reacción, por ejemplo, descrita a continuación.

Condiciones de temperatura: 0 °C a 40 °C, y preferentemente 4 °C

Disolución de reacción pH: 6 a 9, y preferentemente 7,4

Tiempo de reacción: 1 minuto a 48 horas, y preferentemente 17 horas

La reacción puede llevarse a cabo usando, por ejemplo, una placa de ensayo de 384 pocillos.

Etapa 1)-ii):

Un ejemplo de un procedimiento para medir la cantidad de coactivador unido al heterodímero se describe a continuación.

En el caso de llevar a cabo la reacción en una placa de ensayo usando un coactivador en el que el extremo N se ha biotinilado, la placa se somete a luz de excitación a 337 nm con un lector de placas fluorescente tras completarse la reacción, se determina la intensidad fluorescente (A) a 665 nm y la intensidad fluorescente (B) a 620 nm y el valor medido a 655 nm se divide entre el valor medido a 620 nm, seguido de multiplicar el valor resultante por 1000 para determinar (C).

$$C = (A/B) \times 1000$$

A: Intensidad fluorescente a 665 nm

B: Intensidad fluorescente a 620 nm

Etapa 1)-iii):

El valor anterior de (C) se divide entre el valor (C') obtenido en el mismo experimento, excepto que no se añade la sustancia de prueba, y ese valor se multiplica por 100 para determinar la actividad relativa con respecto al control (R: % de control). La fórmula de cálculo es como se muestra a continuación.

$$C' = (A' / B') \times 1000$$

$$R = C / C' \times 100$$

A': Intensidad fluorescente a 665 nm en el caso de llevar a cabo la reacción sin añadir la sustancia de prueba

B': Intensidad fluorescente a 620 nm en el caso de llevar a cabo la reacción sin añadir la sustancia de prueba

Esto significa que cuanto mayor sea la actividad relativa (R), mayor será la cantidad unida de coactivador en comparación con el control al que no se añade ligando LXR.

En el caso de que la actividad relativa (R) sea superior a 100, puede juzgarse que la cantidad de coactivador aumenta como resultado de poner en contacto el heterodímero con la sustancia de prueba. Puede juzgarse que una sustancia de prueba tiene menos de una función que aumenta la concentración de colesterol LDL y/o la concentración de triglicéridos en plasma cuando más próximo sea a 100 su valor de actividad relativa.

En el caso de que la actividad relativa de una sustancia de prueba sea superior a la actividad relativa determinada para un ligando LXR para el que se está investigando la función de aumentar la concentración de colesterol LDL y/o triglicéridos en plasma (denominado "Compuesto X"), puede juzgarse que la función de aumentar la concentración de

colesterol LDL y/o de triglicéridos en plasma de la sustancia de prueba es más fuerte que la del Compuesto X.

En el caso de que la actividad relativa de una sustancia de prueba sea inferior a la actividad relativa determinada para el Compuesto X, puede juzgarse que la función de aumentar la concentración de colesterol LDL y/o de triglicéridos en plasma de la sustancia de prueba es más débil que la del Compuesto X.

- 5 Si se comparan las actividades relativas determinadas para una pluralidad de sustancias de prueba, puede juzgarse que una sustancia de prueba tiene una función más débil de aumentar la concentración de colesterol LDL y/o de triglicéridos en plasma cuanto menor sea su actividad relativa.

2)

Las Etapas 2)-i), 2)-ii) y 2)-iii) son las mismas que las etapas 1)-i), 1)-ii) y 1)-iii) anteriormente mencionadas.

- 10 Etapa 2)-iv):

Como se explicó en 1)-iii) anteriormente mencionada, puede juzgarse que una sustancia de prueba es una sustancia que tiene menos función que el aumento de la concentración de colesterol LDL y/o de triglicéridos en plasma cuanto más próximo sea a 100 su valor de actividad relativa. En cambio, en el caso de que su actividad relativa sea superior a 100, puede juzgarse que la sustancia de prueba tiene una función que aumenta la concentración de colesterol LDL y/o de triglicéridos en plasma.

- 15 En el caso de que la actividad relativa de una sustancia de prueba sea superior a la actividad relativa determinada para un ligando LXR para el que se está investigando la función de aumentar la concentración de colesterol LDL y/o de triglicéridos en plasma (denominado "Compuesto X"), puede juzgarse que la función de aumentar la concentración de colesterol LDL y/o de triglicéridos en plasma de la sustancia de prueba es más fuerte que la del Compuesto X.

- 20 En el caso de que la actividad relativa de una sustancia de prueba sea inferior a la actividad relativa determinada para el Compuesto X, puede juzgarse que la función de aumentar la concentración de colesterol LDL y/o de triglicéridos en plasma de la sustancia de prueba es más débil que la del Compuesto X.

- Si se comparan las actividades relativas determinadas para una pluralidad de sustancias de prueba, puede juzgarse que una sustancia de prueba tiene una función más débil de aumentar la concentración de colesterol LDL y/o de triglicéridos en plasma cuanto menor sea su actividad relativa.

- 25 Además, en 1) y 2) anteriormente mencionadas, además de basarse en la actividad relativa con respecto a un único coactivador, la actividad relativa también puede evaluarse exhaustivamente para una pluralidad de coactivadores para juzgar la función de aumentar la concentración de colesterol LDL en plasma y/o de triglicéridos en plasma de una sustancia de prueba.

- 30 6. Procedimiento para identificar sustancias que tienen poca o ninguna función de aumentar la concentración de colesterol LDL y/o de triglicéridos en plasma de un ligando LXR

Las siguientes etapas hacen posible adquirir un ligando LXR que tiene poca o ninguna función de aumentar la concentración de colesterol LDL y/o de triglicéridos en plasma:

- 35 i) una etapa de poner en contacto un heterodímero que comprende LXR α y RXR α con un coactivador de LXR y una sustancia de prueba;

ii) una etapa de medir la cantidad de coactivador unido al heterodímero;

iii) una etapa de comparar la cantidad de coactivador medida en la etapa ii) con la cantidad de coactivador unido al heterodímero medida en el caso de no poner en contacto el heterodímero con la sustancia de prueba; y,

- 40 iv) una etapa de juzgar que el ligando LXR tiene la función de no aumentar la concentración de LDL en plasma y/o concentración de triglicéridos en plasma en el caso de que la cantidad de coactivador medida en la etapa ii) no sea superior a la cantidad de coactivador unido al heterodímero medida en el caso de no poner en contacto el heterodímero con la sustancia de prueba.

- Estas etapas pueden llevarse a cabo por el mismo procedimiento que el procedimiento descrito en la sección anteriormente mencionada titulada "5. Procedimiento de evaluación de la función de aumentar niveles de colesterol LDL y/o de triglicéridos en plasma por ligandos LXR".

- 45 El término "la cantidad de coactivador medida en la etapa ii) no es superior a" se refiere a al menos una de las siguientes condiciones: a) la actividad relativa es aproximadamente 100, b) se demuestra que la actividad relativa es aproximadamente igual a o inferior a la actividad relativa determinada para un ligando LXR que se sabe que tiene poco

o ningún efecto de aumentar la concentración de colesterol LDL en plasma y/o de triglicéridos en plasma.

Según este procedimiento, una sustancia identificada por tener poca o ninguna función de aumentar la concentración de colesterol LDL y/o de triglicéridos en plasma puede ser un agente terapéutico o preventivo de una o más de las enfermedades seleccionadas de las enfermedades de (a) a (q) indicadas a continuación.

- 5 (a) arteriosclerosis;
- (b) aterosclerosis;
- (c) hiperlipidemia;
- (d) enfermedades relacionadas con los lípidos;
- (e) enfermedades inflamatorias mediadas por citocinas inflamatorias;
- 10 (f) enfermedades autoinmunitarias;
- (g) enfermedades cardiovasculares;
- (h) enfermedades cerebrovasculares;
- (i) enfermedades renales;
- (j) diabetes mellitus;
- 15 (k) complicaciones diabéticas;
- (l) obesidad;
- (m) nefritis;
- (n) hepatitis;
- (o) tumor;
- 20 (p) enfermedad de Alzheimer; y
- (q) arteriosclerosis producida por una o más de las enfermedades seleccionadas de (c) a (o).

7. Un kit para identificar ligando LXR

Puede usarse un kit indicado a continuación para identificar ligandos LXR que no aumentan la concentración de colesterol LDL y/o de triglicéridos en plasma en un mamífero, que comprenden uno o más de los componentes seleccionados del grupo que consiste en [A] a [L] a continuación:

[A] un polipéptido LXR α de longitud completa humano, un polipéptido RXR α de longitud completa humano y un coactivador seleccionado del grupo que consiste en PGC-1 α (receptor activado por proliferador de peroxisomas de Homo sapiens, coactivador gamma 1, alfa), TIF-2 (coactivador 2 de receptor nuclear de Homo sapiens), ASC-2 (cointegrador 2 de señal activante), SCR-1 (coactivador 1 de receptor esteroide humano), DAX1 (región crítica de hipoplasia suprarrenal congénita (AHC) de inversión de sexo sensible a la dosificación sobre el cromosoma X, gen 1), PNRC (proteína correguladora de receptor nuclear rico en prolina), TRAP220 (proteína 220 asociada a receptor de la hormona tiroidea), PERC (coactivador 1 gamma de receptor activado por proliferador de peroxisomas beta) y ACTR (coactivador 3 de receptor esteroideo),

en el que el polipéptido LXR α de longitud completa humano tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N $^{\circ}$: 2 o una variante de la misma que tiene al menos el 80% de identidad con SEC ID N $^{\circ}$: 2, y el polipéptido RXR α de longitud completa humano tiene al menos el 80% de identidad con SEC ID N $^{\circ}$: 4;

[B] un sitio de unión a ligando de un polipéptido descrito en [A], y uno cualquiera de los coactivadores expuestos en [A],

en el que el sitio de unión a ligando de un polipéptido LXR α de longitud completa humano tiene la secuencia de aminoácidos del aminoácido n $^{\circ}$ 164 a 447 de SEC ID N $^{\circ}$: 2 o una variante de la misma que tiene al menos el 80% de identidad con el aminoácido n $^{\circ}$ 164 a 447 de SEC ID N $^{\circ}$: 2, y un sitio de unión a ligando de polipéptido RXR α de longitud completa humano tiene la secuencia de aminoácidos del aminoácido n $^{\circ}$ 201 a 462 de SEC ID N $^{\circ}$: 4 o una variante de la misma que tiene al menos el 80% de identidad con el aminoácido n $^{\circ}$ 201 a 462 de SEC ID N $^{\circ}$: 4;

[C] un polipéptido fusionado que contiene un sitio de unión a ligando expuesto en [B], y uno cualquiera de los coactivadores expuestos en [A];

5 [D] un polipéptido expuesto en una cualquiera de [A] a [C], y un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 22, SEC ID N°: 23, SEC ID N°: 24, SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 26, SEC ID N°: 27, SEC ID N°: 28 y variantes de las mismas;

[E] un polinucleótido que codifica un polipéptido descrito en [A], y uno cualquiera de los coactivadores expuestos en [A];

10 [F] un polinucleótido que codifica un polipéptido descrito en [B], y uno cualquiera de los coactivadores expuestos en [A];

[G] un polinucleótido que codifica un polipéptido descrito en [C], y uno cualquiera de los coactivadores expuestos en [A];

15 [H] un polinucleótido expuesto en una cualquiera de [E] a [G], y un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 22, SEC ID N°: 23, SEC ID N°: 24, SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 26, SEC ID N°: 27, SEC ID N°: 28 y variantes de las mismas;

[I] un vector recombinante que contiene un polinucleótido expuesto en una cualquiera de [E] a [H], y uno cualquiera de los coactivadores expuestos en [A];

20 [J] un vector recombinante expuesto en [I] que es un vector de expresión, y uno cualquiera de los coactivadores expuestos en [A];

[K] células huésped transformadas con un vector recombinante expuesto en [I] o [J], y uno cualquiera de los coactivadores expuestos en [A]; y

[L] células huésped expuestas en [K] que son células de mamífero, y uno cualquiera de los coactivadores expuestos en [A].

25 Ejemplos

Aunque lo siguiente proporciona una explicación más detallada de la presente invención mediante sus ejemplos de prueba y ejemplos, la presente invención no se limita a ésta.

Ejemplo 1 de prueba. Medición de la actividad de salida de colesterol del ligando LXR (ensayo de salida de colesterol)

30 La actividad de salida de colesterol de dos tipos de ligandos LXR (Compuesto A (N-(2,2,2-trifluoroetil)-N-{4-[2,2,2-trifluoro-1-hidroxi-1-(trifluorometil)etil]fenil}bencenosulfonamida y Compuesto B (ácido 3-cloro-4-(3-(2-propil-3-trifluorometil-6-benz-[4,5]-isoxazoloxi)propil)fenil)acético) se midió usando el procedimiento descrito a continuación.

3×10^5 células THP-1 (ATCC n°: TIB-202) se diseminaron en una placa blanca de 96 pocillos (Costar), seguido de la adición de 12-miristato 13-acetato de forbol 200 nM (Sigma) y cultivo durante 24 horas a 37 °C en una estufa de incubación con CO₂.

35 A continuación, alícuotas de 125 µl de medio (RPMI 1640 (Invitrogen) + 1% de suero bovino fetal (denominado en lo sucesivo "SBF", (Invitrogen)) que contenía 0,2 µCi/ml de 4-¹⁴C-colesterol (Perkin-Elmer) se añadieron a cada pocillo, seguido de cultivar adicionalmente durante 48 horas a 37 °C en una estufa de incubación con CO₂.

40 Tras completarse el cultivo se añadieron 100 µl de PBS que contenía 0,2% de albúmina de suero bovino (denominada en lo sucesivo "BSA", (Sigma Chemical)) a cada pocillo para lavar las células. A continuación se añadieron 100 µl de RPMI 1640 que contenía apolipoproteína A1 (denominada en lo sucesivo "ApoA1", (Biogenesis)) a una concentración final de 10 µg/ml, o RPMI 1640 que no contenía ApoA1, a cada pocillo. A continuación se añadió una disolución de DMSO a los pocillos de manera que la concentración final del Compuesto A (N-(2,2,2-trifluoroetil)-N-{4-[2,2,2-trifluoro-1-hidroxi-1-(trifluorometil)etil]fenil}bencenosulfonamida o el Compuesto B (ácido 3-cloro-4-(3-(2-propil-3-trifluorometil-6-benz-[4,5]-isoxazoloxi)propil)fenil)acético) fue 0,01 µM, 0,1 µM y 1 µM cada uno y la concentración final de DMSO fue 45 del 1%, seguido de cultivar durante 24 horas a 37 °C en una estufa de incubación con CO₂.

Tras completarse el cultivo, la placa se centrifugó durante 5 minutos a 1.000 rpm y 4 °C. 75 µl de medio en forma del sobrenadante centrifugado se transfirieron a una placa Luma 96 de pocillos (Packard) y se dejó secar. Por otra parte, se añadieron 100 µl de PBS a cada pocillo de la placa en la que las células se habían depositado para lavar las células.

Se añadieron alícuotas de 250 µl de Micro Scinti 20 (Packard) a cada pocillo de la placa que contenía las células lavadas y se dejó que reposaran durante la noche, seguido de medir la radiactividad del medio y las células con un contador de centelleo (Top Count, Packard). El porcentaje (%) de salida se calculó a partir de los valores medidos usando la fórmula de cálculo mostrada a continuación.

$$5 \quad \% \text{ de salida} = (\text{Radiactividad específica del medio (cpm)} / 75 \times 100) / (\text{Radiactividad específica del medio (cpm)} + \text{Radiactividad específica de las células (cpm)}) \times 100$$

Al valor de % de salida obtenido del Compuesto A a una concentración de 1 µM se le asignó un valor de 100, y los otros resultados se convirtieron basándose en este valor para determinar la actividad relativa (Tabla 1). El Compuesto A y el Compuesto B demostraron actividad de salida de colesterol de aproximadamente el 50% a una concentración final de 0,01 µM, demostraron actividad de salida de aproximadamente el 100% a 1 µM, y se determinó claramente que los ligandos LXR en forma de Compuesto A y Compuesto B tenían igual actividad de salida de colesterol.

Tabla 1

Concentración final de compuesto	0,01 µM	0,1 µM	1 µM
Compuesto A	49%	86%	100%
Compuesto B	54%	90%	101%

Ejemplo 1. Adquisición de proteínas fusionadas con marca de histidina

15 (1) Construcción de plásmido de expresión de proteína LXRα humano fusionado con marca de histidina

Se sintetizaron oligonucleótidos que comprenden las siguientes secuencias de nucleótidos:

gccatgatgctggaggagtgctgctgctc (LXRα-F: SEC ID N°: 7 del Listado de secuencias),

ctggatcctctgtgcacatcccagatct (LXRα-R: SEC ID N°: 8 del Listado de secuencias)

con un sintetizador de ADN para su uso como cebadores de PCR, la PCR se llevó a cabo usando como molde una biblioteca de ADNc de hígado humano (véase P.J. Willy y col., Genes Dev. 9 (9), 1033-1045 (1995)), y se amplificó un fragmento de ADN en el que los sitios NdeI y BamHI de la enzima de restricción se introdujeron en el dominio de unión a ligando (denominado en lo sucesivo "LBD": aminoácido n° 164 a 447 de SEC ID N°: 2 del Listado de secuencias) de LXRα humano (SEC ID N°: 2). El fragmento de ADN se digirió con enzima de restricción NdeI y BamHI y se ligó al plásmido de expresión pET15b de proteína fusionada con la marca tag (Novagen) digerido con NdeI y BamHI. El plásmido de expresión de proteína LXRα humana fusionada con marca de histidina resultante se designó pET15b-LXRα.

(2) Construcción de plásmido de expresión de proteína humana LXRβ fusionada con marca de histidina

Se usaron oligonucleótidos que comprenden las siguientes secuencias de nucleótidos:

gccatgatgaggagcagtgctgctcttc (LXRβ-F: SEC ID N°: 9 del Listado de secuencias)

30 ctggatcctctgtggacgtcccagatct (LXRβ-R: SEC ID N°: 10 del Listado de secuencias)

como cebadores de PCR, la PCR se llevó a cabo usando como molde una biblioteca de ADNc de hígado humano y se amplificó un fragmento de ADN en el que los sitios NdeI y BamHI de la enzima de restricción se introdujeron en el dominio de unión a ligando (LBD: aminoácido n° 155 a 461 de SEC ID N°: 6) de LXRβ humano (SEC ID N°: 6). El fragmento de ADN amplificado se digirió con restrictasas NdeI y BamHI y se ligó al plásmido de expresión pET15b de proteína fusionada con la marca tag (Novagen) digerido con NdeI y BamHI. El plásmido de expresión de proteína LXRβ humana fusionada con marca de histidina resultante se designó pET15b-LXRβ.

(3) Construcción del co-plásmido de expresión His-LXRα, FLAG-RXRα y el co-plásmido de expresión His-LXRβ, FLAG-RXRα

Se usaron oligonucleótidos que comprenden las siguientes secuencias de nucleótidos:

40 ccagatctaagcgggaagccgtgcagga (RXRα-F: SEC ID N°: 11 del Listado de secuencias)

ccagatctagtcatttggctgctggcgcct (RXR-R: SEC ID N°: 12 del Listado de secuencias)

como cebadores de PCR, la PCR se llevó a cabo usando como molde ADNc de hígado humano (Clontech) y se amplificó un fragmento de ADN en el que un sitio BglIII se introdujo en el dominio de unión a ligando (aminoácido nº 201 a 462 de SEC ID Nº: 4) de RXR α humano (nº de acceso de GenBank X52773; SEC ID Nº: 4). El fragmento de ADN amplificado se digirió con enzima de restricción BglIII y se ligó a pET15b-LXR α digerido con BamHI para construir un plásmido que co-expresa His-LXR α (SEC ID Nº: 13) y FLAG-RXR α (SEC ID Nº: 14 del Listado de secuencias) designado pET15b-LXR α /FLAG-RXR α .

Además, el fragmento de ADN anteriormente mencionado obtenido por PCR se digirió con BglIII y se incorporó en el sitio BamHI de pET15b-LXR β digerido con BamHI para construir un plásmido que co-expresa His-LXR β (SEC ID Nº: 15) y FLAG-RXR α designado pET15b-LXR β /FLAG-RXR α .

10 (4) Adquisición de His-LXR α /FLAG-RXR α y His-LXR β /FLAG-RXR α

La cepa BL21(DE3) de *Escherichia coli* se transformó usando pET15b-LXR α /FLAG-RXR α o pET15b-LXR β /FLAG-RXR α . Cada uno de los transformantes resultantes se cultivó con agitación durante 4 horas a 37 °C en 20 ml de medio L-broth (que contiene 10 g de triptona (Difco), 5 g de extracto de levadura (Difco), 5 g de cloruro sódico cada uno en una disolución acuosa de 1 l) que contiene 100 µg/ml de ampicilina. A continuación, los transformantes se inocularon a 5,0% (v/v) en 400 ml de L-broth que contiene 100 µg/ml de ampicilina y se cultivaron con agitación durante 4 horas a 37 °C. Posteriormente se añadió isopropil- β -D-tiogalactopiranosido 0,1 mM (denominado en lo sucesivo "IPTG"), seguido de cultivo con agitación durante 17 horas a 25 °C.

Tras completarse la reacción, las células microbianas se recogieron por separación centrífuga durante 10 minutos a 8.000 x g y luego se suspendieron en 40 ml de tampón de lisis (Tabla 2). Posteriormente, las células se rompieron por un homogeneizador ultrasónico, y después de eliminar la fracción insoluble por separación centrífuga (11.000 x g, 20 minutos), se añadieron 2 ml de resina Ni²⁺ (Probond Resin, Invitrogen), seguido de agitación suave durante 1,5 horas sobre hielo. Después de lavar el gel siete veces con 20 ml de tampón de lavado (Tabla 3), el gel se eluyó cuatro veces usando 1 ml de tampón de elución (Tabla 4) según el procedimiento discontinuo para obtener 4 ml de cada uno de His-LXR α /FLAG-RXR α y His-LXR β /FLAG-RXR α . Después de llevar a cabo electroforesis en gel de 12,5% de SDS-poliacrilamida (denominado en lo sucesivo "SDS-PAGE"), se confirmó que las proteínas purificadas estaban presentes en las localizaciones correspondientes a los pesos moleculares predichos de la proteína fusionada de 35.500 para His-LXR α , 37.200 para His-LXR β y 30.900 para FLAG-RXR α , y las concentraciones de proteína se determinaron según el método de Bradford. Se añadieron 4 ml de disolución de almacenamiento (Tabla 5) a las disoluciones de proteína resultantes después lo cual se almacenaron a -20 °C.

30 Tabla 2

Tampón de lisis (pH 8,0)	
NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
MgCl ₂	5 mM
Tween 20	0,05% (v/v)
Glicerol	10% (v/v)
Imidazol	10 mM

Tabla 3

Tampón de lavado (pH 8,0)	
NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
MgCl ₂	5 mM
Tween 20	0,05% (v/v)
Glicerol	10% (v/v)

(continuación)

Tampón de lavado (pH 8,0)	
Imidazol	20 mM

Tabla 4

Tampón de elución (pH 8,0)	
NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
MgCl ₂	5 mM
Tween 20	0,05% (v/v)
Glicerol	10% (v/v)
Imidazol	250 mM

5

Tabla 5

Disolución de almacenamiento	
Glicerol	90%(v/v)
EDTA	2 mM
(±)-Ditiotreitól	20 mM
PMSF	2 mM
β-Mercaptoetanol	10 mM

Inhibidor de proteasas

Ejemplo 2. Selección de ligandos LXR basándose en la capacidad de unión a LXRα usando ensayo de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (denominado en lo sucesivo "FRET")

10 8 μl de disolución de reacción de LXRα (0,05 μl de disolución 4 μM mixta de His-LXRα y FLAG-RXRα, 1,00 μl de 10 x PBS (Sigma Chemical), 2,50 μl de KF 2 M (Wako Pure Chemical Industries), 0,10 μl de NP40 al 10% (Sigma Chemical), 0,15 μl de anticuerpo anti-marca tag (CIS Bio International) y 4,20 μl de H₂O) que contiene His-LXRα y FLAG-RXRα preparada según el Ejemplo 1 se dispusieron en una placa de ensayo de 384 pocillos (Greiner Bio-One).

15 A continuación, 2 μl de una disolución del Compuesto A (N-(2,2,2-trifluoroetil)-N-{4-[2,2,2-trifluoro-1-hidroxi-1-(trifluorometil)etil]fenil}bencenosulfonamida (Compuesto 12 descrito en la página 55 de la Publicación internacional WO2000/054759) o Compuesto B (ácido 3-cloro-4-(3-(2-propil-3-trifluorometil-6-benz-[4,5]-isooxazoloxi)propil)io)fenilacético (un compuesto descrito en el Ejemplo 20 en la página 70 de la Publicación internacional WO1997/028137), se disolvieron a una concentración de 10 μM en sulfóxido de dimetilo (denominado en lo sucesivo "DMSO"), se añadieron a cada pocillo de una placa de ensayo de 384 pocillos, seguido de incubación
20 durante 1 hora a temperatura ambiente.

A continuación, 10 μl de disolución de reacción de péptido (1,00 μl de péptido 5 μM, 1,00 μl de 10 x PBS, 2,50 μl de KF 2 M, 0,10 μl de NP40 al 10%, 0,20 μl de estreptavidina (CIS Bio International) y 5,20 μl de H₂O) se añadieron a cada pocillo de la placa de ensayo de 384 pocillos y se incubaron durante 17 horas a 4 °C. El péptido añadido aquí
25 comprendía cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos de (a) a (g), y el aminoácido del extremo N se biotiniló.

(a) PGC-1α: DGTPPPQEAEEPSLLKLLLPANT (aa 130-154) (NM_013261) (SEC ID N°: 16 del Listado de secuencias)

(b) TIF2: HGTSLKEKHKILHRLQLDSSSPVDL (aa 679-703) (NM_006540) (SEC ID N°: 17 del Listado de secuencias)

(c) ASC-2 NR-1: NKDVTLTSPLLVNLQSDISAGHFGVNNKQ (motivo LXXLL en el lado del extremo N de ASC-2) (aa 887-906) (AF177388) (SEC ID N°: 18 del Listado de secuencias)

5 (d) ASC-2 NR-2: SPAMREAPTSLSQLDNSGAPNVTIKPPGL (motivo LXXLL en el lado del extremo C de ASC-2) (aa 1481-1510) (SEC ID N°: 19 del Listado de secuencias)

(e) SRC-1-2: CPSSHSLTERHKILHRLQEGSPS (el segundo motivo LXXLL del lado del extremo N de SRC-1) (aa 676-700) (U90661) (SEC ID N°: 20 del Listado de secuencias)

10 (f) SRC-1-3: KESKDHQLLRYLKDKDEKDL (el tercer motivo LXXLL del lado del extremo N de SRC-1) (aa 741-760) (SEC ID N°: 21 del Listado de secuencias)

(g) SRC-1-4: QKPTSGPQTPQAQKSLQQLLQTE (el cuarto motivo LXXLL del lado del extremo N de SRC-1) (aa 1418-1441) (SEC ID N°: 22 del Listado de secuencias)

15 Tras completarse la incubación, la placa de ensayo se sometió a luz de excitación a 337 nm usando un lector de placas fluorescente (Envision, Perkin-Elmer) y se midió absorbancia fluorescente a 665 nm y 620 nm para determinar la capacidad de unión entre la proteína y el péptido.

20 Se determinó el valor obtenido multiplicando 1000 por el valor resultante de dividir el valor medido a 665 nm cuando se aplica luz de excitación a 337 nm entre el valor medido a 620 nm. Este valor se dividió entonces entre el valor determinado por el mismo procedimiento cuando solo se añadió DMSO sin añadir ligando LXR (Compuesto A o Compuesto B), y este valor se multiplicó entonces por 100 y se indicó como el porcentaje con respecto al control (% de control) como se muestra en la Tabla 6.

El valor para el % de control determinado aquí es el valor, representado por un porcentaje, que indica la relación del aumento en la cantidad de coactivador unido a LXR α que resulta de añadir ligando LXR, y cuanto mayor sea este valor, mayor será la cantidad de coactivador que se une a LXR α .

25 Según el presente ejemplo, el Compuesto A se identificó como un compuesto en el que el aumento de la cantidad de coactivador unido a LXR α , mientras que el Compuesto B se identificó como un compuesto que no aumenta la cantidad unida.

Aunque el Compuesto A y el Compuesto B demostraron actividad de salida de colesterol igual basándose en los resultados del Ejemplo 1 de prueba, la cantidad de coactivador unido a LXR α fue mayor para el Compuesto A que para el Compuesto B.

30 **Ejemplo 3. Selección de ligandos LXR basándose en la capacidad de unión a LXR β usando ensayo de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (denominado en lo sucesivo "FRET") (1)**

35 Se dispusieron 8 μ l de disolución de reacción de LXR β (0,025 μ l de disolución 8 μ M mixta de His-LXR β y FLAG-RXR α , 1,00 μ l de 10 x PBS, 2,50 μ l de KF 2 M, 0,10 μ l de NP40 al 10%, 0,15 μ l de anticuerpo anti-marca tag y 4,23 μ l de H₂O) que contenía His-LXR β y FLAG-RXR α preparado según el Ejemplo 1 en una placa de ensayo de 384 pocillos (Greiner Bio-One) y se midió según el mismo procedimiento que el Ejemplo 2 para determinar el % de control (Tabla 6). No se observó diferencia significativa en los valores resultantes entre el Compuesto A y el Compuesto B.

Tabla 6

Péptido	LXR α (% de control)		LXR β (% de control)	
	Compuesto A	Compuesto B	Compuesto A	Compuesto B
PGC-1 α	361,7	207,1	191,0	195,0
ASC2 NR-1	155,8	116,0	114,5	115,1
ASC2 NR-2	254,0	137,2	120,4	116,3
SRC1-2	267,0	182,1	120,4	119,4
SRC1-3	181,3	111,6	110,6	108,4
SRC1-4	207,3	128,3	154,6	143,9

(continuación)

Péptido	LXR α (% de control)		LXR β (% de control)	
	Compuesto A	Compuesto B	Compuesto A	Compuesto B
TIF2	266,7	157,1	107,9	114,4

Ejemplo 4. Selección de ligandos LXR basándose en la capacidad de unión a LXR α y LXR β usando ensayo de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (denominado en lo sucesivo “FRET”).

5 (1) Según el mismo procedimiento que el Ejemplo 2) (usando los siguientes péptidos (h) a (m), en lugar de los péptidos (a) a (g) en el Ejemplo 2), se determinó la cantidad de coactivador unido al heterodímero LXR α y RXR α .

La cantidad de coactivador unido al heterodímero que comprende LXR α y RXR α fue mayor para el Compuesto A que para el Compuesto B (Tabla 7).

10 (h) DAX1: CCFGEDHPRQGSILYLLTSSKQT (aa 132-156) (NP_000466) (SEC ID N°: 23 del Listado de secuencias)

(i) PNRC: KNPTSCSRRFYQLTKLLDSVQPIAR (aa 848-872) (NM_000044) (SEC ID N°: 24 del Listado de secuencias)

(j) TIF2 NRB2: KQEPVSPKKKENALLRYLLDKDDTK (aa 731-755) (NM_006540) (SEC ID N°: 25 del Listado de secuencias)

15 (k) TRAP220: GHGEDFSKVSQNPILTSLQITGNG (aa 590-614) (NM_004774) (SEC ID N°: 26 del Listado de secuencias)

(l) PERC NRB2: HSKASWAEFSILRELLAQDVLCD (aa 332-354) (NM_133263) (SEC ID N°: 27 del Listado de secuencias)

20 (m) ACTR NRB3: SPKKKENALLRYLLDRDDPSDALS (aa 728-753) (AF012108) (SEC ID N°: 28 del Listado de secuencias)

(2) LXR β : Según el mismo procedimiento en el Ejemplo 3) (usando los péptidos (h) a (m) anteriores, en lugar de los péptidos (a) a (g) en el Ejemplo 3), se determinó la cantidad de coactivador unido al heterodímero que comprende LXR β y RXR α . No se observó diferencia significativa en los valores resultantes entre el Compuesto A y el Compuesto B (Tabla 7).

25

Tabla 7

Péptido	LXR α (% de control)		LXR β (% de control)	
	Compuesto A	Compuesto B	Compuesto A	Compuesto B
DAX1	158	107	116	120
PNRC	140	110	109	107
TIF2 NRB2	268	127	125	124
TRAP220	131	107	111	116
PERC NRB2	127	104	104	115
ACTR NRB3	167	92	129	103

Ejemplo 2 de prueba. Estudio de administración diaria consecutiva en mono cinomolgo

30 Monos cinomolgos macho de cinco a siete años de edad en grupos de 5 animales cada uno se alimentaron a la fuerza solo con una base de administración (propilenglicol (Wako Pure Chemical Industries)/Tween 80 (Kao) (relación de volumen: 4/1, denominado en lo sucesivo “PG/Tween”)) (denominado en lo sucesivo “el grupo de control”), o Compuesto A o Compuesto B disuelto en PG/Tween en una cantidad de 3 mg/kg o 10 mg/kg una vez al día durante 7

días entre las horas de 8:00 y 10:00 AM. Después de ayunar durante 16 horas a partir de las 5:00 PM en el 7º día de administración, se recogió 1 ml de sangre de la vena cefálica con una jeringuilla heparinizada, seguido de centrifugar durante 15 minutos a 4 °C y 5000 rpm para obtener plasma.

5 Los niveles de colesterol LDL y triglicéridos en plasma se midieron con un analizador automático (Hitachi modelo 7170), seguido de cálculo del % de grupo de control (Tablas 8 y 9).

Se determinó claramente que el Compuesto A, que se identificó en el Ejemplo 2 que era un compuesto que aumenta la cantidad de coactivador unido a LXR α , aumentaba la concentración de colesterol LDL y la concentración de triglicéridos en plasma en comparación con un compuesto identificado como un compuesto que no aumenta la cantidad de coactivador unido a LXR α .

10 Concretamente, se determinó claramente que si un ligando LXR tenía o no la función de aumentar la concentración de colesterol LDL en plasma y la concentración de triglicéridos podía evaluarse simplemente midiendo la cantidad de coactivador unido a una heteroproteína de LXR α y RXR α en el momento de la adición de ligando LXR sin tener que realizar un estudio en animales.

Tabla 8 Valor relativo de colesterol LDL en plasma

Dosificación diaria de compuesto	3 mg/kg	10 mg/kg
Compuesto A	137%	207%
Compuesto B	111%	150%

15

Tabla 9 Valor relativo de TG en plasma

Dosificación diaria de compuesto	3 mg/kg	10 mg/kg
Compuesto A	429%	661%
Compuesto B	73%	120%

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Terasaka, Naoki
- 20 Honzumi, Shoko
- Shulman, Ira G.
- Wagner, Brandee L.
- Willy, Patricia J.
- 25 <120> PROCEDIMIENTO DE PRUEBA DE LIGANDO LXR
- <130> 05424PCT/HG
- <150> Solicitud provisional de EE.UU. nº 60/694806
- 30 <151> 28-06-2005
- <160> 28

ES 2 438 739 T3

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 1528

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

10 <222> (36)..(1379)

<400> 1

```

cagtgcccttg gtaatgacca gggctccaga aagag atg tcc ttg tgg ctg ggg      53
                               Met Ser Leu Trp Leu Gly
                               1                               5

gcc cct gtg cct gac att cct cct gac tct gcg gtg gag ctg tgg aag      101
Ala Pro Val Pro Asp Ile Pro Pro Asp Ser Ala Val Glu Leu Trp Lys
          10                               15                               20

cca ggc gca cag gat gca agc agc cag gcc cag gga ggc agc agc tgc      149
Pro Gly Ala Gln Asp Ala Ser Ser Gln Ala Gln Gly Gly Ser Ser Cys
          25                               30                               35

atc ctc aga gag gaa gcc agg atg ccc cac tct gct ggg ggt act gca      197
Ile Leu Arg Glu Glu Ala Arg Met Pro His Ser Ala Gly Gly Thr Ala
          40                               45                               50

ggg gtg ggg ctg gag gct gca gag ccc aca gcc ctg ctc acc agg gca      245
Gly Val Gly Leu Glu Ala Ala Glu Pro Thr Ala Leu Leu Thr Arg Ala
          55                               60                               65                               70

gag ccc cct tca gaa ccc aca gag atc cgt cca caa aag cgg aaa aag      293
Glu Pro Pro Ser Glu Pro Thr Glu Ile Arg Pro Gln Lys Arg Lys Lys
          75                               80                               85

ggg cca gcc ccc aaa atg ctg ggg aac gag cta tgc agc gtg tgt ggg      341
Gly Pro Ala Pro Lys Met Leu Gly Asn Glu Leu Cys Ser Val Cys Gly
          90                               95                               100
    
```

ES 2 438 739 T3

gac aag gcc tcg ggc ttc cac tac aat gtt ctg agc tgc gag ggc tgc	389
Asp Lys Ala Ser Gly Phe His Tyr Asn Val Leu Ser Cys Glu Gly Cys	
105 110 115	
aag gga ttc ttc cgc cgc agc gtc atc aag gga gcg cac tac atc tgc	437
Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser Val Ile Lys Gly Ala His Tyr Ile Cys	
120 125 130	
cac agt ggc ggc cac tgc ccc atg gac acc tac atg cgt cgc aag tgc	485
His Ser Gly Gly His Cys Pro Met Asp Thr Tyr Met Arg Arg Lys Cys	
135 140 145 150	
cag gag tgt cgg ctt cgc aaa tgc cgt cag gct ggc atg cgg gag gag	533
Gln Glu Cys Arg Leu Arg Lys Cys Arg Gln Ala Gly Met Arg Glu Glu	
155 160 165	
tgt gtc ctg tca gaa gaa cag atc cgc ctg aag aaa ctg aag cgg caa	581
Cys Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Arg Leu Lys Lys Leu Lys Arg Gln	
170 175 180	
gag gag gaa cag gct cat gcc aca tcc ttg ccc ccc agg cgt tcc tca	629
Glu Glu Glu Gln Ala His Ala Thr Ser Leu Pro Pro Arg Arg Ser Ser	
185 190 195	
ccc ccc caa atc ctg ccc cag ctc agc ccg gaa caa ctg ggc atg atc	677
Pro Pro Gln Ile Leu Pro Gln Leu Ser Pro Glu Gln Leu Gly Met Ile	
200 205 210	
gag aag ctc gtc gct gcc cag caa cag tgt aac cgg cgc tcc ttt tct	725
Glu Lys Leu Val Ala Ala Gln Gln Gln Cys Asn Arg Arg Ser Phe Ser	
215 220 225 230	
gac cgg ctt cga gtc acg cct tgg ccc atg gca cca gat ccc cat agc	773
Asp Arg Leu Arg Val Thr Pro Trp Pro Met Ala Pro Asp Pro His Ser	
235 240 245	
cgg gag gcc cgt cag cag cgc ttt gcc cac ttc act gag ctg gcc atc	821
Arg Glu Ala Arg Gln Gln Arg Phe Ala His Phe Thr Glu Leu Ala Ile	
250 255 260	
gtc tct gtg cag gag ata gtt gac ttt gct aaa cag cta ccc ggc ttc	869
Val Ser Val Gln Glu Ile Val Asp Phe Ala Lys Gln Leu Pro Gly Phe	
265 270 275	
ctg cag ctc agc cgg gag gac cag att gcc ctg ctg aag acc tct gcg	917
Leu Gln Leu Ser Arg Glu Asp Gln Ile Ala Leu Leu Lys Thr Ser Ala	
280 285 290	
atc gag gtg atg ctt ctg gag aca tct cgg agg tac aac cct ggg agt	965
Ile Glu Val Met Leu Leu Glu Thr Ser Arg Arg Tyr Asn Pro Gly Ser	
295 300 305 310	
gag agt atc acc ttc ctc aag gat ttc agt tat aac cgg gaa gac ttt	1013
Glu Ser Ile Thr Phe Leu Lys Asp Phe Ser Tyr Asn Arg Glu Asp Phe	
315 320 325	

ES 2 438 739 T3

gcc aaa gca ggg ctg caa gtg gaa ttc atc aac ccc atc ttc gag ttc 1061
Ala Lys Ala Gly Leu Gln Val Glu Phe Ile Asn Pro Ile Phe Glu Phe
330 335 340

tcc agg gcc atg aat gag ctg caa ctc aat gat gcc gag ttt gcc ttg 1109
Ser Arg Ala Met Asn Glu Leu Gln Leu Asn Asp Ala Glu Phe Ala Leu
345 350 355

ctc att gct atc agc atc ttc tct gca gac cgg ccc aac gtg cag gac 1157
Leu Ile Ala Ile Ser Ile Phe Ser Ala Asp Arg Pro Asn Val Gln Asp
360 365 370

cag ctc cag gtg gag agg ctg cag cac aca tat gtg gaa gcc ctg cat 1205
Gln Leu Gln Val Glu Arg Leu Gln His Thr Tyr Val Glu Ala Leu His
375 380 385 390

gcc tac gtc tcc atc cac cat ccc cat gac cga ctg atg ttc cca egg 1253
Ala Tyr Val Ser Ile His His Pro His Asp Arg Leu Met Phe Pro Arg
395 400 405

atg cta atg aaa ctg gtg agc ctc cgg acc ctg agc agc gtc cac tca 1301
Met Leu Met Lys Leu Val Ser Leu Arg Thr Leu Ser Ser Val His Ser
410 415 420

gag daa gtg ttt gca ctg cgt ctg cag gac aaa aag ctc cca ccg ctg 1349
Glu Gln Val Phe Ala Leu Arg Leu Gln Asp Lys Lys Leu Pro Pro Leu
425 430 435

ctc tct gag atc tgg gat gtg cac gaa tga ctgttctgtc cccatatttt 1399
Leu Ser Glu Ile Trp Asp Val His Glu
440 445

ctgttttctt ggccggatgg ctgaggcctg gtggctgcct cctagaagtg gaacagactg 1459

agaagggcaa acattcctgg gagctgggca aggagatcct cccgtggcat taaaagagag 1519

tcaaaggggt 1528

<210> 2

<211> 447

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Leu Trp Leu Gly Ala Pro Val Pro Asp Ile Pro Pro Asp Ser
1 5 10 15

Ala Val Glu Leu Trp Lys Pro Gly Ala Gln Asp Ala Ser Ser Gln Ala
20 25 30

Gln Gly Gly Ser Ser Cys Ile Leu Arg Glu Glu Ala Arg Met Pro His
35 40 45

ES 2 438 739 T3

Ser Ala Gly Gly Thr Ala Gly Val Gly Leu Glu Ala Ala Glu Pro Thr
 50 55 60

Ala Leu Leu Thr Arg Ala Glu Pro Pro Ser Glu Pro Thr Glu Ile Arg
 65 70 75 80

Pro Gln Lys Arg Lys Lys Gly Pro Ala Pro Lys Met Leu Gly Asn Glu
 85 90 95

Leu Cys Ser Val Cys Gly Asp Lys Ala Ser Gly Phe His Tyr Asn Val
 100 105 110

Leu Ser Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser Val Ile Lys
 115 120 125

Gly Ala His Tyr Ile Cys His Ser Gly Gly His Cys Pro Met Asp Thr
 130 135 140

Tyr Met Arg Arg Lys Cys Gln Glu Cys Arg Leu Arg Lys Cys Arg Gln
 145 150 155 160

Ala Gly Met Arg Glu Glu Cys Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Arg Leu
 165 170 175

Lys Lys Leu Lys Arg Gln Glu Glu Glu Gln Ala His Ala Thr Ser Leu
 180 185 190

Pro Pro Arg Arg Ser Ser Pro Pro Gln Ile Leu Pro Gln Leu Ser Pro
 195 200 205

Glu Gln Leu Gly Met Ile Glu Lys Leu Val Ala Ala Gln Gln Gln Cys
 210 215 220

Asn Arg Arg Ser Phe Ser Asp Arg Leu Arg Val Thr Pro Trp Pro Met
 225 230 235 240

Ala Pro Asp Pro His Ser Arg Glu Ala Arg Gln Gln Arg Phe Ala His
 245 250 255

Phe Thr Glu Leu Ala Ile Val Ser Val Gln Glu Ile Val Asp Phe Ala
 260 265 270

ES 2 438 739 T3

Lys Gln Leu Pro Gly Phe Leu Gln Leu Ser Arg Glu Asp Gln Ile Ala
 275 280 285

Leu Leu Lys Thr Ser Ala Ile Glu Val Met Leu Leu Glu Thr Ser Arg
 290 295 300

Arg Tyr Asn Pro Gly Ser Glu Ser Ile Thr Phe Leu Lys Asp Phe Ser
 305 310 315 320

Tyr Asn Arg Glu Asp Phe Ala Lys Ala Gly Leu Gln Val Glu Phe Ile
 325 330 335

Asn Pro Ile Phe Glu Phe Ser Arg Ala Met Asn Glu Leu Gln Leu Asn
 340 345 350

Asp Ala Glu Phe Ala Leu Leu Ile Ala Ile Ser Ile Phe Ser Ala Asp
 355 360 365

Arg Pro Asn Val Gln Asp Gln Leu Gln Val Glu Arg Leu Gln His Thr
 370 375 380

Tyr Val Glu Ala Leu His Ala Tyr Val Ser Ile His His Pro His Asp
 385 390 395 400

Arg Leu Met Phe Pro Arg Met Leu Met Lys Leu Val Ser Leu Arg Thr
 405 410 415

Leu Ser Ser Val His Ser Glu Gln Val Phe Ala Leu Arg Leu Gln Asp
 420 425 430

Lys Lys Leu Pro Pro Leu Leu Ser Glu Ile Trp Asp Val His Glu
 435 440 445

<210> 3

<211> 1866

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

10 <222> (76)..(1464)

<400> 3

gaattccggc gccgggggccc gcccgcccgc cgcccgcctgc ctgcgccgcc ggccgggcat 60

ES 2 438 739 T3

gagttagtcg cagac atg gac acc aaa cat ttc ctg ccg ctc gat ttc tcc	111
Met Asp Thr Lys His Phe Leu Pro Leu Asp Phe Ser	
1 5 10	
acc cag gtg aac tcc tcc ctg acc tcc ccg acg ggg cga ggc tcc atg	159
Thr Gln Val Asn Ser Ser Leu Thr Ser Pro Thr Gly Arg Gly Ser Met	
15 20 25	
gct gcc ccc tcg ctg cac ccg tcc ctg ggg cct ggc atc ggc tcc ccg	207
Ala Ala Pro Ser Leu His Pro Ser Leu Gly Pro Gly Ile Gly Ser Pro	
30 35 40	
gga cag ctg cat tct ccc atc agc acc ctg agc tcc ccc atc aac ggc	255
Gly Gln Leu His Ser Pro Ile Ser Thr Leu Ser Ser Pro Ile Asn Gly	
45 50 55 60	
atg ggc ccg cct ttc tcg gtc atc agc tcc ccc atg ggc ccc cac tcc	303
Met Gly Pro Pro Phe Ser Val Ile Ser Ser Pro Met Gly Pro His Ser	
65 70 75	
atg tcg gtg ccc acc aca ccc acc ctg ggc ttc agc act ggc agc ccc	351
Met Ser Val Pro Thr Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Thr Gly Ser Pro	
80 85 90	
cag ctc agc tca cct atg aac ccc gtc agc agc agc gag gac atc aag	399
Gln Leu Ser Ser Pro Met Asn Pro Val Ser Ser Ser Glu Asp Ile Lys	
95 100 105	
ccc ccc ctg ggc ctc aat ggc gtc ctc aag gtc ccc gcc cac ccc tca	447
Pro Pro Leu Gly Leu Asn Gly Val Leu Lys Val Pro Ala His Pro Ser	
110 115 120	
gga aac atg gct tcc ttc acc aag cac atc tgc gcc atc tgc ggg gac	495
Gly Asn Met Ala Ser Phe Thr Lys His Ile Cys Ala Ile Cys Gly Asp	
125 130 135 140	
cgc tcc tca gcc aag cac tat gga gtg tac agc tgc gag ggg tgc aag	543
Arg Ser Ser Gly Lys His Tyr Gly Val Tyr Ser Cys Glu Gly Cys Lys	
145 150 155	
ggc ttc ttc aag cgg acg gtg cgc aag gac ctg acc tac acc tgc cgc	591
Gly Phe Phe Lys Arg Thr Val Arg Lys Asp Leu Thr Tyr Thr Cys Arg	
160 165 170	
gac aac aag gac tgc ctg att gac aag cgg cag cgg aac cgg tgc cag	639
Asp Asn Lys Asp Cys Leu Ile Asp Lys Arg Gln Arg Asn Arg Cys Gln	
175 180 185	
tac tgc cgc tac cag aag tgc ctg gcc atg ggc atg aag cgg gaa gcc	687
Tyr Cys Arg Tyr Gln Lys Cys Leu Ala Met Gly Met Lys Arg Glu Ala	
190 195 200	
gtg cag gag gag cgg cag cgt ggc aag gac cgg aac gag aat gag gtg	735
Val Gln Glu Glu Arg Gln Arg Gly Lys Asp Arg Asn Glu Asn Glu Val	
205 210 215 220	
gag tcg acc agc agc gcc aac gag gac atg ccg gtg gag agg atc ctg	783

ES 2 438 739 T3

```

445                450                455                460
atg act tag gcctgcgggc ccaccccttg tgcccaccgc ttctggccac      1504
Met Thr

cctgcctgga cgccagctgt tcttctcagc ctgagccctg tcctgcctct tctctgctg      1564
gcctgttttg actttggggc acagcctgtc actgctctgc ctaagagatg tgttgtcacc      1624
ctccttattt ctgttactac ttgtctgtgg ccagggcag tggctttcct gaggcagcag      1684
cttcgtggca agaactagcg tgagcccagc caggcgcctc cccaccgggc tctcaggacg      1744
ccctgccaca cccacggggc ttggggcact acagggctct cggcccagc cctggagctg      1804
caggagtggg gaacggggct ttgtttccg ttgctgttta tcgatgctgg ttttcagaat      1864
tc                                                                 1866

```

<210> 4

<211> 462

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

Met Asp Thr Lys His Phe Leu Pro Leu Asp Phe Ser Thr Gln Val Asn
1                5                10                15

Ser Ser Leu Thr Ser Pro Thr Gly Arg Gly Ser Met Ala Ala Pro Ser
                20                25                30

Leu His Pro Ser Leu Gly Pro Gly Ile Gly Ser Pro Gly Gln Leu His
                35                40                45

Ser Pro Ile Ser Thr Leu Ser Ser Pro Ile Asn Gly Met Gly Pro Pro
50                55                60

Phe Ser Val Ile Ser Ser Pro Met Gly Pro His Ser Met Ser Val Pro
65                70                75                80

Thr Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Thr Gly Ser Pro Gln Leu Ser Ser
85                90                95

Pro Met Asn Pro Val Ser Ser Ser Glu Asp Ile Lys Pro Pro Leu Gly
100               105               110

Leu Asn Gly Val Leu Lys Val Pro Ala His Pro Ser Gly Asn Met Ala

```

ES 2 438 739 T3

	115		120		125												
Ser	Phe	Thr	Lys	His	Ile	Cys	Ala	Ile	Cys	Gly	Asp	Arg	Ser	Ser	Gly		
	130					135					140						
Lys	His	Tyr	Gly	Val	Tyr	Ser	Cys	Glu	Gly	Cys	Lys	Gly	Phe	Phe	Lys		
145					150					155					160		
Arg	Thr	Val	Arg	Lys	Asp	Leu	Thr	Tyr	Thr	Cys	Arg	Asp	Asn	Lys	Asp		
				165					170					175			
Cys	Leu	Ile	Asp	Lys	Arg	Gln	Arg	Asn	Arg	Cys	Gln	Tyr	Cys	Arg	Tyr		
			180					185					190				
Gln	Lys	Cys	Leu	Ala	Met	Gly	Met	Lys	Arg	Glu	Ala	Val	Gln	Glu	Glu		
		195					200						205				
Arg	Gln	Arg	Gly	Lys	Asp	Arg	Asn	Glu	Asn	Glu	Val	Glu	Ser	Thr	Ser		
	210					215						220					
Ser	Ala	Asn	Glu	Asp	Met	Pro	Val	Glu	Arg	Ile	Leu	Glu	Ala	Glu	Leu		
225					230					235					240		
Ala	Val	Glu	Pro	Lys	Thr	Glu	Thr	Tyr	Val	Glu	Ala	Asn	Met	Gly	Leu		
				245					250					255			
Asn	Pro	Ser	Ser	Pro	Asn	Asp	Pro	Val	Thr	Asn	Ile	Cys	Gln	Ala	Ala		
			260					265					270				
Asp	Lys	Gln	Leu	Phe	Thr	Leu	Val	Glu	Trp	Ala	Lys	Arg	Ile	Pro	His		
		275					280					285					
Phe	Ser	Glu	Leu	Pro	Leu	Asp	Asp	Gln	Val	Ile	Leu	Leu	Arg	Ala	Gly		
	290					295					300						
Trp	Asn	Glu	Leu	Leu	Ile	Ala	Ser	Phe	Ser	His	Arg	Ser	Ile	Ala	Val		
305					310					315					320		
Lys	Asp	Gly	Ile	Leu	Leu	Ala	Thr	Gly	Leu	His	Val	His	Arg	Asn	Ser		
				325					330					335			
Ala	His	Ser	Ala	Gly	Val	Gly	Ala	Ile	Phe	Asp	Arg	Val	Leu	Thr	Glu		
			340					345					350				

ES 2 438 739 T3

Leu Val Ser Lys Met Arg Asp Met Gln Met Asp Lys Thr Glu Leu Gly
 355 360 365

Cys Leu Arg Ala Ile Val Leu Phe Asn Pro Asp Ser Lys Gly Leu Ser
 370 375 380

Asn Pro Ala Glu Val Glu Ala Leu Arg Glu Lys Val Tyr Ala Ser Leu
 385 390 395 400

Glu Ala Tyr Cys Lys His Lys Tyr Pro Glu Gln Pro Gly Arg Phe Ala
 405 410 415

Lys Leu Leu Leu Arg Leu Pro Ala Leu Arg Ser Ile Gly Leu Lys Cys
 420 425 430

Leu Glu His Leu Phe Phe Phe Lys Leu Ile Gly Asp Thr Pro Ile Asp
 435 440 445

Thr Phe Leu Met Glu Met Leu Glu Ala Pro His Gln Met Thr
 450 455 460

<210> 5

<211> 2010

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

10

<222> (245)..(1630)

<400> 5

caagaagtgg cgaagttacc ttgaggggta ttgagtagc ggcggtgtgt caggggctaa 60

agaggaggac gaagaaaagc agagcaaggg aaccagggc aacaggagta gttcactccg 120

cgagaggccg tccacgagac ccccgcgcgc aggcattgagc cccgcccccc acgcatgagc 180

cccccccc gctgttgctt ggagaggggc gggacctgga gagaggctgc tccgtgacct 240

cacc atg tcc tct cct acc acg agt tcc ctg gat acc ccc ctg cct gga 289

Met Ser Ser Pro Thr Thr Ser Ser Leu Asp Thr Pro Leu Pro Gly
 1 5 10 15

aat ggc ccc cct cag cct ggc gcc cct tct tct tca ccc act gta aag 337

Asn Gly Pro Pro Gln Pro Gly Ala Pro Ser Ser Ser Pro Thr Val Lys
 20 25 30

ES 2 438 739 T3

gag gag ggt ccg gag ccg tgg ccc ggg ggt ccg gac cct gat gtc cca	385
Glu Glu Gly Pro Glu Pro Trp Pro Gly Gly Pro Asp Pro Asp Val Pro	
35 40 45	
ggc act gat gag gcc agc tca gcc tgc agc aca gac tgg gtc atc cca	433
Gly Thr Asp Glu Ala Ser Ser Ala Cys Ser Thr Asp Trp Val Ile Pro	
50 55 60	
gat ccc gaa gag gaa cca gag cgc aag cga aag aag ggc cca gcc ccg	481
Asp Pro Glu Glu Glu Pro Glu Arg Lys Arg Lys Lys Gly Pro Ala Pro	
65 70 75	
aag atg ctg ggc cac gag ctt tgc cgt gtc tgt ggg gac aag gcc tcc	529
Lys Met Leu Gly His Glu Leu Cys Arg Val Cys Gly Asp Lys Ala Ser	
80 85 90 95	
ggc ttc cac tac aac gtg ctc agc tgc gaa ggc tgc aag ggc ttc ttc	577
Gly Phe His Tyr Asn Val Leu Ser Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe	
100 105 110	
cgg cgc agt gtg gtc cgt ggt ggg gcc agg cgc tat gcc tgc cgg ggt	625
Arg Arg Ser Val Val Arg Gly Gly Ala Arg Arg Tyr Ala Cys Arg Gly	
115 120 125	
ggc gga acc tgc cag atg gac gct ttc atg cgg cgc aag tgc cag cag	673
Gly Gly Thr Cys Gln Met Asp Ala Phe Met Arg Arg Lys Cys Gln Gln	
130 135 140	
tgc cgg ctg cgc aag tgc aag gag gca ggg atg agg gag cag tgc gtc	721
Cys Arg Leu Arg Lys Cys Lys Glu Ala Gly Met Arg Glu Gln Cys Val	
145 150 155	
ctt tct gaa gaa cag atc cgg aag aag aag att cgg aaa cag cag cag	769
Leu Ser Glu Glu Gln Ile Arg Lys Lys Lys Ile Arg Lys Gln Gln Gln	
160 165 170 175	
cag gag tca cag tca cag tgc cag tca cct gtg ggg ccg cag ggc agc	817
Gln Glu Ser Gln Ser Gln Ser Gln Ser Pro Val Gly Pro Gln Gly Ser	
180 185 190	
agc agc tca gcc tct ggg cct ggg gct tcc cct ggt gga tct gag gca	865
Ser Ser Ser Ala Ser Gly Pro Gly Ala Ser Pro Gly Gly Ser Glu Ala	
195 200 205	
ggc agc cag ggc tcc ggg gaa ggc gag ggt gtc cag cta aca gcg gct	913
Gly Ser Gln Gly Ser Gly Glu Gly Glu Gly Val Gln Leu Thr Ala Ala	
210 215 220	
caa gaa cta atg atc cag cag ttg gtg gcg gcc caa ctg cag tgc aac	961
Gln Glu Leu Met Ile Gln Gln Leu Val Ala Ala Gln Leu Gln Cys Asn	
225 230 235	
aaa cgc tcc ttc tcc gac cag ccc aaa gtc acg ccc tgg ccc ctg ggc	1009
Lys Arg Ser Phe Ser Asp Gln Pro Lys Val Thr Pro Trp Pro Leu Gly	
240 245 250 255	
gca gac ccc cag tcc cga gat gcc cgc cag caa cgc ttt gcc cac ttc	1057

ES 2 438 739 T3

Ala Asp Pro Gln Ser Arg Asp Ala Arg Gln Gln Arg Phe Ala His Phe	
260 265 270	
acg gag ctg gcc atc atc tca gtc cag gag atc gtg gac ttc gct aag	1105
Thr Glu Leu Ala Ile Ile Ser Val Gln Glu Ile Val Asp Phe Ala Lys	
275 280 285	
caa gtg cct ggt ttc ctg cag ctg ggc cgg gag gac cag atc gcc ctc	1153
Gln Val Pro Gly Phe Leu Gln Leu Gly Arg Glu Asp Gln Ile Ala Leu	
290 295 300	
ctg aag gca tcc act atc gag atc atg ctg cta gag aca gcc agg cgc	1201
Leu Lys Ala Ser Thr Ile Glu Ile Met Leu Leu Glu Thr Ala Arg Arg	
305 310 315	
tac aac cac gag aca gag tgt atc acc ttc ttg aag gac ttc acc tac	1249
Tyr Asn His Glu Thr Glu Cys Ile Thr Phe Leu Lys Asp Phe Thr Tyr	
320 325 330 335	
agc aag gac gac ttc cac cgt gca ggc ctg cag gtg gag ttc atc aac	1297
Ser Lys Asp Asp Phe His Arg Ala Gly Leu Gln Val Glu Phe Ile Asn	
340 345 350	
ccc atc ttc gag ttc tcg cgg gcc atg cgg cgg ctg ggc ctg gac gac	1345
Pro Ile Phe Glu Phe Ser Arg Ala Met Arg Arg Leu Gly Leu Asp Asp	
355 360 365	
gct gag tac gcc ctg ctc atc gcc atc aac atc ttc tcg gcc gac cgg	1393
Ala Glu Tyr Ala Leu Leu Ile Ala Ile Asn Ile Phe Ser Ala Asp Arg	
370 375 380	
ccc aac gtg cag gag ccg ggc cgc gtg gag gcg ttg cag cag ccc tac	1441
Pro Asn Val Gln Glu Pro Gly Arg Val Glu Ala Leu Gln Gln Pro Tyr	
385 390 395	
gtg gag gcg ctg ctg tcc tac acg cgc atc aag agg ccg cag gac cag	1489
Val Glu Ala Leu Leu Ser Tyr Thr Arg Ile Lys Arg Pro Gln Asp Gln	
400 405 410 415	
ctg cgc ttc ccg cgc atg ctc atg aag ctg gtg agc ctg cgc acg ctg	1537
Leu Arg Phe Pro Arg Met Leu Met Lys Leu Val Ser Leu Arg Thr Leu	
420 425 430	
agc tct gtg cac tcg gag cag gtc ttc gcc ttg cgg ctc cag gac aag	1585
Ser Ser Val His Ser Glu Gln Val Phe Ala Leu Arg Leu Gln Asp Lys	
435 440 445	
aag ctg ccg cct ctg ctg tcg gag atc tgg gac gtc cac gag tga	1630
Lys Leu Pro Pro Leu Leu Ser Glu Ile Trp Asp Val His Glu	
450 455 460	
ggggctggcc acccagcccc acagccttgc ctgaccaccc tccagcagat agacgccggc	1690
accccttct cttcctaggg tgggaagggc cctgggcgag cctgtagacc tateggctct	1750
catcccttgg gataagcccc agtcacggtc caggaggctc cctccctgcc cagcgagtct	1810
tccagaaggg gtgaaaggg tgcaggctcc gaccactgac cctteccggc tgccctcct	1870
ccccagctta cacctcaagc ccagcacgca gcgtaccttg aacagagggg ggggaggacc	1930
catggctctc ccccctagc ccgggagacc aggggccttc ctcttctct gcttttattt	1990
aataaaaata aaaacagaaa	2010

<210> 6

5

<211> 461

<212> PRT

ES 2 438 739 T3

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ser Ser Pro Thr Thr Ser Ser Leu Asp Thr Pro Leu Pro Gly Asn
 1 5 10 15

Gly Pro Pro Gln Pro Gly Ala Pro Ser Ser Ser Pro Thr Val Lys Glu
 20 25 30

Glu Gly Pro Glu Pro Trp Pro Gly Gly Pro Asp Pro Asp Val Pro Gly
 35 40 45

Thr Asp Glu Ala Ser Ser Ala Cys Ser Thr Asp Trp Val Ile Pro Asp
 50 55 60

Pro Glu Glu Glu Pro Glu Arg Lys Arg Lys Lys Gly Pro Ala Pro Lys
 65 70 75 80

Met Leu Gly His Glu Leu Cys Arg Val Cys Gly Asp Lys Ala Ser Gly
 85 90 95

Phe His Tyr Asn Val Leu Ser Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg
 100 105 110

Arg Ser Val Val Arg Gly Gly Ala Arg Arg Tyr Ala Cys Arg Gly Gly
 115 120 125

Gly Thr Cys Gln Met Asp Ala Phe Met Arg Arg Lys Cys Gln Gln Cys
 130 135 140

Arg Leu Arg Lys Cys Lys Glu Ala Gly Met Arg Glu Gln Cys Val Leu
 145 150 155 160

Ser Glu Glu Gln Ile Arg Lys Lys Lys Ile Arg Lys Gln Gln Gln

ES 2 438 739 T3

<210> 7

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Cebador directo de PCR para región de unión a ligando LXR-alfa

<400> 7

10 gccatatgcg ggaggagtgt gtcctgtc 28

<210> 8

<211> 28

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso de PCR para región de unión a ligando LXR-alfa

20 <400> 8

ctggatcctt cgtgcacatc ccagatct 28

<210> 9

<211> 28

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo de PCR para región de unión a ligando LXR-beta

30

<400> 9

gccatatgag ggagcagtg ctcctttc 28

<210> 10

35 <211> 28

ES 2 438 739 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Cebador inverso de PCR para región de unión a ligando LXR-beta

<400> 10

ctggatccct cgtggacgct ccagatct 28

10 <210> 11

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Cebador directo de PCR para región de unión a ligando RXR-alfa

<400> 11

ccagatctaa gcggaagcc gtcagga 28

20

<210> 12

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Cebador inverso de PCR para región de unión a ligando RXR-alfa

<400> 12

30 ccagatctag tcattggtg cggcgct 28

<210> 13

<211> 284

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

ES 2 438 739 T3

<220>

<223> Proteína de fusión región de unión a ligando LXR-1alfa y marca His

<400> 13

Arg Glu Glu Cys Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Arg Leu Lys Lys Leu
1 5 10 15

Lys Arg Gln Glu Glu Glu Gln Ala His Ala Thr Ser Leu Pro Pro Arg
20 25 30

Arg Ser Ser Pro Pro Gln Ile Leu Pro Gln Leu Ser Pro Glu Gln Leu
35 40 45

Gly Met Ile Glu Lys Leu Val Ala Ala Gln Gln Gln Cys Asn Arg Arg
50 55 60

5

ES 2 438 739 T3

Ser Phe Ser Asp Arg Leu Arg Val Thr Pro Trp Pro Met Ala Pro Asp
65 70 75 80

Pro His Ser Arg Glu Ala Arg Gln Gln Arg Phe Ala His Phe Thr Glu
85 90 95

Leu Ala Ile Val Ser Val Gln Glu Ile Val Asp Phe Ala Lys Gln Leu
100 105 110

Pro Gly Phe Leu Gln Leu Ser Arg Glu Asp Gln Ile Ala Leu Leu Lys
115 120 125

Thr Ser Ala Ile Glu Val Met Leu Leu Glu Thr Ser Arg Arg Tyr Asn
130 135 140

Pro Gly Ser Glu Ser Ile Thr Phe Leu Lys Asp Phe Ser Tyr Asn Arg
145 150 155 160

Glu Asp Phe Ala Lys Ala Gly Leu Gln Val Glu Phe Ile Asn Pro Ile
165 170 175

Phe Glu Phe Ser Arg Ala Met Asn Glu Leu Gln Leu Asn Asp Ala Glu
180 185 190

Phe Ala Leu Leu Ile Ala Ile Ser Ile Phe Ser Ala Asp Arg Pro Asn
195 200 205

Val Gln Asp Gln Leu Gln Val Glu Arg Leu Gln His Thr Tyr Val Glu
210 215 220

Ala Leu His Ala Tyr Val Ser Ile His His Pro His Asp Arg Leu Met
225 230 235 240

Phe Pro Arg Met Leu Met Lys Leu Val Ser Leu Arg Thr Leu Ser Ser
245 250 255

Val His Ser Glu Gln Val Phe Ala Leu Arg Leu Gln Asp Lys Lys Leu
260 265 270

Pro Pro Leu Leu Ser Glu Ile Trp Asp Val His Glu
275 280

<210> 14

<211> 262

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión región de unión a ligando RXR-1alfa y FLAG

10

ES 2 438 739 T3

<400> 14

Lys Arg Glu Ala Val Gln Glu Glu Arg Gln Arg Gly Lys Asp Arg Asn
 1 5 10 15

Glu Asn Glu Val Glu Ser Thr Ser Ser Ala Asn Glu Asp Met Pro Val
 20 25 30

Glu Arg Ile Leu Glu Ala Glu Leu Ala Val Glu Pro Lys Thr Glu Thr
 35 40 45

Tyr Val Glu Ala Asn Met Gly Leu Asn Pro Ser Ser Pro Asn Asp Pro
 50 55 60

Val Thr Asn Ile Cys Gln Ala Ala Asp Lys Gln Leu Phe Thr Leu Val
 65 70 75 80

Glu Trp Ala Lys Arg Ile Pro His Phe Ser Glu Leu Pro Leu Asp Asp
 85 90 95

Gln Val Ile Leu Leu Arg Ala Gly Trp Asn Glu Leu Leu Ile Ala Ser
 100 105 110

Phe Ser His Arg Ser Ile Ala Val Lys Asp Gly Ile Leu Leu Ala Thr
 115 120 125

Gly Leu His Val His Arg Asn Ser Ala His Ser Ala Gly Val Gly Ala
 130 135 140

Ile Phe Asp Arg Val Leu Thr Glu Leu Val Ser Lys Met Arg Asp Met
 145 150 155 160

Gln Met Asp Lys Thr Glu Leu Gly Cys Leu Arg Ala Ile Val Leu Phe
 165 170 175

Asn Pro Asp Ser Lys Gly Leu Ser Asn Pro Ala Glu Val Glu Ala Leu
 180 185 190

Arg Glu Lys Val Tyr Ala Ser Leu Glu Ala Tyr Cys Lys His Lys Tyr
 195 200 205

Pro Glu Gln Pro Gly Arg Phe Ala Lys Leu Leu Leu Arg Leu Pro Ala
 210 215 220

Leu Arg Ser Ile Gly Leu Lys Cys Leu Glu His Leu Phe Phe Phe Lys
 225 230 235 240

Leu Ile Gly Asp Thr Pro Ile Asp Thr Phe Leu Met Glu Met Leu Glu
 245 250 255

Ala Pro His Gln Met Thr
 260

5

<210> 15

<211> 307

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Proteína de fusión región de unión a ligando LXR-beta y marca His

<400> 15

```

Arg Glu Gln Cys Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Arg Lys Lys Lys Ile
 1          5          10          15

Arg Lys Gln Gln Gln Gln Glu Ser Gln Ser Gln Ser Gln Ser Pro Val
          20          25          30

Gly Pro Gln Gly Ser Ser Ser Ser Ala Ser Gly Pro Gly Ala Ser Pro
          35          40          45

Gly Gly Ser Glu Ala Gly Ser Gln Gly Ser Gly Glu Gly Glu Gly Val
 50          55          60

Gln Leu Thr Ala Ala Gln Glu Leu Met Ile Gln Gln Leu Val Ala Ala
65          70          75          80

Gln Leu Gln Cys Asn Lys Arg Ser Phe Ser Asp Gln Pro Lys Val Thr
          85          90          95

Pro Trp Pro Leu Gly Ala Asp Pro Gln Ser Arg Asp Ala Arg Gln Gln

```

ES 2 438 739 T3

```

                100                105                110
Arg Phe Ala His Phe Thr Glu Leu Ala Ile Ile Ser Val Gln Glu Ile
   115                120                125
Val Asp Phe Ala Lys Gln Val Pro Gly Phe Leu Gln Leu Gly Arg Glu
   130                135                140
Asp Gln Ile Ala Leu Leu Lys Ala Ser Thr Ile Glu Ile Met Leu Leu
   145                150                155                160
Glu Thr Ala Arg Arg Tyr Asn His Glu Thr Glu Cys Ile Thr Phe Leu
   165                170                175
Lys Asp Phe Thr Tyr Ser Lys Asp Asp Phe His Arg Ala Gly Leu Gln
   180                185                190
Val Glu Phe Ile Asn Pro Ile Phe Glu Phe Ser Arg Ala Met Arg Arg
   195                200                205
Leu Gly Leu Asp Asp Ala Glu Tyr Ala Leu Leu Ile Ala Ile Asn Ile
   210                215                220
Phe Ser Ala Asp Arg Pro Asn Val Gln Glu Pro Gly Arg Val Glu Ala
   225                230                235                240
Leu Gln Gln Pro Tyr Val Glu Ala Leu Leu Ser Tyr Thr Arg Ile Lys
   245                250                255
Arg Pro Gln Asp Gln Leu Arg Phe Pro Arg Met Leu Met Lys Leu Val
   260                265                270
Ser Leu Arg Thr Leu Ser Ser Val His Ser Glu Gln Val Phe Ala Leu
   275                280                285
Arg Leu Gln Asp Lys Lys Leu Pro Pro Leu Leu Ser Glu Ile Trp Asp
   290                295                300
Val His Glu
   305

```

<210> 16

<211> 25

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

ES 2 438 739 T3

Asp Gly Thr Pro Pro Pro Gln Glu Ala Glu Glu Pro Ser Leu Leu Lys
 1 5 10 15

Lys Leu Leu Leu Ala Pro Ala Asn Thr
 20 25

<210> 17

<211> 25

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

His Gly Thr Ser Leu Lys Glu Lys His Lys Ile Leu His Arg Leu Leu
 1 5 10 15

Gln Asp Ser Ser Ser Pro Val Asp Leu
 20 25

10

<210> 18

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 18

Asn Lys Asp Val Thr Leu Thr Ser Pro Leu Leu Val Asn Leu Leu Gln
 1 5 10 15

Ser Asp Ile Ser Ala Gly His Phe Gly Val Asn Asn Lys Gln
 20 25 30

<210> 19

20

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Ser Pro Ala Met Arg Glu Ala Pro Thr Ser Leu Ser Gln Leu Leu Asp
 1 5 10 15

Asn Ser Gly Ala Pro Asn Val Thr Ile Lys Pro Pro Gly Leu
 20 25 30

25

ES 2 438 739 T3

<210> 20

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 20

Cys Pro Ser Ser His Ser Ser Leu Thr Glu Arg His Lys Ile Leu His
1 5 10 15

Arg Leu Leu Gln Glu Gly Ser Pro Ser
20 25

<210> 21

10

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Lys Glu Ser Lys Asp His Gln Leu Leu Arg Tyr Leu Leu Asp Lys Asp
1 5 10 15

15

Glu Lys Asp Leu
20

<210> 22

<211> 24

<212> PRT

20

<213> Homo sapiens

<400> 22

Gln Lys Pro Thr Ser Gly Pro Gln Thr Pro Gln Ala Gln Gln Lys Ser
1 5 10 15

Leu Leu Gln Gln Leu Leu Thr Glu
20

25

<210> 23

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 438 739 T3

<400> 23

Cys Cys Phe Cys Gly Glu Asp His Pro Arg Gln Gly Ser Ile Leu Tyr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Thr Ser Ser Lys Gln Thr
 20 25

5 <210> 24

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 24

Lys Asn Pro Thr Ser Cys Ser Arg Arg Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu
 1 5 10 15

Leu Asp Ser Val Gln Pro Ile Ala Arg
 20 25

<210> 25

<211> 25

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Lys Gln Glu Pro Val Ser Pro Lys Lys Lys Glu Asn Ala Leu Leu Arg
 1 5 10 15

Tyr Leu Leu Asp Lys Asp Asp Thr Lys
 20 25

20 <210> 26

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 26

Gly His Gly Glu Asp Phe Ser Lys Val Ser Gln Asn Pro Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Gln Ile Thr Gly Asn Gly
 20 25

ES 2 438 739 T3

<210> 27

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 27

His Ser Lys Ala Ser Trp Ala Glu Phe Ser Ile Leu Arg Glu Leu Leu

1

5

10

15

Ala Gln Asp Val Leu Cys Asp
20

10

<210> 28

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 28

Ser Pro Lys Lys Lys Glu Asn Asn Ala Leu Leu Arg Tyr Leu Leu Asp
1 5 10 15

Arg Asp Asp Pro Ser Asp Ala Leu Ser Lys
20 25

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de identificación de un agente terapéutico o preventivo que afecta a la concentración de colesterol LDL y/o de triglicéridos en plasma en un mamífero, comprendiendo el procedimiento:

(i) proporcionar un heterodímero que comprende LXR α y RXR α ;

5 (ii) poner en contacto una sustancia de prueba con el heterodímero en presencia de un coactivador de LXR;

(iii) medir la cantidad de coactivador unido al heterodímero;

(iv) comparar la cantidad de coactivador medida en la etapa (iii) con la cantidad de coactivador unido al heterodímero en un control;

10 (v) correlacionar la diferencia entre la cantidad de coactivador unido en presencia de la sustancia de prueba y la cantidad de coactivador unido en el control, en el que un aumento en la cantidad de coactivador unido en presencia de la sustancia de prueba en comparación con el control es indicativo de que la sustancia de prueba tiene el efecto de aumentar la concentración de colesterol LDL y/o de triglicéridos en plasma en un mamífero.

15 2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el procedimiento es para identificar un agente terapéutico o preventivo que no produce un aumento en la concentración de colesterol LDL y/o de triglicéridos en plasma en un mamífero.

3. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la sustancia de prueba es un ligando LXR.

20 4. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el agente terapéutico o preventivo es para tratar o prevenir una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en arteriosclerosis, aterosclerosis, hiperlipidemia, enfermedades relacionadas con los lípidos, enfermedad inflamatoria mediada por citocinas inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedad cardiovascular, enfermedad cerebrovascular, enfermedad renal, diabetes mellitus, complicaciones diabéticas, obesidad, nefritis, hepatitis y enfermedad de Alzheimer.

25 5. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el coactivador está seleccionado del grupo que consiste en PGC-1 α (receptor activado por proliferador de peroxisomas de Homo sapiens, coactivador gamma 1, alfa), TIF-2 (coactivador 2 de receptor nuclear de Homo sapiens), ASC-2 (cointegrador 2 de señal activante), SRC-1 (coactivador 1 de receptor esteroide humano), DAX1 (región crítica de hipoplasia suprarrenal congénita (AHC) de inversión de sexo sensible a la dosificación sobre el cromosoma X, gen 1), PNRC (proteína correguladora de receptor nuclear rico en prolina), TRAP220 (proteína 220 asociada a receptor de la hormona tiroidea), PERC (coactivador 1 gamma de receptor activado por proliferador de peroxisomas beta) y ACTR (coactivador 3 de receptor esteroideo).

30 6. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el coactivador es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N $^{\circ}$ 16, SEC ID N $^{\circ}$ 17, SEC ID N $^{\circ}$ 18, SEC ID N $^{\circ}$ 19, SEC ID N $^{\circ}$ 20, SEC ID N $^{\circ}$ 21, SEC ID N $^{\circ}$ 22, SEC ID N $^{\circ}$ 23, SEC ID N $^{\circ}$ 24, SEC ID N $^{\circ}$ 25, SEC ID N $^{\circ}$ 26, SEC ID N $^{\circ}$ 27, SEC ID N $^{\circ}$ 28 y variantes de las mismas.

35 7. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el LXR α es un polipéptido LXR α de longitud completa humano que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N $^{\circ}$ 2 o una variante de la misma que tiene al menos el 80% de identidad con SEC ID N $^{\circ}$ 2, o una proteína fusionada que contiene dicho polipéptido.

8. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el LXR α es un sitio de unión a ligando de LXR α de longitud completa humano que tiene una secuencia de aminoácidos del aminoácido n $^{\circ}$ 164 a 447 de SEC ID N $^{\circ}$ 2 o una variante de la misma que tiene al menos el 80% de identidad con el aminoácido n $^{\circ}$ 164 a 447 de SEC ID N $^{\circ}$ 2, o una proteína fusionada que contiene dicho polipéptido.

40 9. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el RXR α es un polipéptido RXR α de longitud completa humano que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N $^{\circ}$ 4 o una variante de la misma que tiene al menos el 80% de identidad con SEC ID N $^{\circ}$ 4, o una proteína fusionada que contiene dicho polipéptido.

45 10. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el RXR α es un sitio de unión a ligando de RXR α de longitud completa humano que tiene una secuencia de aminoácidos del aminoácido n $^{\circ}$ 201 a 462 de SEC ID N $^{\circ}$ 4 o una variante de la misma que tiene al menos el 80% de identidad de aminoácido n $^{\circ}$ 201 a 462 de SEC ID N $^{\circ}$ 4, o una proteína fusionada que contiene dicho polipéptido.

11. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la cantidad de coactivador unido al heterodímero se mide usando un ensayo de FRET.

12. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el LXR α y/o el RXR α se proporciona usando células que

expresan LXR α y/o RXR α .

13. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el LXR α y/o el RXR α se proporciona usando células que expresan LXR α y/o RXR α como proteína exógena.

5 14. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el LXR α y/o el RXR α se proporciona usando células que expresan LXR α y/o RXR α como proteína endógena.

15. Un kit que se usa para una cualquiera de reivindicaciones 1 a 14, comprendiendo el kit:

un primer polipéptido que comprende un sitio de unión a ligando de un polipéptido LXR α humano que comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido nº 164 a 447 de SEC ID Nº 2 o una variante de la misma que tiene al menos el 80% de identidad con el aminoácido nº 164 a 447 de SEC ID Nº 2; un segundo polipéptido que comprende un sitio de unión a ligando de un polipéptido RXR α de longitud completa humano que comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido nº 201 a 462 de SEC ID Nº 4 o una variante de la misma que tiene al menos el 80% de identidad con el aminoácido nº 201 a 462 de SEC ID Nº 4; y un coactivador seleccionado del grupo que consiste en PGC-1 α (receptor activado por proliferador de peroxisomas de Homo sapiens, coactivador gamma 1, alfa), TIF-2 (coactivador 2 de receptor nuclear de Homo sapiens), ASC-2 (cointegrador 2 de señal activante), SRC-1 (coactivador 1 de receptor esteroide humano), DAX1 (región crítica de hipoplasia suprarrenal congénita (AHC) de inversión de sexo sensible a la dosificación sobre el cromosoma X, gen 1), PNRC (proteína correguladora de receptor nuclear rico en prolina), TRAP220 (proteína 220 asociada a receptor de la hormona tiroidea), PERC (coactivador 1 gamma de receptor activado por proliferador de peroxisomas beta) y ACTR (coactivador 3 de receptor esteroideo).

20 16. Un kit según la reivindicación 15 en el que el primer polipéptido comprende un polipéptido LXR α de longitud completa humano que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 2 o una variante de la misma que tiene al menos el 80% de identidad con SEC ID Nº 2; y el segundo polipéptido comprende un polipéptido RXR α de longitud completa humano que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 4 o una variante de la misma que tiene al menos el 80% de identidad con SEC ID Nº 4, en el que el polipéptido LXR α de longitud completa humano comprende el sitio de unión a ligando del polipéptido LXR α humano y el polipéptido RXR α de longitud completa humano comprende el sitio de unión a ligando del polipéptido RXR α humano.

17. Un kit según la reivindicación 15, en el que el primer y segundo polipéptidos forman juntos un polipéptido fusionado.

30 18. Un kit que comprende primer y segundo polinucleótidos que codifican el primer y segundo polipéptidos como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, respectivamente; y un coactivador seleccionado del grupo que consiste en PGC-1 α (receptor activado por proliferador de peroxisomas de Homo sapiens, coactivador gamma 1, alfa), TIF-2 (coactivador 2 de receptor nuclear de Homo sapiens), ASC-2 (cointegrador 2 de señal activante), SRC-1 (coactivador 1 de receptor esteroide humano), DAX1 (región crítica de hipoplasia suprarrenal congénita (AHC) de inversión de sexo sensible a la dosificación sobre el cromosoma X, gen 1), PNRC (proteína correguladora de receptor nuclear rico en prolina), TRAP220 (proteína 220 asociada a receptor de la hormona tiroidea), PERC (coactivador 1 gamma de receptor activado por proliferador de peroxisomas beta) y ACTR (coactivador 3 de receptor esteroideo).

35 19. Un kit según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en el que el coactivador es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº 16, SEC ID Nº 17, SEC ID Nº 18, SEC ID Nº 19, SEC ID Nº 20, SEC ID Nº 21, SEC ID Nº 22, SEC ID Nº 23, SEC ID Nº 24, SEC ID Nº 25, SEC ID Nº 26, SEC ID Nº 27, SEC ID Nº 28 y variantes de las mismas.

40 20. Un kit que comprende un vector recombinante que contiene el primer y segundo polinucleótidos como se define en la reivindicación 18 y un coactivador seleccionado del grupo que consiste en PGC-1 α (receptor activado por proliferador de peroxisomas de Homo sapiens, coactivador gamma 1, alfa), TIF-2 (coactivador 2 de receptor nuclear de Homo sapiens), ASC-2 (cointegrador 2 de señal activante), SRC-1 (coactivador 1 de receptor esteroide humano), DAX1 (región crítica de hipoplasia suprarrenal congénita (AHC) de inversión de sexo sensible a la dosificación sobre el cromosoma X, gen 1), PNRC (proteína correguladora de receptor nuclear rico en prolina), TRAP220 (proteína 220 asociada a receptor de la hormona tiroidea), PERC (coactivador 1 gamma de receptor activado por proliferador de peroxisomas beta) y ACTR (coactivador 3 de receptor esteroideo).

21. Un kit según la reivindicación 20, en el que el vector recombinante es un vector de expresión.

50 22. Un kit que comprende células huésped transformadas con un vector recombinante como se define en la reivindicación 20 ó 21, y un coactivador seleccionado del grupo que consiste en PGC-1 α (receptor activado por proliferador de peroxisomas de Homo sapiens, coactivador gamma 1, alfa), TIF-2 (coactivador 2 de receptor nuclear de Homo sapiens), ASC-2 (cointegrador 2 de señal activante), SRC-1 (coactivador 1 de receptor esteroide humano), DAX1 (región crítica de hipoplasia suprarrenal congénita (AHC) de inversión de sexo sensible a la dosificación sobre el cromosoma X, gen 1), PNRC (proteína correguladora de receptor nuclear rico en prolina), TRAP220 (proteína 220

asociada a receptor de la hormona tiroidea), PERC (coactivador 1 gamma de receptor activado por proliferador de peroxisomas beta) y ACTR (coactivador 3 de receptor esteroideo).

23. Un kit según la reivindicación 22, en el que las células huésped son células de mamífero.

5 24. Un procedimiento de detección de un aumento en el nivel de concentración de colesterol LDL y/o de triglicéridos en plasma en un mamífero que comprende:

(i) poner en contacto una muestra biológica recogida de un mamífero con un heterodímero que comprende LXR α y RXR α en presencia de un coactivador de LXR;

(ii) repetir dicha etapa de puesta en contacto (i) con una muestra de control;

(iii) medir la cantidad de coactivador unido al heterodímero;

10 (iv) comparar la cantidad de coactivador unido al heterodímero en la muestra biológica recogida del mamífero y el coactivador unido al heterodímero en la muestra de control; y

(v) determinar que el mamífero tiene un elevado nivel de concentración de colesterol LDL y/o de triglicéridos en plasma cuando la cantidad de coactivador unido al heterodímero en la muestra biológica es mayor que la cantidad de coactivador unido al heterodímero en el control.

15 25. Un procedimiento de diagnóstico de un estado de enfermedad en un mamífero que comprende:

(i) poner en contacto una muestra biológica recogida de un mamífero con un heterodímero que comprende LXR α y RXR α en presencia de un coactivador de LXR;

(ii) repetir dicha etapa de puesta en contacto (i) con una muestra de control;

(iii) medir la cantidad de coactivador unido al heterodímero;

20 (iv) comparar la cantidad de coactivador unido al heterodímero en la muestra biológica recogida del mamífero y el coactivador unido al heterodímero en la muestra de control; y

(v) determinar que el mamífero está en un estado de enfermedad cuando la cantidad de coactivador unido al heterodímero en la muestra biológica es mayor que la cantidad de coactivador unido al heterodímero en el control, que es indicativo de un aumento en el nivel de concentración de colesterol LDL y/o de triglicéridos en plasma en el mamífero, en el que el estado de enfermedad está seleccionado del grupo que consiste en (a) arteriosclerosis, (b) aterosclerosis, (c) hiperlipidemia, (d) una enfermedad relacionada con los lípidos, (e) una enfermedad inflamatoria mediada por una citocina inflamatoria, (f) una enfermedad autoinmunitaria, (g) una enfermedad cardiovascular, (h) una enfermedad cerebrovascular, (i) una enfermedad renal, (j) diabetes mellitus, (k) una complicación diabética, (l) obesidad, (m) nefritis, (n) hepatitis (o) un tumor, (p) enfermedad de Alzheimer y (q) arteriosclerosis producida por una o más de las enfermedades (c) a (o).

30

26. El procedimiento según la reivindicación 24 ó 25, en el que el mamífero es un ser humano.

27. El procedimiento según la reivindicación 26, en el que la muestra biológica es una muestra de sangre.

28. El procedimiento según la reivindicación 27, en el que el coactivador es un coactivador de LXR.

35 29. El procedimiento según la reivindicación 28, en el que el coactivador está seleccionado del grupo que consiste en PGC-1 α (receptor activado por proliferador de peroxisomas de Homo sapiens, coactivador gamma 1, alfa), TIF-2 (coactivador 2 de receptor nuclear de Homo sapiens), ASC-2 (cointegrador 2 de señal activante), SRC-1 (coactivador 1 de receptor esteroide humano), DAX1 (región crítica de hipoplasia suprarrenal congénita (AHC) de inversión de sexo sensible a la dosificación sobre el cromosoma X, gen 1), PNRC (proteína correguladora de receptor nuclear rico en prolina), TRAP220 (coactivador 1 gamma de receptor asociado a receptor de la hormona tiroidea beta) y ACTR (coactivador 3 de receptor esteroideo).

40