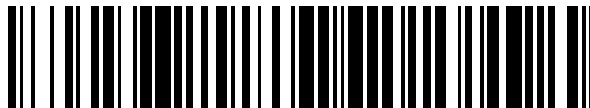


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 779**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/03** (2006.01)

**A61K 38/08** (2006.01)

**A61K 38/10** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**C07K 14/775** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2001 E 10002402 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013 EP 2198877**

54 Título: **Péptidos administrados oralmente para mejorar aterosclerosis**

30 Prioridad:

**24.08.2000 US 645454**

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

**20.01.2014**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (50.0%)**

**1111 Franklin Street, 12th Floor**

**Oakland, CA 94607-5200, US y**

**THE UAB RESEARCH FOUNDATION (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FOGELMAN, ALAN M.;**

**ANANTHARAMAIAH, GATTADAHALLI M. y**

**NAVAB, MOHAMMAD**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 438 779 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**

Péptidos administrados oralmente para mejorar aterosclerosis

**Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

5 La presente solicitud es una continuación en parte del documento USSN 09/896,841, presentado el 29 de junio, 2001, que es una continuación en parte del documento USSN 09/645,454, presentado el 24 de agosto, 2000, los cuales se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad a todos los efectos.

**Declaración de derechos a invenciones realizadas con fondos federales**

10 Este trabajo fue financiado con subvenciones del Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos y las HL30568 y HL34343 del Instituto Nacional del Corazón, Pulmones y Sangre. El Gobierno de los Estados Unidos de América puede tener ciertos derechos en esta invención.

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la aterosclerosis. En particular, la presente invención se refiere a la identificación de una clase de péptidos que son oralmente administrables y que mejoran uno o más síntomas de la aterosclerosis.

**15 Antecedentes de la invención**

La enfermedad cardiovascular es una causa principal de morbilidad y mortalidad, particularmente en los Estados Unidos y en los países de Europa occidental. Están implicados varios factores causantes en el desarrollo de enfermedad cardiovascular, incluyendo la predisposición hereditaria a la enfermedad, género, factores de estilo de vida tales como fumar y dieta, edad, hipertensión e hiperlipidemia, incluyendo hipercolesterolemia. Varios de estos factores, particularmente hiperlipidemia e hipercolesterolemia (concentraciones de colesterol en sangre altas) proporcionan un factor de riesgo significativo asociado con aterosclerosis.

20 El colesterol está presente en la sangre como colesterol libre y esterificado en partículas de lipoproteínas, conocidas comúnmente como quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). La concentración de colesterol total en la sangre está influenciada por (1) absorción de colesterol del tracto digestivo, (2) síntesis de colesterol a partir de constituyentes dietéticos tales como carbohidratos, proteínas, grasas y etanol y (3) eliminación del colesterol de sangre por tejidos, especialmente el hígado y conversión subsiguiente del colesterol a ácidos biliares, hormonas esteroideas y colesterol biliar.

25 El mantenimiento de las concentraciones de colesterol en sangre está influenciado también tanto por factores genéticos como por factores ambientales. Los factores genéticos incluyen concentración de enzimas limitadoras de la velocidad en biosíntesis de colesterol, concentración de receptores para lipoproteínas de baja densidad en el hígado, concentración de enzimas que limitan la velocidad para conversión de ácidos biliares de colesterol, velocidades de síntesis y secreción de lipoproteínas y género de la persona. Los factores ambientales que influyen en la homeostasis de concentración de colesterol en sangre en seres humanos incluyen composición de la dieta, incidencia de fumar, actividad física y uso de una diversidad de agentes farmacéuticos. Las variables de la dieta incluyen cantidad y tipo de grasa (ácidos grasos saturados y poliinsaturados), cantidad de colesterol, cantidad y tipo de fibra y quizás cantidades de vitaminas tales como vitamina C y D y minerales tales como calcio.

30 Los estudios epidemiológicos muestran una correlación inversa de niveles de lipoproteína de alta densidad (HDL) y apolipoproteína (apo) A-I con la aparición de niveles ateroscleróticos (Wilson y col. (1998) Arteriosclerosis 8: 737-741). La inyección de HDL en conejos alimentados con una dieta aterogénica ha mostrado inhibir formación de lesiones ateroscleróticas (Badimon y col. (1990) J. Clin. Invest. 85: 1234-1241).

35 La apo A-I humana ha sido un sujeto de estudio intenso debido a sus propiedades antiaterogénicas. Las alipoproteínas intercambiables, incluyendo apo A-I, poseen dominios de asociación a lípidos (Brouillette y Anantharamaiah (1995) Biochim. Biophys. Acta 1256: 103-129; Segrest y col. (1990) FEBS Lett. 38: 247-253). Se ha postulado que apo A-I posee ocho secuencias 22meras que se repiten en tándem, la mayoría de las cuales tienen el potencial de formar estructuras helicoidales anfipáticas de clase A (Segrest y col. (1974) FEBS Lett. 38: 247-253). Las características de la hélice anfipática de clase A incluyen la presencia de residuos cargados positivamente en la interfase polar-no polar y residuos cargados negativamente en el centro de la fase polar (Segrest y col. (1974) FEBS Lett. 38: 247-253; Segrest y col. (1974) Proteins: Structure, Function, and Genetics 8: 103-117). Se ha mostrado que apo A-I se asocia fuertemente con fosfolípidos para formar complejos y para promover flujo de salida de colesterol de células enriquecidas en colesterol. [Insertar página 2A] El desarrollo y mantenimiento de niveles séricos de apo A-I para mitigar de forma efectiva uno o más síntomas de aterosclerosis hasta este momento ha demostrado ser difícil de alcanzar.

50 El documento WO 99/16408 proporciona péptidos y análogos peptídicos que imitan las propiedades estructurales y farmacológicas de ApoA-1 humana. Los péptidos y análogos peptídicos se dice que son útiles para tratar una

diversidad de trastornos asociados con dislipidemia. El documento US4.643.988 divulga péptidos de la fórmula A1-B1-B2-C1-D-B3-B4-A2-C2-B5-B6-A3-C3-B7-C4-A4-B8-B9 en la que A1, A2, A3 y A4 son independientemente ácido aspártico o ácido glutámico, u homólogos o análogos de los mismos; B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8 y B9 son independientemente triptófano, fenilalanina, leucina, alanina, tirosina, isoleucina, valina o alfa-naftilalanina, u homólogos o análogos de los mismos; C1, C2, C3 y C4 son independientemente lisina o arginina u homólogos o análogos de las mismas, y D es serina, treonina, alanina, glicina, o histidina, con la condición de que, cuando A1 y A2 son ácido aspártico, A3 y A4 son ácido glutámico, B2 y B7 son leucina, B3 y B9 son fenilalanina, B4 es torosina, B5 es valina y C1, C2, C3 y C4 son lisina y B6, B8 y D son alanina, B1 no es triptófano. Estos péptidos se dice que son útiles en el tratamiento y prevención de aterosclerosis.

## 10 Sumario de la invención

La presente invención proporciona péptidos novedosos la administración de los cuales mitiga uno o más síntomas de aterosclerosis. En particular, fue un descubrimiento de esta invención que los péptidos que comprenden una hélice anfipática de clase A cuando se formula con residuo(s) de aminoácido(s) "D" y/o que tienen extremos aminoterminal y carboxilo terminal protegidos se pueden administrar oralmente a un organismo, se asimilan y administran fácilmente al suero y son efectivos para mitigar uno o más síntomas de aterosclerosis.

De acuerdo con la presente invención se proporciona un péptido según se define en la reivindicación 1. Las realizaciones de la invención pueden comprender características según se definen en las reivindicaciones dependientes.

También se describen en el presente documento variantes que no caen dentro del ámbito de la invención, pero se proporcionan como un antecedente general. Así, se proporciona un péptido que mejora un síntoma de aterosclerosis, donde el péptido varía en longitud hasta aproximadamente 30 aminoácidos y la secuencia de aminoácidos del péptido comprende la secuencia de aminoácidos D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N.º: 7) y el péptido protege un fosfolípido frente a oxidación por un agente oxidante, de acuerdo con la reivindicación 1. El péptido puede comprender adicionalmente un grupo protector. El péptido puede comprender adicionalmente un grupo protector acoplado al extremo amino terminal y/o al extremo carboxilo terminal. Los grupos protectores incluyen, pero no están limitados a, acetilo, amida y grupos alquilo de 3 a 20 átomos de carbono, Fmoc, t-boc, grupo 9-fluorenoacetilo, grupo 1-fluoreno-carboxílico, grupo 9-fluoreno-carboxílico, grupo 9-fluorenona-1-carboxílico, benciloxicarbonilo, Xantilo (Xan), Tritilo (Trt), 4-metiltrilito (Mtt), 4-metoxitritilo (Mmt), 4-metoxi-2,3,6-trimetil-bencenosulfonilo (Mtr), metilsileno-2-sulfonilo (Mts), 4,4-dimetoxibencidrilo (Mbh), Tosilo (Tos), 2,2,5,7,8-pentametil-croman-6-sulfonilo (Pmc), 4-metilbencilo (MeBzl), 4-metoxibencilo (MeOBzl), Benciloxi (BzI), Bencilo (Bzl), Benzoilo (Bz), 3-nitro-2-piridinasulfenilo (Npys), 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)etilo (Dde), 2,6-diclorobencilo (2,6-DiCl-Bzl), 2-clorobenciloxicarbonilo (2-Cl-Z), 2-bromobenciloxicarbonilo (2-Br-Z), Benciloximetilo (Bom), t-butoxicarbonilo (Boc), ciclohexiloxi (cHxO), t-butoximetilo (Bum), t-butoxi (tBuO), t-butilo (tBu), Acetilo (Ac) y Trifluoroacetilo (TFA). El péptido puede comprender adicionalmente un primer grupo protector acoplado al extremo amino terminal y un segundo grupo protector acoplado al extremo carboxilo terminal. Los péptidos pueden imitar estrechamente la hélice anfipática de clase A de apo A-I de ser humano o de ratón. El péptido puede tener identidad de secuencia mayor de aproximadamente el 50 % de identidad de secuencia aminoacídica con apo A-1 de ser humano o de ratón. Los péptidos pueden comprender identidad de secuencia mayor de aproximadamente el 50 % con el polipéptido codificado por el exón que codifica una hélice anfipática de clase A de apo A-I de ser humano o de ratón. Al menos aproximadamente el 10 %, al menos el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 75 % al menos el 90 % e incluso el 100 % de los aminoácidos enantioméricos son aminoácidos "D". El péptido se puede combinar con un excipiente farmacológicamente aceptable (por ejemplo un excipiente adecuado para administración oral a un mamífero).

La secuencia ID N.º: 7 D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N.º: 7) según se define en la reivindicación 1 forma parte de la invención. En ciertas modificaciones el **péptido** puede formularse en combinación con una o más de las siguientes secuencias aminoacídicas que no forman parte de la invención reivindicada: D- W- L- K- A- F- Y- D- K- V- A- E-

K-L-K-E-A-F- (SEC ID N.º : 2), D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEC ID N.º : 3), D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F- (SEC ID N.º : 4), D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F- (SEC ID N.º : 5), D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N.º : 6), D-W-F-K-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N.º : 8), D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F- (SEC ID N.º : 9), D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F- (SEC ID N.º : 10), D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F- (SEC ID N.º : 11), D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N.º : 12), D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N.º : 13), E-W-L-K-L-F-Y-E-K-V-L-E-K-F-K-E-A-F- (SEC ID N.º : 14), E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F- (SEC ID N.º : 15), E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F- (SEC ID N.º : 16), E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F- (SEC ID N.º : 17), E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F- (SEC ID N.º : 18), E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N.º : 19), E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N.º : 20), A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEC ID N.º : 21), A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F- (SEC ID N.º : 22), A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F- (SEC ID N.º : 23), A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N.º : 24), A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N.º : 25), A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F- (SEC ID N.º : 26), A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F- (SEC ID N.º : 27), A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F- (SEC ID N.º : 28), A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F- (SEC ID N.º : 29), A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N.º : 30), K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F- (SEC ID N.º : 31), L-F-Y-E-K-V-L-E-K-F-K-E-

A-F- (SEC ID N.º : 32), A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F- (SEC ID N.º : 33), A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F- (SEC ID N.º : 34), A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F- (SEC ID N.º : 35), A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F- (SEC ID N.º : 36), A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N.º : 37), A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N.º : 38), D-W-L-K-A-L-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-L- (SEC ID N.º : 39), D-W-F-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F- (SEC ID N.º : 40), D-W-F-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N.º : 41), E-W-L-K-A-L-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-L- (SEC ID N.º : 42), E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEC ID N.º : 43), E-W-F-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F- (SEC ID N.º : 44), E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N.º : 45), E-W-L-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N.º : 46), E-W-F-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N.º : 47), D-F-L-K-A-W-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-W- (SEC ID N.º : 48), E-F-L-K-A-W-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-W- (SEC ID N.º : 49), D-F-W-K-A-W-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-W-W- (SEC ID N.º : 50), E-F-W-K-A-W-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-W-W- (SEC ID N.º : 51), D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F- (SEC ID N.º : 52), D-K-W-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L- (SEC ID N.º : 53), E-K-L-K-A-F-Y-E-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F- (SEC ID N.º : 54), E-K-W-K-A-V-Y-E-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L- (SEC ID N.º : 55), D-W-L-K-A-F-V-D-K-F-A-E-K-F-K-E-A-Y- (SEC ID N.º : 56), E-K-W-K-A-V-Y-E-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L- (SEC ID N.º : 57), D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F- (SEC ID N.º : 58), E-W-L-K-A-F-V-Y-E-K-V-F-K-L-K-E-F-F- (SEC ID N.º : 59), D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEC ID N.º : 60), E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEC ID N.º : 61), D-W-L-K-A-F-Y-D-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEC ID N.º : 62), E-W-L-K-A-F-Y-E-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEC ID N.º : 63), D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F- (SEC ID N.º : 64), E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F- (SEC ID N.º : 65), D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F- (SEC ID N.º : 66), E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F- (SEC ID N.º : 67), D-W-L-K-A-F-Y-D-R-V-A-E-R-L-K-E-A-F- (SEC ID NO: 69), D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F- (SEC ID N.º : 70), E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F- (SEC ID N.º : 71), D-W-L-R-A-F-Y-D-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEC ID N.º : 72), E-W-L-R-A-F-Y-E-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEC ID N.º : 73), D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-R-E-A-F- (SEC ID N.º : 74), E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-R-E-A-F- (SEC ID N.º : 75), D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F- (SEC ID N.º : 76), E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F- (SEC ID N.º : 77), D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- P-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F (SEC ID N.º : 78), D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F- P-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F (SEC ID N.º : 79), D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- P-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F (SEC ID N.º : 80), D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F- P-D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-L-K-E-A-F (SEC ID N.º : 81), D-K-W-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L (SEC ID N.º : 82), D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F- P-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F (SEC ID N.º : 83), D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F- P-D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F (SEC ID N.º : 84), D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-A-E-K-F-K-E-F-F- P-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-A-E-K-F-K-E-F-F (SEC ID N.º : 85)"

5 truncaciones de las secuencias anteriores, combinaciones multiméricas (por ejemplo que varían preferentemente desde dímeros a trímeros, tetrámeros, 5-meros, 8-meros o 10-meros) de las secuencias anteriores, sustituciones conservadoras de las secuencias anteriores, y/o las secuencias anteriores comprendiendo análogos aminoacídicos. El péptido se puede formular en combinación con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º : 5 que no forma parte de la invención. Los aminoácidos enantioméricos de tales secuencias pueden comprender al menos un aminoácido "D". Al menos el 50 %, al menos el 75 %, al menos el 90 % e incluso el 100 % de los aminoácidos son aminoácidos

“D” como se describen en el presente documento. Tales péptidos pueden incluir también un grupo protector (por ejemplo, amida, acetilo, propionilo y alquilo de 3 a 20 átomos de carbono, etc.) acoplado al extremo amino terminal o al extremo carboxilo terminal. El grupo protector acoplado al extremo carboxilo terminal puede ser una amida. El péptido puede comprender un grupo protector acoplado al aminoterminal y dicho grupo protector aminoterminal puede ser un grupo protector del grupo que consiste en un grupo benzoilo, un acetilo, un propionilo, un carbobenzoxi, un propilo, un butilo, un pentilo, un hexilo y un alquilo de 3 a 20 átomos de carbono. El grupo protector acoplado al extremo amino terminal puede ser un acetilo, un propionilo o un alquilo de 3 a 20 átomos de carbono. Ciertos péptidos pueden comprender tanto un grupo protector del extremo carboxilo terminal como un grupo protector del extremo amino terminal. El grupo protector del extremo amino terminal puede ser un grupo protector del grupo que consiste en un grupo benzoilo, un acetilo, un propionilo, un carbobenzoxi, un propilo, un butilo, un pentilo, un hexilo y un alquilo de 3 a 20 átomos de carbono; y el grupo protector carboxilo terminal es una amida. El grupo protector del extremo amino terminal puede ser un grupo protector seleccionado del grupo que consiste en acetilo, propionilo y un alquilo de 3 a 20 átomos de carbono; y el grupo protector carboxilo terminal puede ser una amida. Todos los aminoácidos enantioméricos pueden ser aminoácidos “D”.

El péptido es uno que protege a un fosfolípido contra oxidación por un agente oxidante. Tales agentes oxidantes se pueden seleccionar del grupo que consiste en lípidos tales como peróxido de hidrógeno, 13(S)-HPODE, 15(S)-HPETE, HPODE, HPETE, HODE y HETE. El fosfolípido puede ser un fosfolípido seleccionado del grupo que consiste en 1-palmitoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosforilcolina (PAPC), 1-estearoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosforilcolina (SAPC), 1-estearoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosforiletanolamina (SAPE). Así el péptido evita la formación de lípidos tales como 1-palmitoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosforilcolina oxidada (Ox-PAPC), 1-palmitoil-2-oxovaleroil-sn-glicero-3-fosforilcolina (POVPC), 1-palmitoil-2-glutaroil-sn-glicero-3-fosforilcolina (PGPC), 1-palmitoil-2-epoxiprostano-sn-glicero-3-fosforilcolina (PEIPC), 1-estearoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosforilcolina oxidada (Ox-SAPC), 1-estearoil-2-oxovaleroil-sn-glicero-3-fosforilcolina (SOVPC), 1-estearoil-2-glutaroil-sn-glicero-3-fosforilcolina (SGPC), 1-estearoil-2-etoxiprostano-sn-glicero-3-fosforilcolina (SEIPC), 1-estearoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosforiletanolamina oxidada (Ox-SAPE), 1-estearoil-2-oxovaleroil-sn-glicero-3-fosforiletanolamina (SOVPE), 1-estearoil-2-glutaroil-sn-glicero-3-fosforiletanolamina (SGPE) y 1-estearoil-2-epoxiisoprostano-sn-glicero-3-fosforiletanolamina (SEI PE).

Los péptidos descritos en el presente documento pueden proporcionarse en una composición, adecuada para administración oral, que mejora un síntoma de aterosclerosis. La composición puede comprender un péptido que es un péptido apo A-I humano o un fragmento del mismo que comprende una hélice anfipática de clase A, o un análogo de un péptido apo A-I humano en el que dicho péptido tiene un primer grupo protector unido a un amino terminal y un segundo grupo protector unido a un carboxilo terminal y adicionalmente en el que dicho péptido comprende una pluralidad de residuos aminoácidos D. Los grupos protectores pueden incluir los grupos protectores descritos en el presente documento. En particular, los grupo protectores pueden seleccionarse independientemente del grupo que consiste en un acetilo, amida, grupos alquilo de 3 a 20 átomos de carbono, Fmoc, t-boc, grupo 9-fluorenoacetilo, grupo 1-fluorenocarboxílico, grupo 9-fluorenocarboxílico, grupo 9-fluorenonacarboxílico, benciloxicarbonilo, Xantilo (Xan), Tritilo (Trt), 4-metiltritilo (Mtt), 4-metoxitritilo (Mmt), 4-metoxi-2,3,6-trimetil-bencenosulfonilo (Mtr), metilsileno-2-sulfonilo (Mts), 4,4'-dimetoxibencidrido (Mbh), Tosilo (Tos), 2,2,5,7,8-pentametil-croman-6-sulfonilo (Pmc), 4-metilbencilo (MeBzl), 4-metoxibencilo (MeOBzl), Benciloxi (BzIO), Bencilo (Bzl), Benzoilo (Bz), 3-nitro-2-piridinasulfenilo (Npys), 1-(4,4-dimetil-2,6-diaxociclohexilideno)etilo (Dde), 2,6-diclorobencilo (2,6-DiCl-Bzl), 2-clorobenciloxicarbonilo (2-Cl-Z), 2-bromobenciloxicarbonilo (2-Br-Z), Benciloximetilo (Bom), t-butoxicarbonilo (Boc), ciclohexiloxi (cHxO), t-butoximetilo (Bum), t-butoxi (tBuO), t-butilo (tBu), Acetilo (Ac) y Trifluoroacetilo (TFA). El primer grupo protector puede ser un acetilo. El segundo grupo protector puede ser una amida. Más de la mitad, más del 80 %, más del 90 % o incluso todos los aminoácidos enantioméricos que comprende el péptido pueden ser aminoácidos D. La composición puede comprender adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, un excipiente adecuado para administración oral o un excipiente adecuado para inyección). Tales péptidos son capaces de proteger un fosfolípido [por ejemplo, 1-palmitoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosforilcolina (PAPC), 1-estearoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosforilcolina (SAPC), 1-estearoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosforiletanolamina (SAPE)] de oxidación por un agente oxidante (por ejemplo peróxido de hidrógeno, 13(S)-HPODE, 15(S)-HPETE, HPODE, HPETE, HODE y HETE). Así el péptido evita la formación de 1-palmitoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosforilcolina oxidada (Ox-PAPC), 1-palmitoil-2-oxovaleroil-sn-glicero-3-fosforilcolina (POVPC), 1-palmitoil-2-glutaroil-sn-glicero-3-fosforilcolina (PGPC), 1-palmitoil-2-epoxiprostano-sn-glicero-3-fosforilcolina (PEIPC), 1-estearoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosforilcolina oxidada (Ox-SAPC), 1-estearoil-2-oxovaleroil-sn-glicero-3-fosforilcolina (SOVPC), 1-estearoil-2-glutaroil-sn-glicero-3-fosforilcolina (SGPC), 1-estearoil-2-etoxiprostano-sn-glicero-3-fosforilcolina (SEIPC), 1-estearoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosforiletanolamina oxidada (Ox-SAPE), 1-estearoil-2-oxovaleroil-sn-glicero-3-fosforiletanolamina (SOVPE), 1-estearoil-2-glutaroil-sn-glicero-3-fosforiletanolamina (SGPE) y 1-estearoil-2-epoxiisoprostano-sn-glicero-3-fosforiletanolamina (SEI PE).

Como se describe en el presente documento los péptidos pueden proporcionarse en procedimientos de mejorar un síntoma de aterosclerosis. Los procedimientos comprenden administrar a un organismo (por ejemplo mamífero humano o no humano) uno o más de los péptidos descritos en el presente documento. Como se describe en el presente documento, los péptidos pueden proporcionarse en un procedimiento de mejorar un síntoma de aterosclerosis en un mamífero, comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho mamífero un péptido o

5     contatémero de un péptido que varía en longitud desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 30  
 aminoácidos; comprende al menos una hélice anfipática de clase A; comprende al menos un residuo aminoácido  
 "D"; protege a un fosfolípido contra oxidación por un agente oxidante; y no es el péptido D-18A. Como se describe  
 en el presente documento, tales péptidos pueden comprender una pluralidad de aminoácidos "D" y/o estar  
 10 protegidos como se describe en el presente documento. Dicha administración puede comprender administrar dicho  
 péptido oralmente. El mamífero puede ser un mamífero diagnosticado como que tiene uno o más síntomas de  
 aterosclerosis. El organismo puede ser un mamífero diagnosticado como que está en riesgo de aterosclerosis. Dicho  
 mamífero puede ser un ser humano. Dicho mamífero puede ser un mamífero no humano. El péptido se puede  
 15 administrar oralmente al organismo y el organismo puede ser un organismo diagnosticado como que tiene o está en  
 riesgo de uno o más síntomas de aterosclerosis. Dicho péptido puede comprender adicionalmente un grupo  
 protector acoplado al extremo amino terminal o al extremo carboxilo terminal. Dicho grupo protector puede ser un  
 grupo protector del grupo que consiste en acetilo, amida, grupos alquilo de 3 a 20 átomos de carbono; Fmoc, ,  
 Fmoc, t-boc, grupo 9-fluorenoacetilo, grupo 1-fluorenocarboxílico, grupo 9-fluorenocarboxílico, grupo 9-fluorenona-  
 20 carboxílico, benciloxycarbonilo, Xantilo (Xan), Tritilo (Trt), 4-metiltrilito (Mtt), 4-metoxitritilo (Mmt), 4-metoxi-2,3,6-  
 trimetil-bencenosulfonilo (Mtr), metilsileno-2-sulfonilo (Mts), 4,4'-dimetoxibencidrilo (Mbh), Tosilo (Tos), 2,2,5,7,8-  
 pentametil-croman-6-sulfonilo (Pmc), 4-metilbencilo (MeBzl), 4-metoxibencilo (MeOBzl), Benciloxi (BzIO), Bencilo  
 (Bzl), Benzoílo (Bz), 3-nitro-2-piridinasulfenilo (Npys), 1-(4,4-dimetil-2,6-diaxociclohexilideno)etilo (Dde), 2,6-  
 25 diclorobencilo (2,6-DiCl-Bzl), 2-clorobenciloxycarbonilo (2-Cl-Z), 2-bromobenciloxycarbonilo (2-Br-Z), Benciloximetilo  
 (Bom), t-butoxicarbonilo (Boc), ciclohexiloxi (cHxO), t-butoximetilo (Bum), t-butoxi (tBuO), t-butilo (tBu), Acetilo (Ac),  
 un grupo benzoílo, un grupo carbobenzoxi, un grupo prolilo, un grupo butilo, un grupo pentilo, un grupo hexilo y  
 Trifluoroacetilo (TFA). Dicho péptido puede comprender adicionalmente un primer grupo protector acoplado al  
 extremo amino terminal y un segundo grupo protector acoplado al extremo carboxilo terminal. Dicho péptido puede  
 tener más de aproximadamente el 50 % de identidad de secuencia aminoacídica con apo A-1 de ser humano o de  
 30 ratón. El péptido puede proporcionarse como un péptido aislado o puede combinarse con un excipiente  
 farmacológico como se describe en el presente documento. El péptido puede mezclarse con un excipiente  
 farmacológico adecuado para administración oral a un mamífero. La administración puede ser una dosificación  
 suficiente para mejorar uno o más síntomas de aterosclerosis y/o para reducir significativamente la probabilidad de  
 aparición de uno o más síntomas de aterosclerosis. El péptido según se define en la reivindicación 1 comprende  
 secuencia de aminoácidos ID N.º: 7 D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N.º: 7). En ciertas  
 35 modificaciones, que no forman parte de la invención reivindicada, el péptido se puede usar en combinación con una  
 secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en D- W- L- K- A- F- Y- D- K- V- A- E-

K- L- K- E- A- F- ( SEC ID N.º : 2), D- W- F- K- A- F- Y- D- K- V- A- E- K- L- K- E- A- F- ( SEC ID N.º : 3), D- W- L- K- A-  
 F- Y- D- K- V- A- E- K- F- K- E- A- F- ( SEC ID N.º : 4), D- W- F- K- A- F- Y- D- K- V- A- E- K- F- K- E- A- F- ( SEC ID N.º :  
 5), D- W- L- K- A- F- Y- D- K- V- F- E- K- F- K- E- F- F- ( SEC ID N.º : 6), D- W- F- K- A- F- Y- D- K- F- F- E- K- F- K- E-  
 F- F- ( SEC ID N.º : 8), D- W- L- K- A- F- Y- D- K- V- A- E- K- L- K- E- F- F- ( SEC ID N.º : 9), D- W- L- K- A- F- Y- D- K-  
 V- F- E- K- F- K- E- A- F- ( SEC ID N.º : 10), D- W- L- K- A- F- Y- D- K- V- F- E- K- L- K- E- F- F- ( SEC ID N.º : 11), D-  
 W- L- K- A- F- Y- D- K- V- A- E- K- F- K- E- F- F- ( SEC ID N.º : 12), D- W- L- K- A- F- Y- D- K- V- F- E- K- F- K- E- F- F-  
 ( SEC ID N.º : 13), E- W- L- K- L- F- Y- E- K- V- L- E- K- F- K- E- A- F- ( SEC ID N.º : 14), E- W- L- K- A- F- Y- D- K- V-  
 A- E- K- F- K- E- A- F- ( SEC ID N.º : 15), E- W- L- K- A- F- Y- D- K- V- A- E- K- L- K- E- F- F- ( SEC ID N.º : 16), E- W-  
 L- K- A- F- Y- D- K- V- F- E- K- F- K- E- A- F- ( SEC ID N.º : 17), E- W- L- K- A- F- Y- D- K- V- F- E- K- L- K- E- F- F-  
 ( SEC ID N.º : 18), E- W- L- K- A- F- Y- D- K- V- A- E- K- F- K- E- F- F- ( SEC ID N.º : 19), E- W- L- K- A- F- Y- D- K- V-  
 F- E- K- F- K- E- F- F- ( SEC ID N.º : 20), A- F- Y- D- K- V- A- E- K- L- K- E- A- F- ( SEC ID N.º : 21), A- F- Y- D- K- V- A-  
 E- K- F- K- E- A- F- ( SEC ID N.º : 22), A- F- Y- D- K- V- A- E- K- F- K- E- A- F- ( SEC ID N.º : 23), A- F- Y- D- K- F- F- E-  
 K- F- K- E- F- F- ( SEC ID N.º : 24), A- F- Y- D- K- F- F- E- K- F- K- E- F- F- ( SEC ID N.º : 25), A- F- Y- D- K- V- A- E- K-  
 F- K- E- A- F- ( SEC ID N.º : 26), A- F- Y- D- K- V- A- E- K- L- K- E- F- F- ( SEC ID N.º : 27), A- F- Y- D- K- V- F- E- K- F-  
 K- E- A- F- ( SEC ID N.º : 28), A- F- Y- D- K- V- F- E- K- L- K- E- F- F- ( SEC ID N.º : 29), A- F- Y- D- K- V- A- E- K- F- K-  
 E- F- F- ( SEC ID N.º : 30), K- A- F- Y- D- K- V- F- E- K- F- K- E- F- ( SEC ID N.º : 31), L- F- Y- E- K- V- L- E- K- F- K- E-

A-F- (SEC ID N° : 32), A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F- (SEC ID N° : 33), A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F- (SEC ID N° : 34), A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F- (SEC ID N° : 35), A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F- (SEC ID N° : 36), A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N° : 37), A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N° : 38), D-W-L-K-A-L-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-L- (SEC ID N° : 39), D-W-F-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F- (SEC ID N° : 40), D-W-F-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N° : 41), E-W-L-K-A-L-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-L- (SEC ID N° : 42), E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEC ID N° : 43), E-W-F-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F- (SEC ID N° : 44), E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N° : 45), E-W-L-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N° : 46), E-W-F-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N° : 47), D-F-L-K-A-W-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-W- (SEC ID N° : 48), E-F-L-K-A-W-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-W- (SEC ID N° : 49), D-F-W-K-A-W-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-W-W- (SEC ID N° : 50), E-F-W-K-A-W-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-W-W- (SEC ID N° : 51), D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F- (SEC ID N° : 52), D-K-W-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L- (SEC ID N° : 53), E-K-L-K-A-F-Y-E-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F- (SEC ID N° : 54), E-K-W-K-A-V-Y-E-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L- (SEC ID N° : 55), D-W-L-K-A-F-V-D-K-F-A-E-K-F-K-E-A-Y- (SEC ID N° : 56), E-K-W-K-A-V-Y-E-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L- (SEC ID N° : 57), D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F- (SEC ID N° : 58), E-W-L-K-A-F-V-Y-E-K-V-F-K-L-K-E-F-F- (SEC ID N° : 59), D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEC ID N° : 60), E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEC ID N° : 61), D-W-L-K-A-F-Y-D-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEC ID N° : 62), E-W-L-K-A-F-Y-E-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEC ID N° : 63), D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F- (SEC ID N° : 64), E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F- (SEC ID N° : 65), D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F- (SEC ID N° : 66), E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F- (SEC ID N° : 67), D-W-L-K-A-F-Y-D-R-V-A-E-R-L-K-E-A-F- (SEC ID N° : 68), E-W-L-K-A-F-Y-E-R-V-A-E-R-L-K-E-A-F- (SEC ID N° : 69), D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F- (SEC ID N° : 70), E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F- (SEC ID N° : 71), D-W-L-R-A-F-Y-D-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEC ID N° : 72), E-W-L-R-A-F-Y-E-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEC ID N° : 73), D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-R-E-A-F- (SEC ID N° : 74), E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-R-E-A-F- (SEC ID N° : 75), D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F- (SEC ID N° : 76), E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F- (SEC ID N° : 77), D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-P-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F (SEC ID N° : 78), D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-P-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F (SEC ID N° : 79), D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-P-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F (SEC ID N° : 80), D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F-P-D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-L-K-E-A-F (SEC ID N° : 81), D-K-W-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L (SEC ID N° : 82), D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-P-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F (SEC ID N° : 83), D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F-P-D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F (SEC ID N° : 84), D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-A-E-K-F-K-E-F-F-P-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-A-E-K-F-K-E-F-F (SEC ID N° : 85).

5 Como se describe en el presente documento todos los aminoácidos enantioméricos que comprenden el péptido son aminoácidos D. Dicho péptido puede comprender adicionalmente un grupo protector acoplado al extremo amino terminal o al extremo carboxilo terminal. Dicho grupo protector puede ser un grupo protector del grupo que consiste en acetilo,  $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-}$  donde n varía desde 1 hasta 20 y una amida. Dicho péptido puede comprender adicionalmente un primer grupo protector acoplado al extremo amino terminal y un segundo grupo protector acoplado al extremo carboxilo terminal.

10 Dicho agente oxidante puede ser del grupo que consiste en peróxido de hidrógeno, 13(S)-HPODE, 15(S)-HPETE, HPODE, HPETE, HODE y HETE. Dicho fosfolípido puede ser del grupo que consiste en 1-palmitoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosforilcolina (PAPC), 1-estearoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosforilcolina (SAPC), 1-estearoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosforiletanolamina (SAPE).

15 Como se describe en el presente documento los péptidos se pueden proporcionar en un procedimiento de mejorar un síntoma de aterosclerosis, comprendiendo dicho procedimiento administrar oralmente a un organismo una composición que comprende un péptido que es un péptido apo A-I humano o un análogo de un péptido apo A-I humano en el que dicho péptido tiene un primer grupo protector unido a un amino terminal y un segundo grupo protector unido a un carboxilo terminal y adicionalmente en el que dicho péptido comprende una pluralidad de residuos de aminoácidos D. Dicho organismo puede ser un organismo diagnosticado como que tiene uno o más síntomas de aterosclerosis. Dicho organismo puede ser un organismo diagnosticado en riesgo de aterosclerosis. Dicho organismo puede ser un ser humano. Dicho organismo puede ser un mamífero no humano. Dicho primer grupo protector y dicho segundo grupo protector pueden seleccionarse independientemente del grupo que consiste en un acetilo, un  $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-}$  donde n varía desde 3 hasta 20 y una amida. Dicho primer grupo protector puede ser un acetilo. Dicho segundo grupo protector puede ser una amida. Dicha composición puede comprender adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicho excipiente puede ser un excipiente adecuado para administración oral. Dicho péptido protege un fosfolípido de oxidación por un agente oxidante. Dicho agente oxidante puede ser del grupo que consiste en peróxido de hidrógeno, 13(S)-HPODE, 15(S)-HPETE, HPODE,

20

25

HPETE, HODE y HETE. Dicho fosfolípido puede ser del grupo que consiste en 1-palmitoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosforilcolina (PAPC), 1-estearoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosforilcolina (SAPC), 1-estearoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosforiletanolamina (SAPE).

- 5 Como se describe en el presente documento se pueden proporcionar péptidos en un kit para mejorar un síntoma de aterosclerosis. Los kits pueden incluir un recipiente que contiene uno o más de los péptidos descritos en el presente documento. Los péptidos como se describen en el presente documento pueden proporcionarse en un kit para mejorar un síntoma de aterosclerosis, comprendiendo dicho kit un recipiente que contiene un péptido que varía en longitud desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 30 aminoácidos; comprende al menos una hélice anfipática de clase A; comprende al menos un residuo de aminoácido D; protege a un fosfolípido frente a coxidación por un agente oxidante y no es el péptido 18-A. El péptido según se defina en la reivindicación 1 comprende una
- 10 secuencia de aminoácidos ID N.º: 7 D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N.º: 7). En ciertas modificaciones, que no forman parte de la invención reivindicada, el péptido se puede usar en combinación con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en D- W- L- K- A- F- Y- D- K- V- A- E-

K- L- K- E- A- F- ( SEC ID N.º : 2), D- W- F- K- A- F- Y- D- K- V- A- E- K- L- K- E- A- F- ( SEC ID N.º : 3), D- W- L- K- A- F- Y- D- K- V- A- E- K- F- K- E- A- F- ( SEC ID N.º : 4), D- W- F- K- A- F- Y- D- K- V- A- E- K- F- K- E- A- F- ( SEC ID N.º : 5), D- W- L- K- A- F- Y- D- K- V- F- E- K- F- K- E- F- F- ( SEC ID N.º : 6), D- W- F- K- A- F- Y- D- K- F- F- E- K- F- K- E- F- F- ( SEC ID N.º : 8), D- W- L- K- A- F- Y- D- K- V- A- E- K- L- K- E- F- F- ( SEC ID N.º : 9), D- W- L- K- A- F- Y- D- K- V- F- E- K- F- K- E- A- F- ( SEC ID N.º : 10), D- W- L- K- A- F- Y- D- K- V- F- E- K- L- K- E- F- F- ( SEC ID N.º : 11), D- W- L- K- A- F- Y- D- K- V- A- E- K- F- K- E- F- F- ( SEC ID N.º : 12), D- W- L- K- A- F- Y- D- K- V- F- E- K- F- K- E- F- F- ( SEC ID N.º : 13), E- W- L- K- L- F- Y- E- K- V- L- E- K- F- K- E- A- F- ( SEC ID N.º : 14), E- W- L- K- A- F- Y- D- K- V- A- E- K- F- K- E- A- F- ( SEC ID N.º : 15), E- W- L- K- A- F- Y- D- K- V- A- E- K- L- K- E- F- F- ( SEC ID N.º : 16), E- W- L- K- A- F- Y- D- K- V- F- E- K- F- K- E- A- F- ( SEC ID N.º : 17), E- W- L- K- A- F- Y- D- K- V- F- E- K- L- K- E- F- F- ( SEC ID N.º : 18), E- W- L- K- A- F- Y- D- K- V- A- E- K- F- K- E- F- F- ( SEC ID N.º : 19), E- W- L- K- A- F- Y- D- K- V- F- E- K- F- K- E- F- F- ( SEC ID N.º : 20), A- F- Y- D- K- V- A- E- K- L- K- E- A- F- ( SEC ID N.º : 21), A- F- Y- D- K- V- A- E- K- F- K- E- A- F- ( SEC ID N.º : 22), A- F- Y- D- K- V- A- E- K- F- K- E- A- F- ( SEC ID N.º : 23), A- F- Y- D- K- F- F- E- K- F- K- E- F- F- ( SEC ID N.º : 24), A- F- Y- D- K- F- F- E- K- F- K- E- F- F- ( SEC ID N.º : 25), A- F- Y- D- K- V- A- E- K- F- K- E- A- F- ( SEC ID N.º : 26), A- F- Y- D- K- V- A- E- K- L- K- E- F- F- ( SEC ID N.º : 27), A- F- Y- D- K- V- F- E- K- F- K- E- A- F- ( SEC ID N.º : 28), A- F- Y- D- K- V- F- E- K- L- K- E- F- F- ( SEC ID N.º : 29), A- F- Y- D- K- V- A- E- K- F- K- E- F- F- ( SEC ID N.º : 30), K- A- F- Y- D- K- V- F- E- K- F- K- E- F- ( SEC ID N.º : 31), L- F- Y- E- K- V- L- E- K- F- K- E-



A-F- (SEC ID N° : 32), A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F- (SEC ID N° : 33), A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F- (SEC ID N° : 34), A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F- (SEC ID N° : 35), A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F- (SEC ID N° : 36), A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N° : 37), A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N° : 38), D-W-L-K-A-L-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-L- (SEC ID N° : 39), D-W-F-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F- (SEC ID N° : 40), D-W-F-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N° : 41), E-W-L-K-A-L-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-L- (SEC ID N° : 42), E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEC ID N° : 43), E-W-F-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F- (SEC ID N° : 44), E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N° : 45), E-W-L-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N° : 46), E-W-F-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N° : 47), D-F-L-K-A-W-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-W- (SEC ID N° : 48), E-F-L-K-A-W-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-W- (SEC ID N° : 49), D-F-W-K-A-W-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-W-W- (SEC ID N° : 50), E-F-W-K-A-W-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-W-W- (SEC ID N° : 51), D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F- (SEC ID N° : 52), D-K-W-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L- (SEC ID N° : 53), E-K-L-K-A-F-Y-E-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F- (SEC ID N° : 54), E-K-W-K-A-V-Y-E-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L- (SEC ID N° : 55), D-W-L-K-A-F-V-D-K-F-A-E-K-F-K-E-A-Y- (SEC ID N° : 56), E-K-W-K-A-V-Y-E-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L- (SEC ID N° : 57), D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F- (SEC ID N° : 58), E-W-L-K-A-F-V-Y-E-K-V-F-K-L-K-E-F-F- (SEC ID N° : 59), D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEC ID N° : 60), E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEC ID N° : 61), D-W-L-K-A-F-Y-D-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEC ID N° : 62), E-W-L-K-A-F-Y-E-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEC ID N° : 63), D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F- (SEC ID N° : 64), E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F- (SEC ID N° : 65), D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F- (SEC ID N° : 66), E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F- (SEC ID N° : 67), D-W-L-K-A-F-Y-D-R-V-A-E-R-L-K-E-A-F- (SEC ID N° : 68), E-W-L-K-A-F-Y-E-R-V-A-E-R-L-K-E-A-F- (SEC ID N° : 69), D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F- (SEC ID N° : 70), E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F- (SEC ID N° : 71), D-W-L-R-A-F-Y-D-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEC ID N° : 72), E-W-L-R-A-F-Y-E-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEC ID N° : 73), D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-R-E-A-F- (SEC ID N° : 74), E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-R-E-A-F- (SEC ID N° : 75), D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F- (SEC ID N° : 76), E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F- (SEC ID N° : 77), D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-P-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F (SEC ID N° : 78), D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-P-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F (SEC ID N° : 79), D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-P-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F (SEC ID N° : 80), D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F-P-D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-L-K-E-A-F (SEC ID N° : 81), D-K-W-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L (SEC ID N° : 82), D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-P-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F (SEC ID N° : 83), D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F-P-D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F (SEC ID N° : 84), D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-A-E-K-F-K-E-F-F-P-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-A-E-K-F-K-E-F-F (SEC ID N° : 85).

Los péptidos pueden comprender una pluralidad de aminoácidos “D” y/o pueden estar protegidos como se describe en el presente documento. Todos los aminoácidos enantioméricos que comprenden dicho péptido pueden ser aminoácidos D. El kit puede incluir opcionalmente adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable y/o el péptido se proporciona combinado con un excipiente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, en una formulación de dosificación unitaria). Los kits pueden proporcionar el/los péptido(s) como una formulación de dosificación unitaria que es para administración oral. Los kits también pueden, opcionalmente, incluir materiales de instrucciones que enseñan el uso de dicho péptido para mejorar uno o más síntomas de aterosclerosis y/o para reducir la probabilidad de aparición de uno o más síntomas de aterosclerosis.

5  
10  
15

Como se describe en el presente documento se pueden proporcionar péptidos en un kit para mejorar un síntoma de aterosclerosis, comprendiendo dicho kit un recipiente que contiene una composición adecuada para administración oral que mejora un síntoma de aterosclerosis, en el que dicha composición comprende un péptido que es un péptido un péptido apo A-I de ser humano o un análogo de péptido apo A-I de ser humano, en el que dicho péptido tiene un primer grupo protector unido a un amino terminal y un segundo grupo protector unido a un carboxilo terminal y adicionalmente en el que dicho péptido comprende una pluralidad de residuos de aminoácidos D. Dicho péptido puede combinarse con un excipiente farmacéuticamente aceptable en una formulación de dosificación unitaria. El kit puede comprender adicionalmente materiales de instrucciones que enseñan el uso de dicho péptido para mejorar uno o más síntomas de aterosclerosis.

20  
25

Como se describe en el presente documento se pueden proporcionar péptidos en un procedimiento de mitigar o evitar una complicación coronaria asociada con una respuesta en fase aguda a una inflamación en un mamífero, en el que dicha complicación coronaria es un síntoma de aterosclerosis, dicho procedimiento comprende administrar a un mamífero que tiene dicha respuesta en fase aguda, o que está en riesgo de dicha respuesta en fase aguda, un polipéptido como se describe en el presente documento. Dicha administración puede ser por una vía seleccionada del grupo que consiste en administración oral, administración nasal, administración rectal, inyección intraperitoneal e inyección intravascular, inyección subcutánea, administración transcutánea e inyección intramuscular. El polipéptido

como se describe en el presente documento puede administrarse en combinación con una forma de todo L del mismo polipéptido. El polipéptido como se describe en el presente documento se puede proporcionar como una formulación unitaria en un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicha respuesta en fase aguda puede ser una respuesta inflamatoria asociada con una enfermedad inflamatoria recurrente. Dicha respuesta en fase aguda puede estar asociada con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en lepra, tuberculosis, lupus eritematoso sistémico, polimialgia reumática, poliarteritis nodosa, esclerodermia, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Alzheimer y SIDA, polimialgia reumática, poliarteritis nodosa, esclerodermia, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Alzheimer, SIDA, calcificación coronaria, estenosis aórtica calcificada, osteoporosis y artritis reumatoide. Dicha respuesta en fase aguda puede ser una respuesta inflamatoria asociada con una afección del grupo que consiste en una infección bacteriana, una infección vírica, una infección fúngica, un trasplante de órganos, una herida, una prótesis implantada, infección parasitaria, sepsis, síndrome de choque endotóxico y formación de biopelícula.

Como se describe en el presente documento los péptidos pueden proporcionarse en un procedimiento de mitigar o evitar una complicación coronaria asociada con una respuesta de fase aguda a una inflamación en un mamífero, en el que dicha complicación coronaria es un síntoma de aterosclerosis, comprendiendo dicho procedimiento someter a ensayos a dicho mamífero para un nivel de proteína de fase aguda (APP) indicador de una respuesta en fase aguda o de un riesgo significativo de una respuesta en fase aguda; y administrar a un mamífero que muestra un nivel de proteína de fase aguda (APP) indicador de una respuesta en fase aguda un polipéptido del primer aspecto. Dicha proteína de fase aguda (APP) puede ser una APR significativa seleccionada del grupo que consiste en amiloide sérico A, proteína reactiva c, componente amiloide P sérico, proteína del complemento C2, proteína del complemento C3, proteína del complemento C4, proteína del complemento C5, proteína del complemento C9, proteína del complemento B, inhibidor C1, proteína de unión C4, fibrinógeno, factor de von Willebrand,  $\alpha$ 1-antitripsina,  $\alpha$ 1-antiquimiotripsina, antiplasmina  $\alpha$ 2, cofactor de la heparina II, inhibidor I de activador de plasminógeno, haptoglobina, hemopexina, ceruloplasmina, manganeso superóxido dismutasa, glucoproteína ácida  $\alpha$ 1, proteína de unión a manosa, proteína leucocitaria I, lipoproteína (a) y proteína de unión a lipopolisacáridos. Dicha proteína de fase aguda (APP) puede ser una APR negativa seleccionada del grupo que consiste en albúmina, prealbúmina, transferrina, apoAI, apoAII, glucoproteína  $\alpha$ 2-HS, inhibidor de inter- $\alpha$ -tripsina, glucoproteína rica en histidina.

#### Definiciones.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan intercambiamente en el presente documento para hacer referencia a un polímero de residuos aminoacídicos. Los términos son aplicables a polímeros aminoacídicos en los que uno o más residuos de aminoácidos es/son un análogo químico artificial de un aminoácido correspondiente que se da de forma natural, así como a polímeros de aminoácidos que se dan de forma natural.

La expresión “hélice anfipática de clase A” hace referencia a una estructura proteica que forma una hélice  $\alpha$  que produce una segregación de caras polares y no polares con los residuos cargados positivamente residiendo en la interfase polar-no polar y los residuos cargados negativamente residiendo en el centro de la fase polar (véase, por ejemplo, “Segrest y col. (1990) Proteins: Structure, Function, and Genetics 8: 103-117).

La expresión “mejorar” cuando se usa con respecto a “mejorar uno o más síntomas de aterosclerosis” se refiere a una reducción, prevención o eliminación de uno o más síntomas característicos de aterosclerosis y/o patologías asociadas. Una reducción tal incluye, pero no se limita a reducción o eliminación de fosfolípidos oxidados, una reducción en formación y ruptura de placa aterosclerótica, una reducción en eventos clínicos tales como ataque al corazón, angina de pecho o apoplejía, una disminución en hipertensión, una disminución en biosíntesis de proteínas inflamatorias, reducción en colesterol plasmático y similares.

El término “aminoácidos enantioméricos” se refiere a aminoácidos que pueden existir en al menos dos formas que son imágenes especulares no superponibles una de la otra. La mayoría de los aminoácidos (salvo glicina) son enantioméricos y existen en una así llamada forma L (aminoácido L) o forma D (aminoácido D). Los aminoácidos que se dan más de forma natural son aminoácidos “L”. Los términos “aminoácido D” o “aminoácido L” se usan para hacer referencia a la configuración absoluta del aminoácido, más que a una dirección de rotación particular del plano de luz polarizada. El uso en el presente documento es consistente con el uso estándar por aquellos de habilidad en la técnica.

El término “grupo protector” se refiere a un grupo químico que, cuando se une a un grupo funcional en un aminoácido (por ejemplo una cadena lateral, un grupo amino alfa, un grupo carboxi alfa, etc.) bloquea o enmascara las propiedades de ese grupo funcional. Los grupos protectores aminotermiales incluyen, pero no se limitan a acetilo, o grupos amino. Otros grupos protectores aminotermiales incluyen, pero no se limitan a cadenas de alquilo como en ácidos grasos, propionilo, formilo y otras. Los grupos protectores carboxilo terminales incluyen, pero no se limitan a grupos que forman amidas o ésteres.

La frase “proteger un fosfolípido de oxidación por un agente oxidante” hace referencia a la capacidad de un compuesto para reducir la velocidad de oxidación de un fosfolípido (o la cantidad de fosfolípido oxidado producido) cuando ese fosfolípido se pone en contacto con un agente oxidante (por ejemplo peróxido de hidrógeno, 13-(S)-

HPODE, 15(S)-HPETE, HPODE, HPETE, HODE, HETE, *etc.*).

Los términos “lipoproteína de baja densidad” o “LDL” se definen de acuerdo con el uso común de aquellos de habilidad en la técnica. Generalmente, LDL se refiere al complejo lípido-proteína que cuando se aísla por ultracentrifugación se encuentra en el intervalo de densidad  $d = 1,019$  a  $d = 1,063$ .

- 5 Los términos “lipoproteína de alta densidad” o “HDL” se definen de acuerdo con el uso común de aquellos de habilidad en la técnica. Generalmente, “HDL” se refiere al complejo lípido-proteína que cuando se aísla por ultracentrifugación se encuentra en el intervalo de densidad de  $d = 1,063$  a  $d = 1,21$ .

10 El término “HDL de Grupo I” hace referencia a una lipoproteína de alta densidad o a componentes de la misma (*por ejemplo*, apo A-I, paraoxonasa, acetilhidrolasa de factor de activación de plaquetas, *etc.*) que reduce lípidos oxidados (*por ejemplo* en lipoproteínas de baja densidad) o que protege lípidos oxidados de oxidación por agentes oxidantes.

El término “HDL de Grupo II” hace referencia a una HDL que ofrece actividad reducida o que no ofrece ninguna actividad en proteger lípidos de oxidación o en reparar (*por ejemplo* reduciendo) lípidos oxidados.

15 El término “componente HDL” se refiere a un componente (por ejemplo moléculas) que comprende una lipoproteína de alta densidad (HDL). Los ensayos para HDL que protege a los lípidos de oxidación o que repara (*por ejemplo* reduce lípidos oxidados) incluyen también ensayos para componentes de HDL (*por ejemplo* apo A-I, paraoxonasa, factor acetilhidrolasa de activación de plaquetas, *etc.*) que muestran tal actividad.

El término “péptido apo A-I humano” se refiere a un péptido apo A-I humano de longitud total o a un fragmento o dominio del mismo que comprende una hélice anfipática de clase A.

20 Una “reacción monocítica” como se usa en el presente documento se refiere a actividad característica de monocitos de la “respuesta inflamatoria” asociada con formación de placa aterosclerótica. La reacción monocítica se caracteriza por adhesión de monocitos a células de la pared vascular (por ejemplo, células del endotelio vascular), y/o a quimiotaxis dentro del espacio subendotelial, y/o a diferenciación de monocitos en macrófagos.

25 El término “ausencia de cambio” cuando se refiere a la cantidad de fosfolípidos oxidados se refiere a la falta de un cambio detectable, más preferentemente a la falta de un cambio significativo estadísticamente (por ejemplo al nivel de confianza de al menos el 85 %, preferentemente al menos al 90 %, más preferentemente al menos al 95 % y lo más preferentemente al menos al 98 % o al 99 %). La ausencia de un cambio detectable se puede referir también a ensayos en los que cambia el nivel de fosfolípidos oxidados, pero no tanto como en la ausencia de la(s) proteína(s) descritas en el presente documento o con referencia a otros controles positivos o negativos.

30 Las siguientes abreviaturas se usan en el presente documento: PAPC: L- $\alpha$ -1-palmitoil-2-araquidonoil-*sn*-glicero-3-fosfolcolina; POVPC: 1-palmitoil-2-(5-oxovaleroil)-*sn*-glicero-3-fosforilcolina; PGPC: 1-palmitoil-2-glutaroil-*sn*-glicero-3-fosfolcolina; PEIPC: 1-palmitoil-2-(5,6-epoxisoprostano  $E_2$ )-*sn*-glicero-3-fosforilcolina; ChC 18:2 linoleato de colesterilo; ChC18:2-OOH: hidroperóxido de linoleato de colesterilo; DMPC: 1,2-ditetradecanoil-rac-glicerol-3-fosfolcolina; PON: paraoxonasa; HPF: campo de alta energía estandarizada; PAPC: L- $\alpha$ -1-palmitoil-2-araquidonoil-*sn*-glicero-3-fosforilcolina; POVPC: 1-palmitoil-2-(5-oxovaleroil)-*sn*-glicero-3-fosforilcolina; PGPC: 1-palmitoil-2-glutaril-*sn*-glicero-3-fosforilcolina; PEIPC: 1-palmitoil-2-(5,6-epoxisoprostano  $E_2$ )-*sn*-glicero-3-fosforilcolina; PON: paraoxonasa; BL/6: C57BL/6J; C3H:C3H/HeJ.

35 El término “sustitución conservadora” se usa en referencia a proteínas o péptidos para reflejar sustituciones de aminoácidos que no alteran sustancialmente la actividad (especificidad (*por ejemplo* para lipoproteínas)) o la afinidad de unión (*por ejemplo* por lípidos o lipoproteínas) de la molécula. Las sustituciones de aminoácidos típicamente conservadoras implican sustitución de un aminoácido por otro aminoácido similar con propiedades químicas similares (*por ejemplo* carga o hidrofobicidad). Los siguientes seis grupos contienen cada uno aminoácidos que son típicamente sustituciones conservadoras el uno para el otro: 1) Alanina (A), Serina (S), Threonina (T); 2) Ácido aspártico (D), Ácido Glutámico (E); 3) Asparragina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

40 Los términos “idéntico” o “identidad” en porcentaje, en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son la misma o que tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son el mismo, cuando se comparan y alinean para correspondencia máxima, según se miden usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o por inspección visual. Con respecto a los péptidos de la presente invención la identidad de secuencia se determina por encima de la longitud total del péptido.

45 Para comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, a la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencias, si es necesario y se designan parámetros de programa de algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula después la identidad de secuencia en porcentaje para la(s) secuencia(s) de prueba en relación a la

secuencia de referencia, en base a los parámetros de programas diseñados.

El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Appl. Math. 2: 482 (1981), por el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), por la búsqueda para procedimiento de similitud de Pearson & Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85: 2444, por implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package; Genetics Computer Group, 575 Science, Dr. Madison, WI), o por inspección visual (véase *generalmente* Ausubel y col., *supra*).

Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea un alineamiento de secuencias múltiple a partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineamientos por pares, progresivos para mostrar relación y porcentaje de identidad de secuencia. También representa gráficamente un árbol o dendrograma que muestra las relaciones de agrupamiento usadas para crear el alineamiento. PILEUP usa una simplificación del procedimiento de alineamiento progresivo de Feng & Doolittle (1987) J. Mol. Evol. 35: 351-360. El procedimiento usado es similar al procedimiento descrito por Higgins & Sharp (1989) CABIOS 5: 151-153. El programa puede alinear hasta 300 secuencias, cada una de una longitud máxima de 5.000 nucleótidos o aminoácidos. El procedimiento de alineamiento múltiple comienza por el alineamiento por pares de las dos secuencias más similares, produciendo un agrupamiento de dos secuencias alineadas. Este agrupamiento se alineó después con la siguiente secuencia más relacionada o con el siguiente agrupamiento de secuencias alineadas más relacionado. Se alinearon dos agrupamientos de secuencias por una simple extensión del alineamiento por pares de dos secuencias individuales. El alineamiento final se logra por una serie de alineamientos progresivos, por pares. El programa se hace funcionar diseñando secuencias específicas y sus coordenadas de aminoácidos o nucleótidos para regiones de comparación de secuencias y diseñando los parámetros de los programas. Por ejemplo, una secuencia de referencia se puede comparar a otras secuencias de prueba para determinar la relación de identidad de secuencia en porcentaje usando los siguientes parámetros: peso de intervalo por defecto (3,00), peso de longitud de intervalo por defecto (0,10), e intervalos finales pesados.

Otro ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar identidad de secuencia en porcentaje y similitud de secuencia es al algoritmo BLAST, que se describe en Altschul y col. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410. El software para llevar a cabo análisis BLAST está públicamente disponible por el National Center of Biotechnology Information (<http://w.w.nc-bi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica primero identificar los pares de secuencia de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia que está siendo indagada, que bien equivalen o bien satisfacen alguna puntuación T umbral de valoración positiva cuando se alienan con una palabra de la misma longitud en una secuencia de bases de datos. T se refiere como el umbral de puntuación de palabra de zona (Altschul y col., *supra*). Estos golpes de palabras de zona iniciales actúan como iniciadores para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largas que los contengan. Los golpes de palabras se extienden después en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta tan lejos como se pueda incrementar la puntuación de alineamiento acumulativo. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa por un par de residuos que se aparean; siempre que > 0) y N (puntuación de penalización por residuos que no se aparean; siempre > 0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los golpes de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en la cantidad X a partir de su valor logrado máximo; la puntuación acumulativa va hasta cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos que puntúan negativo; o se alcanza el final de cada secuencia. Los parámetros de algoritmo BLAST W, T y C determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = 4 y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLAST usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de valoración de BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 10915).

Además de calcular identidad de secuencia en porcentaje, el algoritmo BLAST también lleva a cabo un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin & Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 90: 5873-5787). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que un apareamiento entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos ocurriría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma menor en una comparación del ácido nucleico de prueba para el ácido nucleico de referencia es menos de aproximadamente 0,1, más preferentemente menos de aproximadamente 0,01 y lo más preferentemente menos que aproximadamente 0,001.

El término "péptido D-18A" no forma parte de la invención reivindicada y se usa con fines ilustrativos y se refiere a un péptido que tiene la secuencia: D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F (SEC ID N.º: 1) donde todos los aminoácidos enantioméricos son aminoácidos en forma D.

#### Breve descripción de los dibujos

Figura 1, paneles A, B, C y D muestran la asociación de <sup>14</sup>C-D-5F (que no forma parte de la invención reivindicada) con componentes de sangre en un ratón con ApoE anulada. Se administró el péptido mimético de ApoA-I unido a D-

5F con aminoácidos de  $^{14}\text{C}$  por sonda oral a ratones deficientes en apo E ( $n = 5$ ) o se incubó con su plasma *in vitro*. Se recogió sangre en ayunas 6 horas después de colocar la sonda y se determinó la asociación de  $^{14}\text{C}$  con sangre, plasma y lipoproteínas.

5 Figuras 2A y 2B ilustran que el péptido D administrado oralmente está activo. Los péptidos miméticos de ApoA-I D-5F y L-5F, que no forman parte de la invención reivindicada, (100  $\mu\text{g}$  por animal) se administraron a ratones con el receptor de LDL anulado ( $n = 5$ ) por sonda oral. La sangre se recogió después de 6 horas, se aislaron LDL y HDL por filtración de gel (FPLC) y se examinaron en el sistema de modelos de pared arterial para capacidad protectora de HDL (Figura 2A) y resistencia a LDL (Figura 2B) a oxidación determinando la actividad quimiotáctica monocítica generada. Como se ve, D-5F pero no L-5F que no forman parte de la invención reivindicada, volvió a la HDL  
10 marcadamente más protectora y LDL después de D-5F llegó a ser altamente resistente a oxidación.

Las figuras 3A y 3B muestran la concentración plasmática de péptido D frente a L después de sondear. Los péptidos miméticos de ApoA-I D-4F (Figura 3B) y L-4F (Figura 3B), que no forman parte de la invención reivindicada, se marcaron con  $^{125}\text{I}$  y se administraron por sonda oral a ratón con el receptor de LDL anulado ( $n = 4$ ). Se recogió sangre después de 3 horas, se fraccionó plasma por FPLC y se determinó radiactividad en las fracciones eluidas.  
15 Menos del 15 % del péptido L eluyó como 18-mero intacto mientras que más del 70 % del D-4F estuvo intacto. Estos estudios demuestran que el péptido D es drásticamente más resistente a degradación *in vivo* comparado con el péptido L.

La figura 4 ilustra la ausencia de anticuerpo para D-4F (que no forma parte de la invención reivindicada) en ratones  
20 tratados. No se detectó ningún anticuerpo (línea de precipitación blanca) para D-4F en plasma de ratón con receptor de LDL anulado tras 6 semanas de tratamiento con péptido a 5 mg por día (panel inferior). El control positivo (panel superior) muestra la presencia de una línea de precipitación para apoA-I en plasma de ratón. Panel superior: Centro: anti-ApoA-I de conejo y periferia: plasma de ratones D-4F. Panel inferior: Centro: plasma de ratones R de LDL -/- tratados con D 4F y Periferia: péptido D-4F puro a 0 a 80  $\mu\text{g}$ .

La figura 5 muestra la incidencia de lesiones rayadas grasas en la raíz aórtica de de ratones con receptor de LDL  
25 anulado en una Dieta de Western. Grupos de ratones con receptor de LDL anulado se pusieron en una dieta de tipo Western y se les dio oralmente, vehículo (Control) ( $n = 9$ ) o péptido D-4F ( $n = 6$ ), dos veces al día durante 6 semanas. Los ratones se sacrificaron subsiguientemente, el arco aórtico se fijó y se seccionó y se cuantificaron lesiones rayadas grasas. Los ratones que recibieron D-4F (que no forma parte de la invención) tuvieron una reducción del 81 % en área de lesión ( $p < 0,01$ ).

30 Figura 6, paneles A, B y C ilustran las distribuciones en plasma de péptido 5F (que no forma parte de la invención reivindicada) o de apo A-I tras inyección intraperitoneal. Se marcaron apoA-I humana, apoA-I de ratón y péptido 5F con  $^{125}\text{I}$  y se inyectaron intraperitonealmente en ratones C57BL/6 a los que se les había suministrado la dieta aterogénica durante al menos tres semanas. Las muestras se tomaron durante los estudios cinéticos descritos en la **Tabla 3**. Las muestras representativas se analizaron por el procedimiento CLiP y las fracciones se recogieron para  
35 determinación de radiactividad. El volumen de elución estaba basado en la velocidad de bombeo de columna solo; el volumen contribuido por la bomba de reactivo enzimática no se tuvo en cuenta. Los datos mostrados son colesterol (como absorbancia a 500 nm en unidades arbitrarias; líneas sólidas) y radiactividad (en cuentas por minuto; líneas discontinuas). Los paneles son A: humano (una hora tras inyección); B: apo A-I de ratón (una hora); C: 5F (1,5 horas).

40 Figura 7, paneles A y B ilustran la interacción de lipoproteínas de ratones con células de la pared arterial humanas. Se aislaron LDL y HDL por FPLC del plasma de ratones alimentados con dieta aterogénica e inyectados con vehículo (PBS), o con péptido 5F (que no forma parte de la invención reivindicada) a 20  $\mu\text{g}$ /ratón/día. Los cocultivos se trataron sin (Ninguna Adición) o con LDL humana (hLDL) a 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de proteína LDL, o LDL de ratón (MoLDL) a  
45 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  o con LDL humana a 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  + HDL humana (hHDL) a 350  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de proteína HDL o HDL de ratón (MoHDL) a 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Los cocultivos se incubaron con las adiciones anteriores durante 8 horas a 37°C en presencia de suero deficiente en lipoproteínas al 10 % (LPDS). Los sobrenadantes se recogieron y analizaron por equivalentes hidroperóxidos de lípidos de Auerbach (panel A). Los cocultivos se lavaron e incubaron después con medio de cultivo recién preparado sin suero o LPDS durante unas 8 horas adicionales. El medio acondicionado se recogió y se analizó por actividad quimiotáctica monocítica (panel B). Un blanco sin ninguna célula (Blanco Sin Ninguna Célula)  
50 se incluye en ambos paneles para comparación.

La figura 8 muestra áreas de secciones transversales de lesiones promedio. Los datos mostrados representan el área de sección transversal de lesiones promedio para cada animal ( $\circ$ ) y el promedio  $\pm$  EEM de todos los animales en cada grupo ( $\bullet$ ) con barras de error. Abreviaturas: PBS, ratones alimentados con la dieta aterogénica e inyectados diariamente con 200  $\mu\text{l}$  de medio salino tamponado con fosfato; 5F, ratones alimentados con la dieta aterogénica e inyectados diariamente con 20  $\mu\text{g}$  de 5F en 200  $\mu\text{l}$  de PBS (que no forma parte de la invención); MoAI: ratones alimentados con la dieta aterogénica e inyectados diariamente con 50  $\mu\text{g}$  de apoA-I de ratón en 200  $\mu\text{l}$  de PBS. \* =  $p < 0,002$  según se determina por prueba t en dos dimensiones. Se mostró también una diferencia significativa usando análisis de la varianza con un factor en rangos ( $p < 0,001$ ).

La figura 9 muestra que tanto los isómeros D como los isómeros L de imitadores de péptidos de apo A-I evitan la

- actividad quimiotáctica monocítica inducida por LDL suavemente oxidada *in vitro*. Medio solo (LDL, SIN NINGUNA CÉLULA o CÉLULAS, SIN NINGÚN LDL), LDL control de sujetos normales a 250 µg/ml (LDL) y LDL más HDL control de sujetos normales a 350 µg/ml (+HDL). Otros cocultivos se incubaron con la LDL control conjuntamente con cantidades que varían (microgramos mostradas en la abcisa) bien de D-2F, o bien de L-2F (tercer panel desde la izquierda, 2F) o bien de D-37-pA o bien de L37pA (último panel en la derecha, 37pA), que no forma parte de la invención reivindicada. Los datos representan promedio ± desviación estándar de valores obtenidos de cocultivos cuadruplicados. Los valores para HDL o péptidos añadidos fueron todos significativamente diferentes de LDL sola (primer panel de la izquierda) al nivel de  $p < 0,01$ .
- Las figuras 10A y 10B ilustran que proporcionar los peptidomiméticos de ApoA-1 de ratones de la presente invención vuelven a las células rojas resistentes a la lisis *in vitro*. Las figuras 10A y 10B muestran los resultados de ensayo de lisis de células rojas *in vitro* a las 18 horas (Figura 10A) y a las 48 horas (Figura 10B). Los asteriscos reflejan la presencia de una diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) entre la lisis de células rojas para animales que recibieron el vehículo frente a aquellos que recibieron los péptidos.
- La figura 11 muestra que proporcionar péptidos D imitadores de ApoA-1 de ratones de esta invención vuelve a la LDL circulante resistente a oxidación. Se administraron a grupos de ratones deficientes en receptor de LDL ( $n = 3$ ) los péptidos D o el vehículo de medio salino por sonda. A cada animal se dieron 100 µl de medio salino, 100 µg/100 µl de péptido D-2F o de péptido D-37pA, que no forman parte de la invención reivindicada. La sangre se recogió del seno retroorbital con anestesia suave 17 horas más tarde. LDL se aisló de plasma por FPLC. Los cocultivos de células de la pared arterial se incubaron con medio solo (SIN NINGUNA ADICIÓN), LDL control de sujetos normales (LDL), LDL más control HDL de sujetos normales (+HDL). Otros cocultivos se incubaron con LDL murina tras sondear con medio salino (MEDIO SALINO LDL), con D-2F (D-2F LDL) o con péptido D-37pA (D-37pA LDL), que no forma parte de la invención reivindicada. Los cocultivos se incubaron durante 4 horas a 37°C en presencia de LPDS al 10 %. Los sobrenadantes se descartaron después, los cocultivos se lavaron y se incubaron con medio de cultivo sin suero o LPDS durante 4 horas adicionales. Este medio acondicionado se recogió y analizó para actividad quimiotáctica de monocitos. Los valores son media ± desviación estándar de cultivos por cuadruplicado. Los asteriscos indican  $p < 0,001$ .
- La figura 12 ilustra los resultados de un ensayo de quimiotaxis que compara lipoproteínas de ratones a los que se dan péptidos de forma D y/o péptidos de forma L por sonda.
- La figura 13A ilustra los resultados de un ensayo de quimiotaxis comparando HDL control y HDL de ratones a los que se da el péptido D por sonda. La figura 13B ilustra los resultados de un ensayo de quimiotaxis que compara LDL y VDL/IDL de ratones a los que se da el péptido D por sonda.
- Las figuras 14A y 14B muestran electroforesis de 2F (que no forma parte de la invención reivindicada) indicando su autoasociación. Figura 14A: SDS PAGE (18 %) de 2F. El carril 1 muestra el peso molecular estándar y el carril 2 muestra la banda correspondiente a 2F (el peso molecular es 2242) que se mueve ligeramente más abajo que el peso molecular estándar más bajo (3,5-2,5 kDa). Figura 14B: PAGE no desnaturizante (4-12 %) que muestra las movilidades de 100 µg/ml (carril 2) y 250 µg/ml (carril 1) de 2F indicando autoasociación en solución. El carril 3 muestra la movilidad del peso molecular alto estándar.
- La figura 15 muestra que las series homólogas de péptidos estabilizan la transición de la fase hex de bicapas DiPoPE. Cambio en  $T_H$  de DiPoPE según una función de la fracción molar del péptido añadido. Medido por DSC a una velocidad de exploración calentando de 37°/h. ● 2F; ○ 3F<sup>3</sup>; ■ 4F; □ 5F; ▼ 6F; ▲ 7F; △ apo A-I. (El péptido 6F forma parte de la invención reivindicada. Los otros péptidos no forman parte de la invención reivindicada).
- Figura 16: seguimiento de dispersión de la luz en ángulo recto relativo de la disolución de EPC MLV por series homólogas de péptidos como una función del tiempo. Se muestra una curva de eliminación de EPC MLV representativa para cada uno de los péptidos homólogos. Se usó una concentración equimolar de péptido y EPC (105 µM). Ambas longitudes de onda de excitación y emisión fueron 400 nm. El Tritón X-100 logró disolución completa a una concentración final de 1 mM. -●- EPC; -○- 2F; -■- 3F<sup>3</sup>; -□- 3F<sup>14</sup>; -▲- 4F; -△- 5F; -▼- 6F; -▽- 7F; -◇- apo A-I humana; -◆- Tritón X-100. (El péptido 6F forma parte de la invención reivindicada. Los otros péptidos no forman parte de la invención reivindicada).
- La figura 17 ilustra la capacidad de activación de LCAT de péptidos homólogos. Los histogramas representan activación de LCAT por los péptidos -F-. La actividad de LCAT se midió usando vesículas unilamelares pequeñas de EPC-colesterol y la actividad se representa como un porcentaje comparado con aquel de la actividad apo A-I, donde la actividad apo A-I se toma para ser el 100 %. Cada valor representa un valor promedio a partir de triplicados. La concentración peptídica usada fue 20 µg/ml. (El péptido 6F forma parte de la invención reivindicada. Los otros péptidos no forman parte de la invención reivindicada).
- La figura 18 muestra que la quimiotaxis monocítica inducida por LDL se inhibió por las series homólogas de péptidos. LDL sola o LDL incubada bien con HDL humana o bien con las series homólogas de péptidos se añadió a los cocultivos de células de la pared arterial humanas durante 8 horas en presencia de LPDS al 10 %. Los sobrenadantes se eliminaron y los cocultivos se lavaron con medio de cultivo sin suero o LPDS. El medio

acondicionado se recogió después y se analizó para capacidad quimiotáctica monocítica. Los datos representan valores de promedio  $\pm$  EEM ( $n = 9$  en cada caso). Por comparaciones de dos en dos con todos los péptidos LDL salvo los péptidos 3F fueron significativamente más efectivos (al menos  $p < 0,001$ , indicado por '†' y '\*'). Se analizaron las comparaciones entre todos los péptidos por ANOVA de un factor. El asterisco indica que péptidos 4F, 5F, que no forman parte de la invención reivindicada y 6F, que forma parte de la invención reivindicada, fueron significativamente más efectivos que los homólogos 2F y 7F ( $p < 0,05$  por comparación de Duckett), que no forman parte de la invención reivindicada. El corchete indica que no hay diferencia significativa en la capacidad de inhibir quimiotaxis inducida por LDL entre estos tres péptidos.

La figura 19 muestra que la infección con Influenza A causa un incremento en fosfolípidos oxidados hepáticos dos días después de la infección. Los ratones C57BL/6 a una dieta de pienso se infectaron con una dosis de virus influenza A intranasalmente de tal forma que no resultó ninguna viremia como se describe por Van Lenten y col. (2001) *Circulation*, 103: 2283-2288. Cero, 2, 3, 5, 7 y 9 días después de la infección los hígados se retiraron y oxidaron contenido en fosfolípidos determinado por IE-EM.

La figura 20 muestra que D-4F (que no forma parte de la invención reivindicada) evita el decrecimiento en actividad paraoxonasa después de infección con Influenza A. Algunos de los ratones descritos en la Figura 19 se inyectaron intraperitonealmente con 20  $\mu$ g diariamente de D-4F y los otros se inyectaron con medio salino tamponado con fosfato (PBS). Se midió actividad paraoxonasa (PON) en el plasma a cero, 2, 7 y 9 días después de la infección.

La figura 21 muestra que D-F4 (que no forma parte de la invención reivindicada) evita la inducción de fosfolípidos oxidados en aortas de ratones infectados con virus de la Influenza A. Algunos de los ratones descritos en la figura 19 se inyectaron intraperitonealmente con 20  $\mu$ g diariamente de D-4F y los otros se inyectaron con medio salino tamponado con fosfato (PBS). Las aortas de los ratones se recogieron en los días cero, 2, 7 y 9 días después de la infección y el contenido en fosfolípidos oxidados se determinó por IE-EM.

[0001] Las figuras 22A a 22C muestran que, después de administración oral, D-4F, pero no L-4F (que no forma parte de la invención reivindicada) permanece intacto en la circulación de ratones con el receptor de LDL anulado y potencia la capacidad de HDL para proteger LDL contra la oxidación de la células de la pared arterial humana y reduce la capacidad quimiotáctica monocítica inducida por LDL. Figura 22A: se radiomarcaron los péptidos L-4F y D-4F usando el reactivo de yodo-perlas y se administraron por sonda oral a ratones con el receptor de LDL anulado (100  $\mu$ l de medio salino conteniendo 100  $\mu$ g de péptido no marcado más péptido marcado con  $^{125}$ I con actividad específica de  $11 \times 10^6$  cpm por  $\mu$ g de péptido por animal,  $n = 3$ ). La sangre se recogió después de 4 horas, el plasma se separó, se deslipidizó y se analizó por HPLC de fase reversa como se describe en referencia 12. Paneles B y C: péptidos L-4F y D-4F (100  $\mu$ g en 10 ml de medio salino por animal) se administraron a ratones deficientes en receptor de LDL ( $n = 5$ ) por sonda oral. La sangre se recogió después de 6 horas, se aislaron plasma HDL y LDL por filtración de gel (FPLC) y se examinaron en los cocultivos. Figura 22B: se muestra la capacidad de HDL de ratones y de seres humanos para proteger una LDL humana control (hLDL) contra oxidación por células de la pared arterial humana y para inhibir actividad quimiotáctica monocítica inducida por LDL. Se añadió LDL humana a 200  $\mu$ g de proteína/ml a cocultivos de células de la pared arterial humana conjuntamente con HDL humana (hHDL) a 350  $\mu$ g de proteína/ml o con HDL de ratón (mHDL) a 100  $\mu$ g de colesterol/ml tomada de ratones que recibieron medio salino (Medio Salino Rx) o L-4F (L-4F Rx) o D-4F (D-4F Rx) y se determinó actividad quimiotáctica monocítica como se describe en el presente documento. Figura 22C: se muestra la capacidad de LDL de ratones para inducir actividad quimiotáctica monocítica. Los controles de ensayo se muestran en la izquierda como en el Panel B. En la derecha, se aisló LDL de ratones (mLDL) a partir de ratones que recibieron medio salino (Medio Salino Rx) o L-4F (L-4F Rx) o D-4F (D-4F Rx) y se añadió a 100  $\mu$ g de colesterol/ml a los cocultivos de células de la pared arterial sin HDL y sin actividad quimiotáctica monocítica determinada. Los valores son promedio  $\pm$  desviación estándar para cuatro pocillos en dos experimentos independientes.

[0002] Las figuras 23 muestran que la administración oral de D-4F (que no forma parte de la invención reivindicada) reduce lesiones drásticamente en ratones con el receptor de LDL anulado a una dieta Western. Los grupos de ratones con el receptor de LDL anulado se pusieron a una dieta Western y se les administró mediante sonda oral, 100  $\mu$ l de medio salino solo (Medio Salino),  $n = 4$  animales, o 100  $\mu$ l de liposomas sin D-4F (Liposomas),  $n = 5$  animales, o 2,5 mg de péptido D-4F en 100  $\mu$ l de liposomas (D-4F en liposomas),  $n = 6$  animales, dos veces diarias durante 6 semanas. Los ratones se sangraron y subsiguientemente se sacrificaron, se les fijó la raíz arterial, se seccionó y se cuantificó el grado de tinción con Tintura de Sudán en lesiones rayadas grasas.

[0003] La Figura 24 muestra que la administración oral de DF-4 (que no forma parte de la invención reivindicada) reduce drásticamente lesiones en ratones con la apo E anulada en una dieta de pienso. A las 4 semanas de edad, se añadió D-4F al agua de beber de algunos de los ratones con la apo E anulada dando una concentración de 1 ml/ml de D-4F (ratones  $n = 4$ ). Se añadió D-4F a una concentración de 2 mg/ml al agua de beber de otro grupo de ratones ( $n = 4$  ratones) y no se añadió ningún péptido al agua de beber de un tercer grupo de ratones ( $n = 5$  ratones). Todos los ratones consumieron aproximadamente 2,5 ml de agua por día de tal forma que un grupo no recibió ningún péptido (Agua), un segundo grupo recibió 2,5 mg de D-4F/ratón/día (2,5 mg D-4F) y el tercer grupo recibió 5,0 mg de D-4F/ratón/día (5,0 mg D-4F). Todos continuaron a la dieta de pienso durante 5 semanas tiempo al que los ratones se sangraron y se sacrificaron subsiguientemente, se fijó su raíz aórtica, se seccionaron y se cuantificó el grado de tinción con Tintura de Sudán en lesiones rayadas grasas.

## Descripción detallada

### I. Mitigación de un síntoma de aterosclerosis.

La invención pertenece al descubrimiento de que péptidos sintéticos diseñados para imitar el resto helicoidal anfipático de clase A (Segrest y col. (1990) *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 8: 103-117) son capaces de asociarse con fosfolípidos y de manifestar muchas propiedades biológicas similares a apo-A-I humano. En particular, se descubrió que cuando tales péptidos se formulan usando aminoácidos D, los péptidos mostraron semividas en suero drásticamente elevadas y particularmente cuando los extremos aminoterminal y carboxiterminal se bloquean, se pueden administrar incluso oralmente.

Además, se descubrió que tales péptidos de forma D retienen la actividad biológica del péptido de forma L correspondiente. Los estudios de animales *in vivo* que usan tales péptidos de forma D mostraron administración oral efectiva, semivida sérica elevada y la capacidad para mitigar o evitar/inhibir uno o más síntomas de aterosclerosis.

Los inventores descubrieron que la HDL normal inhibe tres etapas en la formación de LDL suavemente oxidada. En esos estudios (véase, solicitud en trámite junto con la presente USN 09/541,468, presentada el 31 de marzo, 2000) los autores de la presente invención demostraron que tratar LDL humana *in vitro* con péptido apo A-I o con imitador de péptido de apo A-I (37pA) retiró las moléculas iniciadoras de la oxidación de la LDL que incluyen HPODE y HPETE. Estas moléculas iniciadoras de la oxidación se requirieron por cocultivos de células de la pared arterial humana para ser capaces de oxidar LDL y para que la LDL induzca a las células de la pared arterial a producir actividad quimiotáctica monocítica. Los inventores han demostrado también que después de la inyección de apo A-I en ratones o de la infusión en seres humanos, la LDL aislada de los ratones o de los voluntarios humanos después de inyección/infusión de apo A-I fue resistente a oxidación por células de la pared arterial humana y no indujo actividad quimiotáctica monocítica en los cocultivos de células de la pared arterial.

La función protectora de los péptidos D de la presente invención está ilustrada en las Figuras 1 a 5. La Figura 1, paneles A, B, C y D muestran la asociación de 14C-D-5F con componentes en la sangre en un ratón con la ApoE anulada. Se demostró también en el presente documento, que HDL de ratones que se alimentaron con una dieta aterogénica y se inyectaron con PBS fallan para inhibir la oxidación de LDL humana y fallan para inhibir actividad quimiotáctica monocítica inducida por LDL en cocultivos de paredes arteriales humanas. En contraste, HDL de ratones alimentados con una dieta aterogénica e inyectados diariamente con péptidos descritos en el presente documento fue tan efectiva en inhibir oxidación de LDL humanas y en evitar actividad quimiotáctica monocítica inducida por LDL en los cocultivos como lo fue HDL humana normal (Figuras 2A y 2B). Además, LDL tomada de ratones alimentados con la dieta aterogénica e inyectados diariamente con PBS se oxidó más fácilmente e indujo más fácilmente actividad quimiotáctica monocítica que LDL tomada de ratones alimentados con la misma dieta pero inyectados con 20 µg diariamente de péptido 5F. El péptido D no pareció ser inmunógeno (Figura 4).

Las respuestas *in vitro* de células de las paredes arteriales a HDL y LDL de ratones alimentados con la dieta aterogénica e inyectados con un péptido de acuerdo con esta invención son consistentes con la acción protectora mostrada por tales péptidos *in vivo*. A pesar de ello, niveles similares de colesterol total, LDL-colesterol, IDL+VLDL-colesterol y nivel de HDL-colesterol inferior como un porcentaje del colesterol total, los animales alimentados con la dieta aterogénica e inyectados con el péptido tuvieron puntuaciones de lesión significativamente más bajas (Figura 5). Los péptidos de la presente invención evitaron así la progresión de lesiones ateroscleróticas en ratones alimentados con dieta aterogénica.

Así, como se describe en el presente documento se pueden proporcionar péptidos en procedimientos para mejorar y/o evitar uno o más síntomas de aterosclerosis. Los procedimientos pueden implicar administrar a un organismo, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano uno o más de los péptidos de la presente invención (o imitadores de tales péptidos). El/los péptido(s) se puede(n) administrar, como se describe en el presente documento, de acuerdo con cualquiera de un número de procedimientos estándar incluyendo, pero no limitados a inyección, supositorio, pulverizador nasal, implante de liberación en el tiempo, parche transdérmico y similares. Los péptidos se pueden administrar oralmente (*por ejemplo* como un jarabe, cápsula, o comprimido).

Los procedimientos pueden implicar la administración de un polipéptido individual como se describe en el presente documento o en la administración de dos o más péptidos diferentes. Los polipéptidos pueden proporcionarse como monómeros o en formas diméricas, oligoméricas o poliméricas. Las formas multiméricas pueden comprender monómeros asociados (por ejemplo ligados iónicamente o hidrófobamente) mientras que ciertas otras formas multiméricas comprenden monómeros unidos covalentemente (unidos directamente o a través de un engarce).

Mientras que los péptidos como se describen en el presente documento, se describen con respecto al uso en seres humanos, también son adecuados para uso animal, por ejemplo uso veterinario. Así los organismos preferidos pueden incluir, pero no se limitan a seres humanos, primates no humanos, cánidos, équidos, félidos, porcinos, ungulados, lagomorfos y similares.

Los procedimientos que incorporan los péptidos como se describen en el presente documento no se limitan a animales humanos o no humanos que muestran uno o más síntoma(s) de aterosclerosis (*por ejemplo* hipertensión, formación de placas y ruptura, reducción en eventos clínicos tales como ataque al corazón, angina de pecho, o



apoplejía, niveles altos de colesterol en plasma, niveles altos de lipoproteína de baja densidad, niveles altos de lipoproteína de muy baja densidad, o proteínas inflamatorias, etc.), pero son útiles en un contexto profiláctico. Así, los péptidos (o imitadores de los mismos) se pueden administrar a organismos para evitar la aparición/desarrollo de uno o más síntomas de aterosclerosis. Los sujetos particularmente preferidos en este contexto pueden ser sujetos que muestran uno o más factores de riesgo para aterosclerosis (*por ejemplo* historia familiar, hipertensión, obesidad, consumo de alcohol alto, fumar, colesterol en sangre alto, triglicéridos en sangre altos, LDL en sangre elevada, VLDL en sangre elevada, IDL en sangre elevada, o HDL en sangre baja, diabetes, o una historia familiar de diabetes, lípidos en sangre altos, ataque al corazón, angina de pecho o apoplejía, etc.).

Además de procedimientos de uso de los péptidos inhibidores de aterosclerosis, como se describe en el presente documento, los péptidos pueden formularse como productos farmacéuticos, particularmente para administración oral y kits para el tratamiento y/o para la prevención de uno o más síntomas de aterosclerosis.

## II. Mitigación de un síntoma de aterosclerosis asociado con una respuesta inflamatoria aguda.

Los péptidos que inhiben aterosclerosis como se describen en el presente documento son también útiles en un número de contextos diferentes. En particular, los inventores han observado que complicaciones cardiovasculares (por ejemplo aterosclerosis, apoplejía, etc.) acompañan o siguen frecuentemente a la aparición de una respuesta inflamatoria de la fase aguda. Tal respuesta inflamatoria de estado agudo está asociada a menudo con una enfermedad inflamatoria recurrente (*por ejemplo*, lepra, tuberculosis, lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide), una infección viral (*por ejemplo*, gripe), una infección bacteriana, una infección fúngica, un trasplante de órganos, una herida u otro trauma, una prótesis implantada, una biopelícula y similares.

Fue un descubrimiento sorprendente de la patente que la administración de uno o más de los péptidos descritos en el presente documento, puede reducir o evitar la formación de fosfolípidos oxidados durante o tras una respuesta de fase aguda y por lo tanto mitiga o elimina complicaciones cardiovasculares asociadas con una afección tal.

Así, por ejemplo, los inventores han demostrado que una consecuencia de la infección con influenza es la disminución en actividad paraoxonasa y en actividad acetilhidrolasa activadora de plaquetas en la HDL. Sin adherirse a ninguna teoría particular, los autores de la presente invención creen que, como un resultado de la pérdida de estas actividades enzimáticas de HDL y también como un resultado de la asociación de proteínas prooxidantes con HDL durante la respuesta de fase aguda, HDL no es capaz por más tiempo de evitar oxidación de LDL y no fue capaz por más tiempo de evitar la producción inducida por LDL de actividad monocítica quimiotáctica por células endoteliales.

Los inventores han observado que en un sujeto inyectado con dosis bajas de los polipéptidos como se describen en el presente documento (por ejemplo, 20 microgramos para ratones) diariamente después de la infección con el virus influenza A los niveles de paraoxonasa no cayeron y los fosfolípidos oxidados biológicamente activos no se generaron más allá de los antecedentes. Esto indica que D-4F (y/o otros péptidos de como se describen en el presente documento) se pueden administrar (por ejemplo oralmente o por inyección) a pacientes con enfermedad arterial coronaria conocida durante la infección con influenza o durante otros eventos que puedan generar una respuesta inflamatoria en fase aguda (*por ejemplo* debida a infección viral, infección bacteriana, trauma, trasplante, diversas afecciones autoinmunes, etc.) y así los autores de la presente invención pueden evitar por este tratamiento a corto plazo la incidencia incrementada de ataque al corazón y apoplejía asociada con patologías que generan tales estados inflamatorios.

Así, como se describe en el presente documento, se pueden administrar uno o más de los péptidos de la presente invención a un sujeto en riesgo de, o que sufra, una respuesta inflamatoria aguda y/o en riesgo de o que sufra un síntoma de aterosclerosis.

Así, por ejemplo, una persona que tenga o en riesgo de enfermedad coronaria puede administrarse profilácticamente con un polipéptido de la presente invención durante la temporada de gripe. Una persona (o animal) sujeta a una afección inflamatoria recurrente, *por ejemplo* artritis reumatoide, diversas enfermedades autoinmunes, etc., puede tratarse con un polipéptido de la presente invención para mitigar o evitar el desarrollo de aterosclerosis o apoplejía. Una persona (o animal) sujeta a trauma, *por ejemplo* herida aguda, trasplante tisular, etc. se puede tratar con un polipéptido de la presente invención para mitigar el desarrollo de aterosclerosis o apoplejía.

En ciertos casos tales procedimientos implicarán un diagnóstico de la aparición de riesgo o de una respuesta inflamatoria aguda. La respuesta inflamatoria aguda típicamente implica alteraciones en metabolismo y regulación génica en el hígado. Es un procedimiento dinámico que implica a todos los sistemas principales del cuerpo, además del sistema inmune, el sistema cardiovascular y el sistema nervioso central. Normalmente, la respuesta a la fase aguda dura solo unos pocos días, sin embargo, en casos de inflamación crónica o recurrente, una continuación aberrante de algunos aspectos de la fase acuosa puede contribuir al daño tisular subyacente que acompaña la enfermedad y puede conducir a complicaciones adicionales, por ejemplo a enfermedades cardiovasculares o a enfermedades de deposición proteica tales como amiloidosis.

Un aspecto importante de la respuesta de fase aguda es el perfil biosintético radicalmente alterado del hígado. En circunstancias normales, el hígado sintetiza un intervalo característico de proteínas de plasma a concentraciones en

el estado estacionario. Muchas de estas proteínas tienen funciones importantes y niveles en plasma más altos de estos reactivos de fase aguda (APR) o proteínas de fase aguda (APP) se requieren durante la respuesta de fase aguda tras un estímulo inflamatorio. Aunque la mayoría de los APR se sintetizan por hepatocitos, algunos se producen por otros tipos celulares, incluyendo monocitos, células endoteliales, fibroblastos y adipocitos. La mayoría de los APR se inducen entre un 50 % y varias veces por encima de los niveles normales. En contraste, los APR principales pueden incrementarse a 1000 veces por encima de los niveles normales. Este grupo incluye suero amiloide A (SAA) y bien la proteína C-reactiva (CRP) en seres humanos o bien su homóloga en ratones, componente P sérico amiloide (SAP). Los así llamados APR negativos están disminuidos en concentración de plasma durante la respuesta en fase aguda para permitir un incremento en la capacidad del hígado para sintetizar los APR inducidos.

Como se describe en el presente documento, la respuesta en fase aguda, o por consiguiente el riesgo se puede evaluar midiendo una o más APP. Medir tales marcadores se conoce bien por aquellos de habilidad en la técnica y existen compañías comerciales que proporcionan tal medida (por ejemplo AGP medida por Cardiotech Services, Louisville, KY).

### 15 III. Mitigación de un síntoma o afección con calcificación coronaria y osteoporosis.

Los inventores han identificado también lípidos oxidados como una causa de calcificación coronaria y osteoporosis. Además, sin adherirse a ninguna teoría en particular, los autores de la presente invención creen que los mismos mecanismos están implicados en la patogénesis de estenosis de calcificación aórtica.

20 Así, los péptidos descritos en el presente documento se pueden usar para inhibir o evitar un síntoma de una enfermedad tal como polimialgia reumática, poliarteritis nodosa, esclerodermia, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Alzheimer, SIDA, calcificación coronaria, estenosis aórtica calcificante, osteoporosis y similar.

### IV. Péptidos preferidos y su preparación.

#### Péptidos preferidos.

25 Se descubrió que los péptidos de clase A, según el presente documento, son capaces de mitigar uno o más síntomas de aterosclerosis. Los péptidos de clase A se caracterizan por formación de una  $\alpha$ -hélice que produce una segregación de residuos polares y no polares formando por lo tanto una cara polar y una no polar con los residuos cargados positivamente que residen en la interfase polar-no polar y los residuos cargados negativamente que residen en el centro de la fase polar (véase, por ejemplo, Anantharamaiah (1986) Met. Enzymol. 128: 626-668). Se destaca que el cuarto exón de Apo-I, cuando se pliega a 3.667 residuos/giro produce una estructura helicoidal anfipática de clase A.

30 Un péptido de clase A particularmente preferido, designado 18A (véase, Tabla 1 y también Anantharamaiah (1996) Met. Enzymol. 128: 626-668) se modificó como se describe en el presente documento para producir péptidos administrables oralmente y altamente efectivos en inhibir o evitar uno o más síntomas de aterosclerosis. Sin adherirse a ninguna teoría en particular, se cree que los péptidos de la presente invención actúan *in vivo* pueden aumentar la(s) molécula(s) iniciadora(s) de la oxidación que mitiga(n) la oxidación de LDL.

35 Los inventores determinaron que incrementar el número de los residuos de Phe en la fase hidrófoba de 18A incrementaría teóricamente la afinidad lipídica según se determina por la computación descrita por Palgunachari y col. (1996) Arteriosclerosis, Trombosis, & Vascular Biology 16: 328-338. Teóricamente, una sustitución sistemática de residuos en la fase no polar de 18A con Phe podría producir seis péptidos. Péptidos con una Phe en 2, 3 y 4 adicional tendrían valores de afinidad lipídica teórica ( $\lambda$ ) de 13, 14 y 15, respectivamente. Sin embargo, los valores de 1 saltan cuatro unidades si las Phe adicionales se incrementan de 4 a 5 (a 19 unidades  $\lambda$ ). Incrementar a 6 o 7 Phe produciría un incremento menos drástico (a 20 y 21 unidades  $\lambda$ , respectivamente). Por lo tanto, los inventores eligen 5 Phe adicionales (y así la designación de los péptidos como 5F). En un análogo particular, el péptido 5F se bloqueó en tal caso el residuo aminoterminal se acetiló y el residuo carboxilo terminal se amidó.

El nuevo análogo de péptido de clase A, inhibido en 5F, desarrollo de lesión en ratones susceptibles a aterosclerosis. El nuevo análogo de péptido, 5F, se comparó con apo A-I de ratón (MoA-I) en eficacia en inhibir aterosclerosis inducida por la dieta en estos ratones usando dosificaciones peptídicas en base al estudio por Levine y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 12040-12044).

50 Un número de otros péptidos de clase A se produjeron también y mostraron grados variantes, pero significativos de eficacia en mitigar uno o más síntomas de aterosclerosis. Un número de tales péptidos se ilustran en la Tabla 1.

Tabla 1. Péptidos como se describen en el presente documento. Péptido 6F, Secuencia ID N.º: 7 forma parte de la invención reivindicada. Los otros péptidos no forman parte de la invención reivindicada.

ES 2 438 779 T3

Nombre de péptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N.º
18A	D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F	1
2F	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	2
3F	Ac-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	3
3F14	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	4
4F	Ac-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	5
5F	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-NH <sub>2</sub>	6
6F	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-NH <sub>2</sub>	7
7F	Ac-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-NH <sub>2</sub>	8
	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-NH <sub>2</sub>	9
	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	10
	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F-NH <sub>2</sub>	11
	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F-NH <sub>2</sub>	12
	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-NH <sub>2</sub>	13
	Ac-E-W-L-K-L-F-Y-E-K-V-L-E-K-F-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	14
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	15
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-NH <sub>2</sub>	16
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	17
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F-NH <sub>2</sub>	18
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F-NH <sub>2</sub>	19
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-NH <sub>2</sub>	20
	Ac-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	21
	Ac-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	22
	Ac-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	23
	Ac-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-NH <sub>2</sub>	24
	Ac-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-NH <sub>2</sub>	25

ES 2 438 779 T3

(continuación)		
Nombre de péptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N.º
	Ac-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	26
	Ac-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-NH <sub>2</sub>	27
	Ac-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	28
	Ac-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F-NH <sub>2</sub>	29
	Ac-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F-NH <sub>2</sub>	30
	Ac-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-NH <sub>2</sub>	31
	Ac-L-F-Y-E-K-V-L-E-K-F-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	32
	Ac-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	33
	Ac-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-NH <sub>2</sub>	34
	Ac-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	35
	Ac-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F-NH <sub>2</sub>	36
	Ac-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F-NH <sub>2</sub>	37
	Ac-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-NH <sub>2</sub>	38
	Ac-D-W-L-K-A-L-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-L-NH <sub>2</sub>	39
	Ac-D-W-F-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-NH <sub>2</sub>	40
	Ac-D-W-F-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-NH <sub>2</sub>	41
	Ac-E-W-L-K-A-L-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-L-NH <sub>2</sub>	42
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	43
	Ac-E-W-F-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-NH <sub>2</sub>	44
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-NH <sub>2</sub>	45
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-NH <sub>2</sub>	46
	Ac-E-W-F-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-NH <sub>2</sub>	47
	Ac-D-F-L-K-A-W-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-W-NH <sub>2</sub>	48
	Ac-E-F-L-K-A-W-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-W-NH <sub>2</sub>	49
	Ac-D-F-W-K-A-W-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-W-W-NH <sub>2</sub>	50
	Ac-E-F-W-K-A-W-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-W-W-NH <sub>2</sub>	51

ES 2 438 779 T3

(continuación)

Nombre de péptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N.º
	Ac-D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	52
	Ac-D-K-W-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L-NH <sub>2</sub>	53
	Ac-E-K-L-K-A-F-Y-E-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	54
	Ac-E-K-W-K-A-V-Y-E-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L-NH <sub>2</sub>	55
	Ac-D-W-L-K-A-F-V-D-K-F-A-E-K-F-K-E-A-Y-NH <sub>2</sub>	56
	Ac-E-K-W-K-A-V-Y-E-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L-NH <sub>2</sub>	57
	Ac-D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F-NH <sub>2</sub>	58
	Ac-E-W-L-K-A-F-V-Y-E-K-V-F-K-L-K-E-F-F-NH <sub>2</sub>	59
	Ac-D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	60
	Ac-E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	61
	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	62
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-E-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	63
	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	64
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	65
	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F-NH <sub>2</sub>	66
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F-NH <sub>2</sub>	67
	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-R-V-A-E-R-L-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	68
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-E-R-V-A-E-R-L-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	69
	Ac-D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F-NH <sub>2</sub>	70
	Ac-E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F-NH <sub>2</sub>	71
	Ac-D-W-L-R-A-F-Y-D-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	72
	Ac-E-W-L-R-A-F-Y-E-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	73
	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-R-E-A-F-NH <sub>2</sub>	74
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-R-E-A-F-NH <sub>2</sub>	75
	Ac-D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	76
	Ac-E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F-NH <sub>2</sub>	77

(continuación)

Nombre de péptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N.º
	D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K- E-A-F- <u>P</u> -D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A- E-K-L-K-E-A-F	78
	D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K- E-F-F- <u>P</u> -D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A- E-K-L-K-E-F-F	79
	D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K- E-A-F- <u>P</u> -D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A- E-K-L-K-E-A-F	80
	D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-A-K- E-A-F- <u>P</u> -D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F- E-W-L-K-E-A-F	81
	D-K-W-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K- E-F-L- <u>P</u> -D-K-W-K-A-V-Y-D-K-F-A- E-A-F-K-E-F-L	82
	D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K- E-A-F- <u>P</u> -D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A- E-K-F-K-E-A-F	83
	D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K- E-F-F- <u>P</u> -D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V- F-K-L-K-E-F-F	84
	D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-A-E-K-F-K- E-F-F- <u>P</u> -D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-A- E-K-F-K-E-F-F	85

<sup>1</sup>Los engarces están subrayados.

Mientras que diversos péptidos de la Tabla 1, están ilustrados con un grupo acetilo que protege el extremo amino terminal y un grupo amido que protege el extremo carboxilo terminal, bien uno o bien ambos de estos grupos protectores se pueden eliminar y/o se pueden sustituir con otro grupo protector como se describe en el presente documento. Los péptidos pueden comprender uno o uno o más aminoácidos de la forma D como se describen en el presente documento. En ciertas realizaciones, cada aminoácido (por ejemplo, cada aminoácido enantiomérico) del péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la Tabla 1 D-W-F-K-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N.º: 7) es un aminoácido de forma D.

Otras modificaciones de los péptidos enumerados en Tabla 1 incluyen sustituciones conservadoras o semiconservadoras de los péptidos enumerados en el presente documento (por ejemplo, D reemplazado por E), extensiones, deleciones y similares. Ciertas modificaciones incluyen truncamientos de uno o más péptidos identificados por SEC ID N.ºs: 2-20 y 39-85 (solo la SEC ID N.º: 7 forma parte de la invención reivindicada). Así, por ejemplo, SEC ID N.º: 21 ilustra un péptido que comprende 14 aminoácidos a partir del extremo C-terminal de 18A que comprende uno o más aminoácidos, mientras que SEC ID N.º: 22-38 ilustra otros truncamientos. Los péptidos más largos pueden ser también adecuados. Tales péptidos más largos pueden formar enteramente una hélice anfipática de clase A, o la(s) hélice(s) anfipática(s) de clase A puede(n) formar uno o más dominios del péptido. Como se describe en el presente documento otras modificaciones pueden incluir versiones multiméricas de los péptidos. Así, por ejemplo, los péptidos ilustrados en Tabla 1 pueden acoplarse conjuntamente (directamente o a través de un engarce (*por ejemplo*, un engarce de carbono, o uno o más aminoácidos) con uno o más aminoácidos que intervienen). Los péptidos poliméricos ilustrativos (que no forman parte de la invención reivindicada) incluyen 18A-Pro-18A y los péptidos de SEC ID N.ºs: 79-85 comprenden preferentemente uno o más aminoácidos D, más preferentemente con cada aminoácido un aminoácido D como se describe en el presente documento y/o que tiene uno o ambos extremos protegidos.

Fue un descubrimiento sorprendente que, cuando los péptidos de clase A incorporaron al menos un aminoácido D ellos retuvieron su actividad y solo podrían administrarse oralmente. Además esta administración oral dio como resultado captación relativamente eficiente y semivida sérica significativa proporcionando por lo tanto un procedimiento eficaz de mitigar uno o más síntomas de aterosclerosis.

Usando la enseñanza proporcionada en el presente documento, alguien experto puede modificar los péptidos de clase A ilustrados para producir otros péptidos de clase A adecuados. Por ejemplo, pueden hacerse sustituciones conservadoras o semiconservadoras de rutina (*por ejemplo* E por D) de los aminoácidos existentes. El efecto de

diversas sustituciones en afinidad lipídica del péptido resultante se puede predecir usando el procedimiento computacional descrito por Palgunachari y col. (1996) *Atherosclerosis, Trombosis, & Vascular Biology* 16: 328-338. Los péptidos pueden alargarse o acortarse tanto como se preserve la estructura de  $\alpha$ -hélice de clase A. Además, se pueden hacer sustituciones para volver al péptido resultante más similar al/a los péptido(s) producidos endógenamente por las especies sujeto.

Como se describe en el presente documento, los péptidos pueden comprender formas "D" de los péptidos descritos en la Patente de los Estados Unidos 4.643.988, más preferentemente de las formas "D" que tienen uno o ambos extremos acoplados a grupos protectores. Tales péptidos incluyen péptidos que tienen la fórmula  $A_1$ - $B_1$ - $B_2$ - $C_1$ - $D$ - $B_3$ - $B_4$ - $A_2$ - $C_2$ - $B_5$ - $B_6$ - $A_3$ - $C_3$ - $B_7$ - $C_4$ - $A_4$ - $B_8$ - $B_9$  (SEC ID N.º: 86) en la que  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  y  $A_4$  son independientemente ácido aspártico o ácido glutámico u homólogos o análogos de los mismos;  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$ ,  $B_4$ ,  $B_5$ ,  $B_6$ ,  $B_7$ ,  $B_8$  y  $B_9$  son independientemente triptófano, fenilalanina, alanina, leucina, tirosina, isoleucina, valina o  $\alpha$ -naftilalanina, u homólogos o análogos de los mismos;  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$  o  $C_4$  son independientemente lisina o arginina, y D es serina, treonina, alanina, glicina, histidina, u homólogos o análogos de los mismos; siempre que, cuando  $A_1$  y  $A_2$  son ácido aspártico,  $A_3$  y  $A_4$  son ácido glutámico,  $B_2$  y  $B_9$  son leucina,  $B_3$  y  $B_7$  son fenilalanina,  $B_4$  es tirosina,  $B_5$  es valina,  $B_6$ ,  $B_8$ , y D son alanina, y  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$  y  $C_4$  son lisina,  $B_1$  no sea triptófano, en donde un aminoácido enantiomérico es un aminoácido de forma "D". Al menos el 50 % de los aminoácidos enantioméricos son de forma "D", más preferentemente al menos el 80 % de los aminoácidos enantioméricos son de forma "D" y más preferentemente al menos el 90 % o incluso todos los aminoácidos enantioméricos son aminoácidos de forma "D".

Mientras los péptidos pueden utilizar aminoácidos que se dan en la naturaleza o formas D de aminoácidos que se dan en la naturaleza, se contemplan también sustituciones con aminoácidos que no se dan en la naturaleza (*por ejemplo*, sulfóxido de metionina, metionina metilsulfonio, norleucina, ácido épsilon-aminocaproico, ácido 4-aminobutírico, ácido tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico, ácido 8-aminocaprílico, ácido 4-aminobutírico, Lys (N-(épsilon)-trifluoroacetilo), ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico y similares).

Además de los péptidos de clase A descritos en el presente documento, se contemplan también en el presente documento los peptidomiméticos. Los análogos peptídicos se usan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a aquellas del péptido plantilla. Estos tipos de compuesto no peptídico se llaman imitadores de péptidos o peptidomiméticos (Fauchere (1986) *Adv. Drug Res.* 15: 29; Veber y Feidinger (1985) *TINS* p. 392; y Evans y col. (1987) *J. Med. Chem.* 30: 1229) y se desarrollan usualmente con la ayuda de realización de modelos computerizados. Los imitadores de péptidos que son estructuralmente similares a los péptidos terapéuticamente útiles se pueden usar para producir un efecto terapéutico equivalente o un efecto profiláctico.

En general, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigmático (es decir, 5F descrito en el presente documento), pero tienen uno o más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por un enlace seleccionado del grupo que consiste en  $-\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{S}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2-$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-$  (cis y trans),  $-\text{COCH}_2-$ ,  $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{SO}-$ , *etc.* por procedimientos conocidos en la técnica y descritos adicionalmente en las siguientes referencias: Spatola (1983) p. 267 en *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York; Spatola (1983) *Vega Data* 1 (3) *Peptide Backbone Modifications* (revisión general); Morley (1980) *Trends Pharm Sci* páginas 463-468 (revisión general); Hudson y cols. (1979) *Int J Pept Prot Res* 14: 177-185 ( $-\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2-$ ); Spatola y col. (1986) *Life Sci.* 38: 1243-1249 ( $-\text{CH}_2\text{-S}$ ); Hann, (1982) *J Chem Soc Perkin Trans I* 307-314 ( $-\text{CH-CH-}$ , cis y trans); Almquist y col. (1980) *J Med Chem.* 23: 1392-1398 ( $-\text{COCH}_2-$ ); Jennings-White y col. (1982) *Tetrahedron Lett.* 23: 2533 ( $-\text{COCH}_2-$ ); Szelke M. y col., *Solicitud Europea EP 45665* (1982) CA: 97: 39405 (1982) ( $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ ); Holladay y col. (1983) *Tetrahedron Lett.* 24: 4401-4404 ( $-\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2-$ ); y Hruby (1982) *Life Sci.*, 31: 189-199 ( $-\text{CH}_2\text{-S-}$ )).

Un enlace no peptídico particularmente preferido es  $-\text{CH}_2\text{NH}-$ . Tales imitadores de péptidos pueden tener ventajas significativas sobre las realizaciones polipeptídicas, incluyendo, por ejemplo: producción más económica, estabilidad química mayor, propiedades farmacológicas potenciadas (semivida, absorción, potencia, eficacia, *etc.*), antigenicidad reducida y otras.

Además, las permutaciones circulares de los péptidos descritos en el presente documento o de los péptidos constreñidos (incluyendo péptidos ciclados) que comprenden una secuencia consenso o una variación de secuencias consenso sustancialmente idéntica se pueden generar por procedimiento conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch (1992) *Ann. Rev. Biochem.* 61: 387); por ejemplo, añadiendo residuos de cisteína internos capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

### Preparación peptídica.

Los péptidos usados como se describe en el presente documento se sintetizan químicamente usando técnicas de síntesis de péptidos químicas estándar o, en particular donde el péptido no comprende residuos de aminoácidos "D", se expresan recombinantemente. Donde los polipéptidos se expresan recombinantemente, un organismo huésped (por ejemplo, bacterias, planta, células fúngicas, *etc.*) se cultiva en un ambiente donde uno o más de los aminoácidos se proporcionan al organismo exclusivamente en una forma D. Los péptidos expresados recombinantemente en un sistema tal incorporan después esos aminoácidos D.

Los péptidos como se describen en el presente documento pueden estar sintetizados químicamente por cualquiera de un número de técnicas de síntesis de péptidos de fase fluida o de fase sólida conocidas por aquellos de habilidad en la técnica. La síntesis de fase sólida en la que el aminoácido C-terminal de la secuencia está unido a un soporte insoluble seguida por adición secuencial de los restantes aminoácidos en la secuencia en un procedimiento preferido para la síntesis química de los polipéptidos de la presente invención. Las técnicas para síntesis de fase sólida son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, por Barany y Merrifield (1963) Solid-Phase Peptide Synthesis; páginas 3-284 en The Peptides; Analysis, Synthesis, Biology. Vol. 2: Special Methods in Peptide Synthesis, Parte A; Merrifield y col. (1963) J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2156 y Stewart y col. (1984) Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª ed. Pierce Chem. Co., Rockford, Ill.

Los péptidos como se describen en el presente documento se pueden sintetizar por el procedimiento de síntesis peptídica en fase sólida usando una resina bencidrilamina (Beckman Bioproducts, 0,59 mmol de NH<sub>2</sub>/g de resina) como el soporte sólido. El aminoácido COOH terminal (*por ejemplo*, t-butilcarbonil-Phe) está unido a un soporte sólido a través de un grupo 4-(oximetil)fenilacetilo. Este es un enlace más estable que el enlace éster bencílico convencional, todavía el péptido finalizado puede escindirse aún por hidrogenación. Se usa para este propósito hidrogenación de transferencia usando ácido fórmico como el donador de hidrógenos. Se describen protocolos detallados usados para síntesis peptídica y para análisis de péptidos sintetizados en un suplemento por miniprinter que acompaña a Anantharamaiah (1985) J. Biol. Chem., 260 (16): 10248-10255.

Se destaca que en la síntesis química de péptidos, particularmente de péptidos que comprenden aminoácidos D, la síntesis produce usualmente un número de péptidos truncados además del producto de longitud total deseado. El procedimiento de purificación (*por ejemplo* HPLC) típicamente da como resultado la pérdida de una cantidad significativa del producto de longitud total.

Se descubrió que, en la síntesis de un péptido D (por ejemplo, D-4) con el fin de evitar pérdida en purificar la forma más larga alguien puede dializar y usar la mezcla y de este modo eliminar la última purificación de HPLC. Una mezcla tal pierde aproximadamente el 50 % de la potencia del producto altamente purificado (*por ejemplo*, por peso de proteína producida), pero la mezcla contiene aproximadamente 6 veces más péptidos y así la actividad total es mayor.

#### Aminoácidos en forma-D.

Los aminoácidos D se incorporan en una o más posiciones en el péptido simplemente usando un residuo de aminoácidos de forma-D derivatizados en la síntesis química. Los residuos de forma-D para la síntesis peptídica en fase sólida están comercialmente disponibles a partir de un número de suministradores (véase, por ejemplo Advanced Chem Tech., Louisville; Nova Biochem, San Diego; Sigma, San Luis, Bachern California Inc., Torrance, etc.). Los aminoácidos de forma-D pueden incorporarse en cualquier posición en el péptido según se desee. Así, por ejemplo, en un péptido como se describe en el presente documento, el péptido puede comprender un aminoácido-D individual, mientras que en otros péptidos como se describen en el presente documento, el péptido comprende al menos dos, generalmente al menos tres, más generalmente al menos cuatro, lo más generalmente al menos cinco, preferentemente al menos seis, más preferentemente al menos siete y lo más preferentemente al menos ocho aminoácidos D. En péptidos como se describen en el presente documento, esencialmente cada aminoácido distinto (enantiomérico) puede ser un aminoácido en forma-D. En ciertos péptidos al menos el 90 %, preferentemente al menos el 90 %, más preferentemente el 95 % de los aminoácidos enantioméricos son aminoácidos de forma-D. En un péptido como se describe en el presente documento, esencialmente cada aminoácido enantiomérico es un aminoácido de forma-D.

#### Grupos protectores.

Como se describe en el presente documento, el uno o más grupos -R en los aminoácidos constituyentes y/o los aminoácidos terminales pueden bloquearse con un grupo protector. Sin adherirnos a una teoría particular, se descubrió que el bloqueo, particularmente de los extremos amino terminal y/o carboxilo terminal de los péptidos sujeto de la presente invención mejora grandemente la administración oral e incrementa significativamente la semivida en suero.

Un amplio número de grupos protectores son adecuados para este propósito. Tales grupos incluyen, pero no se limitan a grupos acetilo, amida y alquilo con grupos acetilo y alquilo prefiriéndose particularmente para protección N-terminal y grupos amida prefiriéndose para protección carboxilo terminal. Los grupos protectores pueden incluir, pero no se limitan a cadenas de alquilo como en ácidos grasos, propionilo, formilo y otras. Los grupos protectores carboxilo particularmente preferidos pueden incluir amidas, ésteres y grupos protectores formadores de éteres. En un péptido descrito en el presente documento, se usa un grupo acetilo para proteger el extremo amino terminal y se usa un grupo amida para proteger el extremo carboxilo. Estos grupos bloqueantes potencian las tendencias formadoras de hélices de los péptidos. Ciertos grupos bloqueantes particularmente preferidos incluyen grupos alquilo de diversas longitudes, por ejemplo grupos que tienen la fórmula: CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CO- donde n varía desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20, preferentemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 16 o 18, más preferentemente desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 13 y lo más preferentemente desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 10.



Como se describe en el presente documento los grupos protectores pueden incluir, pero no se limitan a cadenas de alquilo como en ácidos grasos, propionilo, formilo y otras. Los grupos protectores carboxilo pueden incluir amidas, ésteres y grupos protectores formadores de éteres. En un péptido descrito en el presente documento, se usa un grupo acetilo para proteger el extremo aminoterminal y se usa un grupo amida para proteger el extremo carboxilo terminal. Estos grupos bloqueantes potencian las tendencias formadoras de hélices de los péptidos. Ciertos grupos bloqueantes particularmente preferidos incluyen grupos alquilo de diversas longitudes, por ejemplo grupos que tienen la fórmula:  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$  donde  $n$  varía desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 20, preferentemente desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 16, más preferentemente desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 13 y lo más preferente desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 10.

Otros grupos protectores incluyen, pero no se limitan a Fmoc, t-butoxicarbonilo (t-BOC), grupo 9-fluorenoacetilo, grupo 1-fluorenocarboxílico, grupo 9-fluorenocarboxílico, grupo 9-fluorenona-1-carboxílico, benciloxicarbonilo, Xantilo (Xan), Tritilo (Trt), 4-metiltritilo (Mtt), 4-metoxitritilo (Mmt), 4-metoxi-2,3,6-trimetil-bencenosulfonilo (Mtr), Mesitileno-2-sulfonilo (Mts), 4,4-dimetoxibencidrililo (Mbh), Tosilo (Tos), 2,2,5,7,8-pentametil-croman-6-sulfonilo (Pmc), 4-metilbencilo (MeBzl), 4-metoxibencilo (MeOBzl), Benciloxi (BzlO), Bencilo (Bzl), Benzoilo (Bz), 3-nitro-2-piridinasulfenilo (Npys), 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)etilo (Dde), 2,6-diclorobencilo (2,6-DiCl-Bzl), 2-clorobenciloxicarbonilo (2-Cl-Z), 2-bromobenciloxicarbonilo (2-Br-Z), benciloximetilo (Bom), ciclohexiloxi (cHxO), t-butoximetilo (Bum), t-butoxi (tBuO), t-Butilo (tBu), Acetilo (Ac) y Trifluoroacetilo (TFA).

Los grupos protectores/bloqueantes se conocen bien por aquellos expertos como que son procedimientos de acoplamiento de tales grupos al/a los residuo(s) apropiado(s) que comprenden los péptidos de la presente invención (véase, por ejemplo, Greene y col., (1991) Protective Groups in Organic Synthesis, 2ª edición, John Wiley & Sons, Inc. Somerset, N.J.). Por ejemplo, se llevó a cabo la acetilación durante la síntesis cuando el péptido está sobre la resina usando anhídrido acético. La protección de amidas se puede lograr por la selección de una resina apropiada para la síntesis. Durante la síntesis de los péptidos descritos en el presente documento en los ejemplos, se usó resina de amida de pista de patinaje. Después de la finalización de la síntesis, los grupos protectores semipermanentes en aminoácidos bifuncionales ácidos tales como Asp y Glu y el aminoácido básico Lys, hidroxilo de Tyr se retiran todos simultáneamente. Los péptidos liberados de una resina tal usando tratamiento ácido salen con el N-terminal protegido como acetilo y con el grupo carboxilo protegido como  $\text{NH}_2$  y con la eliminación simultánea de todos los otros grupos protectores.

#### V. Mejora de la captación de péptidos.

Fue también un descubrimiento sorprendente que cuando todos los péptidos de aminoácidos L se administran en conjunto con la forma-D la captación del péptido de la forma-D se incrementa. Así, las combinaciones de péptidos de forma D y de forma L se pueden usar en los procedimientos de la invención. El péptido de la forma-D y el péptido de la forma-L pueden tener diferentes secuencias de aminoácidos, sin embargo, ambos pueden tener secuencias de aminoácidos de péptidos descritos en el presente documento, y pueden tener la misma secuencia de aminoácidos.

Se descubrió también que los concatámeros de péptidos de hélice anfipática de clase A descritos en el presente documento son también efectivos en mitigar uno o más síntomas de aterosclerosis. Los monómeros que comprenden los concatámeros se pueden acoplar directamente conjuntamente o pueden unirse por un engarce. Los engarces ilustrativos incluyen, pero no están limitados a, un engarce aminoacídico (por ejemplo, una prolina) o un engarce peptídico (por ejemplo  $\text{Gly}_4\text{Ser}_3$ ). Los concatámeros ilustrativos incluyen un 2-mero, más preferentemente un 3-mero, aún más preferentemente un 4-mero y lo más preferentemente 5-mero, 8-mero, o 10-mero.

#### VI. Formulaciones farmacéuticas.

Con el fin de llevar a cabo diversos procedimientos que implican péptidos como se describen en el presente documento, se administran uno o más péptidos o imitadores de péptidos, *por ejemplo* a un individuo diagnosticado como que tiene uno o más síntomas de aterosclerosis, o que esté en riesgo de aterosclerosis. Los péptidos o imitadores de péptidos se pueden administrar en la forma "nativa" o, si se desea, en la forma de sales, ésteres, amidas, profármacos, derivados y similares, siempre y cuando la sal, el éster, la amida, el profármaco o el derivado sea adecuado farmacológicamente, *es decir*, efectivo en el presente procedimiento. Las sales, ésteres, amidas, profármacos y otros derivados de los agentes activos se pueden preparar usando procedimientos estándar conocidos por aquellos expertos en la técnica de química orgánica de síntesis y descritos, por ejemplo, por March (1992) Advanced Organic Chemistry; Reactions, Mechanism an Structure, 4ª Edición, N.Y. Wiley-Interscience.

Por ejemplo, las sales de adición de ácidos se preparan a partir de la base libre usando metodología convencional, que implica típicamente reacción con un ácido adecuado. Generalmente, la forma base del fármaco se disuelve en un disolvente orgánico polar tal como metanol o etanol y el ácido se añade a la misma. La sal resultante bien precipita o bien puede llevarse fuera de la solución por adición de un disolvente menos polar. Los ácidos adecuados para preparar sales de acción ácida incluyen tanto ácidos orgánicos, *por ejemplo*, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinnámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares, así como ácidos

inorgánicos, *por ejemplo*, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. Una sal de adición de ácidos se puede reconvertir a la base libre por tratamiento con una base adecuada. Las sales de adición de ácidos particularmente preferidas de los agentes activos en el presente documento son sales de haluros, tal como se pueden preparar usando ácidos clorhídrico o bromhídrico. En cambio, la preparación de sales básicas de los péptidos o imitadores se preparan en una manera similar usando una base farmacéuticamente aceptable tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio, trimetilamina, o similares. Las sales básicas particularmente preferidas incluyan sales de metales alcalinos, *por ejemplo*, la sal de sodio y las sales de cobre.

La preparación de ésteres implica típicamente funcionalización de grupos hidroxilo y/o grupos carboxilo que pueden estar presentes en la estructura molecular del fármaco. Los ésteres son típicamente derivados acil-sustituidos de los grupos alcohol libres, *es decir*, restos que se derivan de ácidos carboxílicos de la fórmula RCOOH donde R es alquilo y preferentemente es alquilo inferior. Los ésteres se pueden reconvertir a los ácidos libres, si se desea, usando procedimientos de hidrogenólisis o de hidrólisis convencionales.

Se pueden preparar también amidas y profármacos usando técnicas conocidas por aquellos expertos en la técnica o descritas en la bibliografía pertinente. Por ejemplo, las amidas pueden prepararse a partir de ésteres, usando reaccionantes amina adecuados, o pueden prepararse a partir de un anhídrido de cloro o un ácido de cloro por reacción con amoniaco o una amina de alquilo inferior. Los profármacos se preparan típicamente por unión covalente de un resto que da como resultado un compuesto que es terapéuticamente inactivo hasta que se modificó por un sistema metabólico del individuo.

Los péptidos identificados en la patente son útiles para administración parenteral, tópica, oral, nasal (o inhalada de otra manera), rectal, o local, tal como por aerosol o transdérmicamente, para tratamiento profiláctico y/o terapéutico de aterosclerosis y/o síntomas de la misma. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en una diversidad de formas de dosificación unitaria dependiendo del procedimiento de administración. Las formas de dosificación unitaria incluyen, pero no se limitan a polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, pastillas, supositorios, parches, pulverizadores nasales, inyectables, formulaciones de liberación sostenida implantables, complejos lipídicos, *etc.*

Los péptidos como se describen en el presente documento se combinan típicamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable (excipiente) para formar una composición farmacéutica. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden contener uno o más compuesto(s) fisiológicamente aceptable(s) que actúan, por ejemplo, para estabilizar la composición o para incrementar o disminuir la absorción del/de los agente(s) activo(s). Los compuestos fisiológicamente aceptables pueden incluir, por ejemplo, carbohidratos, tales como glucosa, sacarosa, o dextranos, antioxidantes, tales como ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular, potenciadores de protección y de captación tales como lípidos, composiciones que reducen la eliminación o la hidrólisis de los agentes activos, o excipientes u otros estabilizadores y/o tampones.

Otros compuestos fisiológicamente aceptables incluyen agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes dispersantes o conservantes que son particularmente útiles para evitar el crecimiento o acción de los microorganismos. Diversos conservantes se conocen bien, e incluyen, por ejemplo, fenol y ácido ascórbico. Alguien de habilidad en la técnica apreciaría que la elección de vehículo(s) farmacéuticamente aceptable(s), incluyendo un compuesto fisiológicamente aceptable depende, por ejemplo, de la vía de administración del/de los agente(s) activo(s) y de las características fisicoquímicas del/de los agente(s) activo(s).

Los excipientes son preferentemente estériles y están generalmente libres de materia indeseable. Estas composiciones pueden esterilizarse por técnicas de esterilización bien conocidas, convencionales.

En aplicaciones terapéuticas, las composiciones como se describen en el presente documento se administran a un paciente que sufre de uno o más síntomas de aterosclerosis o en riesgo de aterosclerosis en una cantidad suficiente para curar o al menos evitar o detener parcialmente la enfermedad y/o sus complicaciones. Una cantidad adecuada para llevar a cabo esto se define como una "dosis terapéuticamente efectiva". Las cantidades efectivas para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general de la salud del paciente. Las administraciones únicas o múltiples de las composiciones se pueden administrar dependiendo de la dosificación y frecuencia con que se requieren y toleran por el paciente. En cualquier evento, la composición proporcionará una cantidad suficiente de los agentes activos de las formulaciones de la presente invención para tratar (mejorar uno o más síntomas) de forma efectiva al paciente.

La concentración de péptido puede variar ampliamente y se seleccionará principalmente en base a volúmenes de fluido, viscosidades, peso corporal y similares de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado y con las necesidades del paciente. Las concentraciones, sin embargo, se seleccionarán típicamente para proporcionar dosificaciones que varían desde aproximadamente 0,1 o 1 mg/kg/día hasta aproximadamente 50 mg/kg/día y algunas veces más altas. Las dosificaciones típicas varían desde aproximadamente 3 mg/kg/día hasta aproximadamente 3,5 mg/kg/día, preferentemente desde aproximadamente 3,5 mg/kg/día hasta aproximadamente 7,2 mg/kg/día, más preferentemente desde aproximadamente 7,2 mg/kg/día hasta aproximadamente 11,0 mg/kg/día y lo más preferentemente desde aproximadamente 10 mg/kg/día hasta aproximadamente 15 mg/kg/día. En ciertas

realizaciones preferidas, las dosificaciones variarán desde aproximadamente 10 mg/kg/día a aproximadamente 50 mg/kg/día. Se apreciará que tales dosificaciones pueden variarse para optimizar un régimen terapéutico en un sujeto o grupo de sujetos particular.

5 Los péptidos como se describen en el presente documento pueden administrarse oralmente (por ejemplo por medio de un comprimido) o como un inyectable de acuerdo con procedimientos estándar bien conocidos por aquellos de habilidad en la técnica. Los péptidos, pueden administrarse también a través de la piel usando sistemas de administración de fármacos transdérmicos convencionales, *es decir*, “parches” transdérmicos en los que el/los agente(s) activo(s) está(n) contenido(s) típicamente en una estructura laminada que sirve como un dispositivo de administración de fármacos para fijarse a la piel. En una estructura tal, la composición de fármacos está típicamente  
10 contenida en una capa, o “reservorio”, que subyace a una capa de respaldo superior. Se apreciará que el término “reservorio” en este contexto se refiere a una cantidad de “ingrediente(s) activo(s)” que a la larga está disponible para administración a la superficie de la piel. Así, por ejemplo, el “reservorio” puede incluir el/los ingrediente(s) activo(s) en un adhesivo en una capa de respaldo del parche, o en cualquiera de una diversidad de diferentes formulaciones de matriz conocidas por aquellos de habilidad en la técnica. El parche puede contener un reservorio  
15 único, o puede contener múltiples reservorios.

El reservorio puede comprender una matriz polimérica de un material adhesivo de contacto farmacéuticamente aceptable que sirve para fijar el sistema a la piel durante la administración de fármaco. Ejemplos de materiales adhesivos de contacto con la piel adecuados incluyen, pero no se limitan a, polietilenos, polisiloxanos, poliisobutilenos, poliacrilatos, poliuretanos y similares. Alternativamente, el reservorio que contiene fármacos y el adhesivo en contacto con la piel están presentes como capas separadas y distintas, con el adhesivo subyaciendo al reservorio que, en este caso, puede ser bien una matriz polimérica como se describe anteriormente, o bien puede ser un reservorio de líquido o de hidrogel, o bien puede tomar alguna otra forma. La capa de respaldo en estos laminados, que sirve como la superficie superior del dispositivo, funciona preferentemente como un elemento estructural primario del “parche” y proporciona el dispositivo con mucha de su flexibilidad. El material seleccionado para la capa de respaldo es preferentemente sustancialmente impermeable al/a los agente(s) activo(s) y a cualesquiera otros materiales que estén presentes.  
20  
25

Otras formulaciones para la administración de fármacos tópica incluyen, pero no se limitan a, pomadas y cremas. Las pomadas son preparaciones semisólidas que están basadas típicamente en petrolato o en otros derivados del petróleo. Las cremas que contienen el agente activo seleccionado, son típicamente emulsiones de líquidos viscosos o semisólidas, a menudo bien de aceite-en-agua o bien de agua-en-aceite. Las bases de crema son típicamente lavables en agua y contienen una fase aceitosa, un emulsionante y una fase acuosa. La fase aceitosa, también llamada algunas veces la fase “interna”, está compuesta generalmente de petrolato y de un alcohol graso tal como alcohol cetílico o alcohol estearílico; la fase acuosa usualmente, aunque no necesariamente, excede a la fase aceitosa en volumen y contiene generalmente un humectante. El emulsionante en una formulación de crema es generalmente un tensioactivo no iónico, aniónico, catiónico o anfótero. La pomada específica o la crema base a usarse, como se apreciará por aquellos expertos en la técnica, es una que proporcionará administración de fármaco óptima. Como con otros transportadores o vehículos, una base de pomada sería inerte, estable, no irritante y no sensibilizante.  
30  
35

A diferencia de las típicas formulaciones de péptidos, los péptidos como se describen en el presente documento que comprenden aminoácidos en forma-D se pueden administrar, incluso oralmente, sin protección contra proteólisis por ácido estomacal, *etc.* Sin embargo, la administración peptídica puede potenciarse por el uso de excipientes protectores. Esto se lleva a cabo típicamente bien acomplejando el polipéptido con una composición para volverle resistente a hidrólisis ácida y enzimática o bien envolviendo el polipéptido en un vehículo apropiadamente resistente tal como un liposoma. Los medios de proteger polipéptidos para administración oral se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Patente de los EE.UU. 5.391.377 que describe composiciones lipídicas para administración oral de agentes terapéuticos).  
40  
45

La semivida elevada en suero se puede mantener por el uso de sistemas “que envuelven” proteicos de liberación mantenida. Tales sistemas de liberación mantenida se conocen bien por aquellos de habilidad en la técnica. En una realización como se describe en el presente documento, el sistema de administración de microesferas biodegradables ProLease para proteínas y péptidos (Tracy (1998) Biotechnol. Prog. 14: 108; Johnson y col. (1996), Nature Med. 2: 795; Herbert y col. (1998), Pharmaceut. Res. 15, 357) un polvo seco compuesto de microesferas poliméricas biodegradables que contienen la proteína en una matriz polimérica que puede estar compuesta como una formulación seca con o sin otros agentes.  
50

El procedimiento de fabricación de microesferas ProLease se diseñó específicamente para lograr una eficacia de encapsulación de proteínas alta manteniendo mientras la integridad de las proteínas. El procedimiento consiste en (i) preparación de partículas proteicas secadas por congelación a partir de la mayor parte de las proteínas secando por congelación por pulverización la solución de fármaco con excipientes estabilizadores, (ii) preparación de una suspensión polimérica de fármacos seguida por sonicación u homogeneización para reducir el tamaño de partícula de fármaco, (iii) producción de microesferas de polímero de fármacos congeladas por atomización en nitrógeno líquido, (iv) extracción del disolvente polimérico con etanol y (v) filtración y secado al vacío para producir el producto en polvo seco final. El polvo resultante contiene la forma sólida de la proteína, que está homogéneamente y  
55  
60

rígidamente dispersa en partículas poliméricas porosas. El polímero más comúnmente usado en el procedimiento, poli(láctido-co-glicólido) (PLG), es tanto biocompatible como biodegradable.

5 La encapsulación puede lograrse a temperaturas bajas (*por ejemplo*, -40°C). Durante la encapsulación, la proteína se mantiene en el estado sólido en la ausencia de agua, minimizando así la movilidad conformacional inducida por agua de la proteína, previniendo reacciones de degradación de proteínas que incluyen agua como un reactivo y evitando las interfases orgánica-acuosa donde las proteínas pueden sufrir desnaturalización. Un procedimiento preferido usa disolventes en los que la mayoría de las proteínas son insolubles, proporcionando así eficiencias de encapsulación altas (*por ejemplo*, mayores del 95 %).

10 Uno o más componentes de la solución se pueden proporcionar como un "concentrado", *por ejemplo*, en un recipiente de almacenamiento (*por ejemplo*, en un volumen pre-medido) listo para disolución, o en una cápsula soluble lista para adición a un volumen de agua.

Las siguientes formulaciones y procedimientos de administración se desean para ser ilustrativas y no limitantes. Se apreciará que, usando la enseñanza proporcionada en el presente documento, se pueden concebir fácilmente otras formulaciones y modos de administración adecuados.

### 15 VII. Formulaciones basadas en lípidos.

Como se describe en el presente documento, los péptidos se administran conjuntamente con uno o más lípidos. Los lípidos se pueden formular como un excipiente para proteger y/o potenciar el transporte/la captación de los péptidos o se pueden administrar por separado.

20 Sin adherirse a una teoría en particular, se descubrió que la administración (*por ejemplo*, administración oral) de ciertos fosfolípidos puede incrementar significativamente las proporciones de HDL/LDL. Además, se cree que ciertos fosfolípidos de longitud media se transportan por un procedimiento diferente del que está implicado en transporte lipídico general. Así, la coadministración de ciertos fosfolípidos de longitud media con los péptidos de la presente invención confiere un número de ventajas: protege a los fosfolípidos de digestión o hidrólisis, mejoran la captación de péptidos y mejoran las proporciones de HDL/LDL.

25 Los lípidos se pueden formar en liposomas para encapsular los polipéptidos de esta invención y/o pueden simplemente complejarse/mezclarse con los polipéptidos. Los procedimientos para fabricar liposomas y encapsular reactivos se conocen bien por aquellos expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Martin y Papahadjopoulos (1982) J. Biol. Chem., 257: 286-288; Papahadjopoulos y col. (1991) Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU., 88: 11460-11464; Huang y col. (1992) Cancer Res., 52: 6774-6781; Lasic y col. (1992) FEBS Lett., 312: 255-258 y similares).

30 Los fosfolípidos preferidos para su uso en estos procedimientos tienen ácidos grasos que varían de aproximadamente 4 carbonos a aproximadamente 24 carbonos en las posiciones sn-1 y sn-2. En ciertas realizaciones preferidas, los ácidos grasos están saturados. En otras realizaciones preferidas, los ácidos grasos pueden estar insaturados. Diversos ácidos grasos preferidos se ilustran en la Tabla 2.

35 Tabla 2. Ácidos grasos preferidos en la posición sn-1 y/o en la posición sn-2 de los fosfolípidos preferidos para administración de polipéptidos D.

Número de Átomos de Carbono	Nombre Común	Nombre de la IUPAC
3:0	Propionilo	Trianoico
4:0	Butanoilo	Tetranoico
5:0	Pentanoilo	Pentanoico
6:0	Caproilo	Hexanoico
7:0	Heptanoilo	Heptanoico
8:0	Capriloilo	Octanoico
9:0	Nonanoilo	Nonanoico
10:0	Caprilo	Decanoico
11:0	Undecanoilo	Undecanoico
12:0	Lauroilo	Dodecanoico
13:0	Tridecanoilo	Tridecanoico

(continuación)

Número de Átomos de Carbono	Nombre Común	Nombre de la IUPAC
14:0	Miristoilo	Tetradecanoico
15:0	Pentadecanoilo	Pentadecanoico
16:0	Palmitoilo	Hexadecanoico
17:0	Heptadecanoilo	Heptadecanoico
18:0	Estearoilo	Octadecanoico
19:0	Nonadecanoilo	Nonadecanoico
20:0	Araquidoilo	Eicosanoico
21:0	Henicosanoilo	Henicosanoico
22:0	Behenoilo	Docosanoico
23:0	Trucisanoilo	Trocossanoico
24:0	Lignoceroilo	Tetracosanoico
14:1	Miristoleoilo (9-cis)	
14:1	Miristealdoilo (9-trans)	
16:1	Palmitoleoilo (9-cis)	
16:1	Palmiteaidoilo (9-trans)	

Los ácidos grasos en estas posiciones pueden ser el mismo o diferentes. Fosfolípidos particularmente preferidos tienen fosforilcolina en la posición sn-3.

### VIII. Agentes activos farmacológicamente adicionales.

5 Agentes activos farmacológicamente adicionales se pueden administrar junto con los agentes activos primarios, *por ejemplo*, los péptidos como se describen en el presente documento. Tales agentes pueden incluir, pero no están limitados a agentes que reducen el riesgo de eventos ateroscleróticos y/o complicaciones de los mismos. Tales agentes incluyen, están limitados a beta bloqueantes, combinaciones de beta bloqueantes y de diuréticos de tiazida, estatinas, aspirina, inhibidores de ace, inhibidores de receptores de ace (ARB) y similares.

10 Los beta bloqueantes adecuados incluyen, pero no están limitados a cardioselectivos (beta 1 bloqueantes selectivos), *por ejemplo* acebutolol (Sectral™), atenolol (Tenormin™), betaxolol (Kerlone™), bisoprolol (Zebeta™), metoprolol (Lopressor™) y similares. Bloqueantes no selectivos adecuados (bloquean igualmente beta 1 y beta 2) incluyen, pero no se limitan a carteolol (Cartrol™), nadolol (Codgard™), penbutolol (Levitol™), pindolol (Visken™), propranolol (Inderal™), timolol (Blockadren™), labetalol (Normodyne™, Trandate™) y similares.

15 Combinaciones de diuréticos de tiazida con beta bloqueantes adecuados incluyen, pero no se limitan a Lopressor HCT, ZIAC, Tenoretic, Corzide, Imolide, Inderal LA 40/25, Inderide, Normozide y similares.

Las estatinas adecuadas incluyen, pero no se limitan a pravastatina (Pravachol/Bristol-Myers Squibb), simvastatina (Zocor/Merk), lovastatina (Mevacor/Merk) y similares.

20 Los inhibidores de ace adecuados incluyen, pero no se limitan a captoprilo (*por ejemplo*, Capoten™ por Squibb), benazeprilo (*por ejemplo* Lotensina™ por Novartis), enalaprilo (*por ejemplo*, Vasotec™ por Merck), fosinoprilo (*por ejemplo*, Monopril™ por Bristol-Myers), lisinoprilo (*por ejemplo* Privilinil™ por Merk o Zestril™ por Astra-Zeneca), quinaprilo (*por ejemplo* Accupril™ por Parke-Davis), ramiprilo (*por ejemplo*, Altace™ por Hoechst Marion Roussel, King Pharmaceuticals), imidaprilo, erbumina de perindoprilo (*por ejemplo*, Aceon™ por Rhone-Polenc Rorer), trandolaprilo (*por ejemplo*, Mavik™ por Knoll Pharmaceutical) y similares. ARB adecuados (Bloqueantes de Receptor de Ace) incluyen pero no se limitan a losartán (*por ejemplo* Coozar™ por Merk), irbesartán (*por ejemplo*, Avapro™ por Sanofi), candesartán (*por ejemplo*, Atacand™ por Astra Merck), valsartán (*por ejemplo*, Diovan™ por Novartis) y similares.

25

### IX. Kits para la mejora de uno o más síntomas de aterosclerosis.

Como se describe en el presente documento, el/los péptido(s) se pueden proporcionar en kits para la mejora de uno

o más síntomas de aterosclerosis o para el tratamiento profiláctico de un sujeto (humano o animal) en riesgo de aterosclerosis. Los kits pueden comprender un recipiente que contenga uno o más de los péptidos como se describen en el presente documento. El péptido se puede proporcionar en una formulación de dosificación unitaria (por ejemplo supositorio, comprimido, comprimido ovalado, parche, etc.) y/o puede estar opcionalmente combinado con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

El kit puede, opcionalmente, comprender adicionalmente uno o más agentes usados en el tratamiento de enfermedad cardíaca y/o de aterosclerosis. Tales agentes incluyen, pero no se limitan a, beta bloqueantes, vasodilatadores, aspirina, estatinas, inhibidores de ace o inhibidores de receptor de ace (ARB) y similares, por ejemplo como se describe anteriormente.

Además, los kits incluyen opcionalmente materiales de etiquetado y/o de instrucciones que proporcionan indicaciones (es decir protocolos) para la práctica de los procedimientos o para uso de los "productos terapéuticos" o de los "productos profilácticos" de esta invención. Los materiales de instrucciones preferidos describen el uso de uno o más polipéptidos de esta invención para mitigar uno o más síntomas de aterosclerosis y/o para evitar la aparición o el incremento de uno o más de tales síntomas en un individuo en riesgo de aterosclerosis. Los materiales de instrucciones pueden también, opcionalmente, enseñar las dosificaciones/el régimen terapéutico preferidos, contraindicaciones y similares.

Mientras que los materiales de instrucciones comprenden típicamente materiales escritos o impresos no están limitados a tales. Cualquier procedimiento capaz de almacenar tales instrucciones y comunicarlas a un usuario final está contemplado en la presente invención. Tales medios incluyen, pero no están limitados a medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM) y similares. Tales medios pueden incluir direcciones a sitios de Internet que proporcionan tales materiales de instrucciones.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no limitan la invención reivindicada.

#### Ejemplo comparativo 1

Varios análogos de péptidos de clase A sintéticos han mostrado imitar muchas de las propiedades de apo A-I humana *in vitro*. En este ejemplo, un péptido nuevo (5F) con anfipaticidad incrementada, se dio por inyección intraperitoneal, 20 µg/diariamente, durante 16 semanas a ratones C57BL/6J alimentados con dieta aterogénica. Se dieron inyecciones de apo A-I de ratón (MoAI) (50 µg/diariamente) o de tampón fosfato salino a otros ratones como controles. Los niveles de colesterol en plasma totales y los perfiles de lipoproteínas no fueron significativamente diferentes entre el grupo tratado y los grupos control salvo porque los ratones que recibieron 5F o MoAI tuvieron más bajo lipoproteína de alta densidad (HDL)-colesterol cuando se calculó como un porcentaje de todo el colesterol. No se observó ninguna toxicidad o producción de anticuerpos para los materiales inyectados. Cuando LDL se tomó de animales inyectados con 5F y se presentó a células de la pared arterial humana *in vitro* produjo menos hidroperóxidos de lípidos y menos actividad quimiotáctica inducida por LDL que la LDL tomada de controles. Adicionalmente, cuando se tomó HDL de ratones inyectados con 5F y se presentó a las células de la pared arterial humana *in vitro* conjuntamente con LDL humana, hubo sustancialmente menos hidroperóxidos de lípidos formados y sustancialmente menos actividad quimiotáctica monocítica inducida por LDL. Los ratones que recibieron péptido 5F tuvieron significativamente menos área de lesión aterosclerótica aórtica comparados con los ratones que recibieron PBS. El área de lesión en ratones que recibieron MoAI fue similar a aquella de los animales inyectados con PBS. Los inventores concluyen que 5F puede tener potencial en la prevención y el tratamiento de aterosclerosis.

### Materiales y procedimientos

#### Péptidos

Se sintetizó péptido 5F (Ac-18A[Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu Phe Phe]-NH<sub>2</sub>) por síntesis de péptidos en fase sólida (véase, por ejemplo, Anantharamaiah y Garber (1996) Meth. Enzymol. 263: 267-282; Palgunachari y col. (1996) Arteriosclerosis, Trombosis & Vascular Biology 16: 328-338). La pureza del péptido sintético se estableció por HPLC analítica y espectrometría de masas de pulverización de iones. El péptido se dializó frente a agua destilada y liofilizada antes de su uso.

Se aisló MoAI a partir del plasma de ratones C57BL/J6 (el plasma de EDTA se compró de Harlan Bioproducts for Science, Indianápolis, IN). MoAI se aisló usando una combinación de cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía en columna en fase reversa. Brevemente, la densidad de plasma se ajustó a 1,21 g/ml por adición de KBr y se centrifugó a 50.000 rpm durante 24 horas a 4°C (rotor Ti70, Beckman, Fullerton, CA). La fracción superior se recogió, se dializó frente a agua eliminando KBr, se liofilizó y se deslipidó. El sedimento se disolvió en solución Gn:DTT:Tris (guanidina HCl 3 M, ditiotreitol 1 mM y Tris 10 mM; pH = 8,0), después se dializó frente a la misma solución usando tubos de diálisis de límite de 12.000 Mw con el fin de retirar mucho de la apo A-II y de las apolipoproteínas C de la muestra. La muestra se dializó después frente a agua y se liofilizó. El sedimento se disolvió en solución Gn:DTT:Tris recién preparada y las proteínas se separaron por cromatografía en columna de exclusión

por tamaño, usando una columna XK26/100 (2,6 X 100 cm) envasada con Superosa 12 de fase de bulto (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) equilibrada con solución Gn:DTT:Tris. La velocidad de flujo fue 0,5 ml/minuto y se recogieron fracciones de 2,5 ml. Las fracciones que corresponden al pico apo A-I se analizaron por SDS-PAGE y se purificaron adicionalmente por HPLC de fase reversa C-18 preparativa (Anantharamaiah y Garber (1996) Meth. Enzymol. 263: 267-282).

### Ratones

Todos los experimentos se llevaron a cabo usando ratones C57BL/6J hembra (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Los ratones se adquirieron a las seis semanas de edad y los estudios de la dieta se empezaron con ratones a las ocho semanas de edad. Se usaron ratones que pesaban de 10 a 22 gramos en los estudios de renovación. Todos los estudios en animales se revisaron como posibilidad y se aprobaron por la Comisión de Cuidado y Uso de Animales Institucional de la Universidad de Alabama en Birmingham.

### Estudios cinéticos-

El péptido 5F, MoAI y la apo-I humana se marcaron con <sup>125</sup>I por el procedimiento de Bilheimer y col. (1972) Biochim. Biophys. Acta 260: 212-221. Los ratones se pusieron a una dieta aterogénica de Thomas-Hartroft modificada (#TD88051; Teklad, Madison, WI) durante cuatro semanas tiempo al que se empezaron inyecciones intraperitoneales diarias de péptido o proteína disuelta en 200 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los animales inyectados con MoAI o apo A-I humana recibieron 50 µg por animal; aquellos inyectados con 5F recibieron 20 µg. Los animales no se sometieron a ayuno para los estudios cinéticos y las muestras de sangre se tomaron con anestesia con xilazina-ketamina desde el seno retroorbital a 15, 30 y 45 minutos y 1, 1,5, 2, 3, 4, 68, 12 y 24 horas tras la inyección. Cada animal proporcionó tres muestras de sangre a diferentes puntos temporales (todas retroorbitales y en ojos alternos) y se recogieron al menos tres muestras (a partir de animales diferentes) a cada punto temporal. Las muestras se recogieron en tubos capilares heparinizados, después se situaron en tubos de microcentrifuga, el plasma se separó por centrifugación. Se tomaron alícuotas de 10 µl duplicadas de cada muestra para determinación de radioactividad, usando cuenta de gamma (Cobra; Packard Instruments, Downers Grove, IL) durante 10 minutos por muestra. El volumen de plasma total se calculó como 4,2 % de peso corporal. Cada muestra se expresa como porcentaje de CPM inyectada en plasma total. El <sup>125</sup>I libre se determinó por precipitación de ácido tricloroacético (TCA) (1 ml de TCA al 10 % por 10 µl de muestra de plasma). Se hizo ajuste al modelo cinético usando todos los puntos de datos, más que los promedios en cada punto temporal (PKAnalyst, MicroMath Scientific Software, Salt Lake City, UT).

### Protocolo de inyección y recogida de muestras para estudios de lesión-

Los ratones se adquirieron a las seis semanas de edad y se asignaron al azar en grupos de 20, salvo porque un grupo control negativo de 10 no recibió ningún tratamiento y se le dio pienso de roedores estándar. A las ocho semanas de edad, los grupos de tratamiento se pusieron a una dieta aterogénica de Thomas-Hartroft modificada (#TD88051; Teklad, Madison, WI) y se comenzaron las inyecciones. La dieta se mantuvo a 4°C y se usó durante no más de tres meses después de la fecha de elaboración con el fin de minimizar la oxidación de lípidos. Los animales se inyectaron intraperitonealmente diariamente durante 16 semanas, incluyendo fines de semana y vacaciones. Veinte ratones en cada grupo recibieron inyecciones diarias de 200 µl de PBS (como controles positivos), o de 20 µg de 5F en 200 µl de PBS, o 50 µg de MoAI en 200 µl de PBS.

Se preparó péptido 5F liofilizado en viales, conteniendo cada botella suficiente péptido para inyección de un día. El péptido 5F se liofilizó en PBS y se disolvió en agua Mili-Q autoclavada (Millipore Corp., Bedford, MA) en el día de la inyección. El volumen de inyección para todos los grupos se mantuvo a 200 µl/ratón por grupo de animales.

Se tomaron muestras de sangre con anestesia por sangrado reto-orbital en la entrada al estudio (antes de la dieta) y al tiempo de la recogida de órganos. Al final del estudio (semana 16), en el último sangrado, se escindieron el corazón y el hígado. Los corazones se mantuvieron en solución salina al 0,9 % durante aproximadamente 1 hora eliminando sangre y permitiendo relajar el músculo cardíaco. Se fijaron después en formaldehído tamponado con fosfato al 4 % durante al menos una semana hasta que se seccionaron. Los hígados se retiraron y se pesaron.

### Evaluación histológica-

Se llevaron a cabo evaluaciones histológicas de acuerdo con el procedimiento de Paigen y col. (Paigen y col. (1990) Atherosclerosis 10: 316-323) con algunas modificaciones. Brevemente, los corazones se fijaron durante al menos una semana en la solución de formaldehído tamponada con fosfato. Después de retirar los 2/3 inferiores de los corazones, el tejido que queda se congeló en medio OCT (Tissue-Tek, Miles Inc., Elkhart, IN) y se seccionó en un criostato a -20°C. Se guardaron en portaobjetos secciones de 20 µm alternas y se observaron por el comienzo de la raíz aórtica. Las secciones se recogieron después para unos 600 µm adicionales, o hasta que la sección transversal aórtica se terminó y las cúspides de la válvula no fueron evidentes más tiempo. Los portaobjetos se tiñeron con Tintura de Sudán y se contratificaron con hematoxilina. Las áreas transversales de lesión teñidas se midieron en portaobjetos consecutivos separados 80 µm por análisis de imagen (SigmaScan Pro, SPS Scientific, Chicago, IL) y el área de lesión promedio se determinó para cada seno aórtico a lo largo de los 400 µm de longitud (cinco portaobjetos) proporcionando el área de lesión promedio más grande.

**Cocultivos, aislamiento monocítico, aislamiento de lipoproteínas, determinación de hidroperóxidos lipídicos y actividad quimiotáctica monocítica-**

Se llevaron a cabo cocultivos de células de la pared arterial humana, aislamiento de monocitos, aislamiento de lipoproteínas por ultracentrifugación a partir del plasma de donantes humanos normales o a partir de plasma de ratón por FPLC y se llevaron a cabo determinación de hidroperóxidos lipídicos y actividad quimiotáctica monocítica de acuerdo con procedimientos estándar. Toda la participación de sujetos humanos fue con consentimiento informado aprobado por el UCLA Human Subjects Protection Comitee. El protocolo para realizar pruebas con las lipoproteínas de ratón en el cocultivo se llevó a cabo también como sigue: brevemente, se aislaron LDL y HDL por FPLC de plasma de ratón de ratones alimentados con la dieta aterogénica e inyectados con vehículo (PBS), o con péptido 5F a 20 µg/ratón/día. Los cocultivos se trataron con LDL humanas a 200 µg/ml de proteína LDL, o LDL de ratón a 200 µg/ml o con 200 µg/ml de LDL humanas + HDL humanas a 350 µg/ml de proteína HDL o HDL de ratón a 300 µg/ml o con HDL de ratón solo a 300 µg/ml. Los cocultivos se incubaron con o sin las adiciones anteriores durante 8 horas a 37°C en presencia de suero deficiente en lipoproteínas al 10 % (LPDS). Los sobrenadantes se recogieron o analizaron por equivalentes de hidroperóxidos de lípidos de Auerbach. Los cocultivos se lavaron después y se incubaron con medio de cultivo recién preparado sin suero o LPDS durante unas 8 horas adicionales. El medio acondicionado se recogió y analizó para actividad quimiotáctica monocítica.

**Procedimientos químicos y analíticos-perfiles de lipoproteínas de colesterol en columna (CLiP)-**

Se midieron perfiles de lipoproteínas de colesterol en plasma usando el procedimiento CLiP recientemente desarrollado (Garber y col. (2000) J. Lipid Res. 41: 1020-1026). Brevemente, se analizaron 5 a 10 µl de plasma usando una columna de Superosa 6 individual (Farmacia, Piscataway NJ). Inmediatamente tras la columna, el reactivo de colesterol se introdujo a través de una mezcladora en T y la mezcla eluyente:reactivo entró en una espiral de reacción posterior a la columna. El contenido en colesterol de la mezcla eluyente se detectó espectrofotométricamente a 500 nm y los puntos de datos se recogieron en un ordenador. Los perfiles resultantes se descompusieron en picos de componentes y se analizaron por áreas relativas usando PeakFit (SPS Science, Chicago, IL); los valores de colesterol absoluto para colesterol total y cada pico de componente se determinaron por comparación con una muestra control de valores conocidos. En algunos casos las fracciones se recogieron para determinar distribución de radiactividad. El procedimiento de CLiP permitió el análisis de muestras de ratones individuales, permitiendo el uso de las muestras almacenadas.

**Detección de anticuerpos-**

Para determinar si las inyecciones diarias de péptidos facilitaron cualquier respuesta inmune, la valoración de ELISA indirecto (Engwall (1980) Meth. Enzymol. 70: 410-439) se llevó a cabo con plasma tomado de ratones al tiempo de la recogida de órganos (tras seis semanas de inyección diaria). Las placas se revistieron con los péptidos inyectados o con MoAl (10 µg/ml). Las placas se incubaron durante toda una noche. Después de lavado cuidadoso con medio salino tamponado con borato (pH 8,2) conteniendo Tween 20 al 0,05 % y bloqueando con tampón (gelatina al 0,1 % y BSA al 0,1 % en tampón borato) durante 1 hora, muestras de 200 µl del plasma de ratón diluido (dilución 1:100) se diluyeron de forma seriada 1:1 con medio salino tamponado con borato. Se añadió después anticuerpo de cabra biotinilado para IgG de ratón (0,1 µg/ml) a los pocillos y las placas se trataron con SA-HRP (peroxidasa de rábano picante-Estreptavidina) durante una hora y se desarrolló con ABTS y peróxido como sustrato. Las placas se incubaron durante toda una noche a temperatura ambiente después de cada adición de antígeno/anticuerpo y se lavaron cuidadosamente con medio salino tamponado con borato (pH 8,2) conteniendo Tween 20 al 0,05 % y se bloquearon con tampón (gelatina al 0,1 % y BSA al 0,1 % en tampón borato) durante 1 hora antes de la siguiente adición.

**Procedimientos estadísticos-**

Se compararon grupos de tratamiento por dos ensayos t en dos dimensiones o análisis de varianza con un factor (donde los datos se distribuyeron normalmente), o por análisis de varianza con un factor en rangos (SigmaStat: SPSS Science, Chicago, IL). Las cinéticas de reemplazo de péptidos o proteínas se analizaron ajustando a un modelo cinético de un compartimiento de primer orden que asume velocidades de entrada y de salida desiguales (PKAanlyst; Micromath Scientific Software, SALT Lake City, UT).

**Resultados****50 Estudios de cinética-**

Las cinéticas de eliminación de péptido 5F y de apo A-I humana y de ratón a partir de plasma de ratón tras inyección intraperitoneal se resumen en la **Tabla 3**.

55



**Tabla 3.** Sumario de los datos ajustados de experimentos cinéticos

Material Inyectado	T $\frac{1}{2}$ (h)	Tiempo (h) para CPM máx.	Máx. % en plasma	r <sup>2</sup>
Apo A-I humana (50 µg/ratón)	15,6	3,61	23,7	0,947
Apo A-I de ratón (50 µg)	15,7	1,74	13,5	0,928
5F (20 µg)	6,22	2,36	14,29	0,895

Los datos mostrados representan resultados de datos ajustados a un modelo cinético de un compartimiento de primer orden que asume velocidades de entrada y de salida desiguales (PKAnalyst; Micromath Scientific Software, SALT Lake City, UT). Abreviaturas: T $\frac{1}{2}$ : tiempo medio de eliminación a partir de plasma; % máx. en plasma: porcentaje de dosis inyectada encontrada en plasma total a niveles de picos; r<sup>2</sup>: calidad de estadística de ajuste del modelo cinético.

5 Apo A-I humana y de ratón tuvieron eliminación prolongada grandemente comparados con el péptido 5F. Apo A-I humana y 5F humano tuvieron tiempos más largos a niveles plasmáticos de pico de lo lo hizo apo A-I de ratón, aunque los niveles de pico logrados fueron generalmente similares (apo A-I humana alcanzó niveles de pico más altos de lo que lo hicieron los otros materiales). El análisis de muestras de plasma por cromatografía en columna demostró que el péptido 5F y la apo A-I (tanto humanos como de ratón) se asociaron con lipoproteínas de plasma, especialmente con partículas en la región de tamaño de HDL (Figura 6). La proporción HDL-VLDL de radiactividad peptídica 1,5 horas tras inyección de 5F fue 4,19 ± 0,58 (n = 3, p < 0,05). Se encontraron resultados similares 5 horas tras la inyección de 5F (6,44 ± 1,10, p < 0,02). El péptido inyectado tuvo inicialmente menos del 3 % de <sup>125</sup>I libre por precipitación de TCA. Sin embargo, 1,5 horas después de la inyección, la radiactividad de <sup>125</sup>I libre en el plasma como un porcentaje de la radiactividad eluida total fue sustancialmente mayor para 5F siendo 26,9 ± 9,4 % y a las 5 horas 34,4 ± 4,8 %, reflejando la eliminación esperada de lipoproteínas y péptidos asociados a lipoproteínas. La velocidad de incremento en la radiactividad debida a yoduro libre de 1,5 a 5 horas fue menos que de inyección a 15 1,5 horas, sugiriendo posiblemente degradación final considerable del péptido en la actividad peritoneal.

#### Supervivencia y morfología de desechos en el pienso o en dietas aterogénicas-

20 Solo murieron tres ratones por causas inexplicadas durante el curso de los estudios de dieta prolongados. Dos de los animales habían estado recibiendo MoAI y uno estuvo recibiendo péptido 5F. Al tiempo de la recogida de órganos, no se observaron diferencias morfológicas que resaltasen a simple vista entre los grupos. Los hígados se alargaron en todos los animales alimentados con la dieta aterogénica, pero ni los pesos del hígado ni el peso del hígado como porcentaje del peso corporal fueron diferentes entre grupos (**Tabla 4**). Todos los animales en la dieta aterogénica (incluyendo animales inyectados con PBS) tuvieron pesos corporales menores que los controles alimentados con pienso (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Pesos corporales y hepáticos tras el tratamiento.

Dieta y Subgrupo	Peso Corporal (g)	Peso Hepático (g)	Peso Corporal (porcentaje)
Pienso Aterogénico	23,38 ± 0,52	0,99 ± 0,02	4,24 ± 0,04 %
PBS (n = 14)	20,55 ± 0,32*	1,60 ± 0,04	7,84 ± 0,26 %
5F (n = 15)	21,60 ± 0,28	1,61 ± 0,04	7,46 ± 0,23 %
MoAI (n = 14)	21,16 ± 0,34	1,72 ± 0,04	8,15 ± 0,23 %*

Los datos mostrados son la media ± Error Estándar de Medida de pesos tomados al tiempo de la recogida de órganos (después de 16 semanas de tratamiento). Los animales alimentados con pienso no recibieron ninguna inyección. Los otros ratones se mantuvieron en la dieta aterogénica como se describe en los Procedimientos. El grupo PBS recibió inyecciones intraperitoneales de 200 µl de solución salina tamponada con fosfato diariamente. El grupo 5F recibió inyecciones intraperitoneales de 20 µg de 5F en 200 µl de PBS diariamente y el grupo MoAI recibió 50 µg de MoAI en 200 µl de PBS diariamente.

\*p < 0,05 contra 5F; prueba en dos dimensiones

**Antigenicidad-**

5 Las muestras de sangre tomadas a la conclusión del periodo de inyección de 16 semanas se probaron por la presencia de anticuerpos contra los péptidos. No se detectó ningún anticuerpo contra péptido 5F o contra MoAI (datos no mostrados). Experimentos cruzados, donde las placas de ELISA se cubrieron con péptidos o proteína que no se inyectó en las series de los animales, produjeron resultados esencialmente idénticos a aquellos en la determinación directa de la presencia de anticuerpos (datos no mostrados).

**Caracterización de lipoproteínas y apolipoproteínas-**

10 Los valores de colesterol totales y los valores de colesterol de lipoproteínas según se determinan por el procedimiento de CLIP se presentan en la Tabla 3. La exactitud de los valores de colesterol totales se confirmó por un ensayo de colesterol manual (Colesterol 1000; Sigma, San Luís, MO) (datos no mostrados). No se vieron diferencias significativas en niveles de colesterol en la fracción total o en la fracción de lipoproteínas entre los grupos de tratamiento. Sin embargo, cuando las fracciones de lipoproteína se expresaron como un porcentaje del colesterol total (**Tabla 5**), el colesterol HDL comprendió un porcentaje significativamente menor en los grupos de 5F y de MoAI comparados con el grupo de PBS.

15 **Tabla 5:** niveles de colesterol totales y de lipoproteínas (mg/dl y porcentaje de colesterol total) después de 16 semanas de pienso o de dieta aterogénica.

	VLDL	IDL + LDL	HDL	TC
Dieta de Pienso	11,66 ± 2,34 (16,61 ± 3,55 %)	23,68 ± 3,51 (31,66 ± 3,61 %)	37,30 ± 2,52 (51,73 ± 1,75 %)	72,64 ± 5,58
Dieta aterogénica				
PBS	88,36 ± 5,48 (47,26 ± 1,37 %)	75,82 ± 7,64 (39,83 ± 1,34 %)	24,36 ± 2,19 (12,91 ± 0,68 %)	188,54 ± 14,22
5F	100,34 ± 15,72 (47,96 ± 3,26 %)	83,37 ± 8,15 (42,80 ± 2,51 %)	17,92 ± 12,91 (9,24 ± 1,18 %*)	201,63 ± 25,21
MoAI	100,08 ± 9,73 (48,23 ± 2,75 %)	87,86 ± 8,34 (42,44 ± 2,46 %)	19,50 ± 3,07 (9,34 ± 1,19 %*)	207,45 ± 16,94

Los datos se expresan como mg/dl promedio ± Error Estándar de Medida y entre paréntesis, como porcentaje de colesterol total. Abreviaturas: VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; IDL, lipoproteína de densidad intermedia; LDL, lipoproteína de baja densidad; HDL: lipoproteína de alta densidad; TC: colesterol total; MoAI, proteína apo A-1 de ratón; PBS, solución salina tamponada con fosfato. Los animales alimentados con pienso no recibieron ninguna inyección. Los otros ratones se mantuvieron en la dieta aterogénica como se describe en los Procedimientos. El grupo PBS recibió inyecciones intraperitoneales de 200 µl de solución salina tamponada con fosfato diariamente. El grupo 5F recibió inyecciones intraperitoneales de 20 µg de 5F en 200 µl de PBS diariamente y el grupo MoAI recibió 50 µg de MoAI en 200 µl de PBS diariamente. Los números de animales son como se muestran en la **Tabla 4**.

\*p < 0,05 o menos comparado con PBS por prueba en dos dimensiones

**Interacción de lipoproteínas de ratón con células de la pared arterial humana-**

20 Los inventores han descubierto recientemente que HDL normales inhiben tres etapas en la formación de LDL suavemente oxidado. Es esos estudios (véase, solicitud en trámite con el presente documento USSN 09/541,468, presentada el 31 de marzo, 2000) los inventores demostraron que tratar HDL humana, *in vitro* con apo A-I o un péptido mimético de apo A-I (37pA) retiró moléculas iniciadoras de la LDL que incluyen HPODE y HPETE. Estas moléculas iniciadoras se requirieron para cocultivos de células de la pared arterial humana siendo capaces de oxidar LDL y para el LDL induciendo a las células de la pared celular a producir actividad quimiotáctica monocítica. Los inventores demostraron también que después de inyección de apo A-I en ratones o de infusión en seres humanos, la LDL aislada de los ratones o de los voluntarios humanos después de inyección o de infusión de apo A-I era resistente a oxidación por células de la pared arterial humana y no indujeron actividad quimiotáctica monocítica en los cocultivos de células de la pared arterial. La figura 7 demuestra que HDL de los ratones en el presente estudio

25

que se alimentaron con la dieta aterogénica y se inyectaron con PBS fallaron en inhibir la oxidación de LDL humanas (panel A) y fallaron en inhibir actividad quimiotáctica de monocitos inducida por LDL (panel B) en cocultivos de la pared arterial humana. En contraste, HDL de ratones alimentados con la dieta aterogénica e inyectados diariamente con péptido 5F era de este modo efectiva en inhibir oxidación de LDL humanas y en evitar actividad quimiotáctica de monocitos inducida por LDL en los cocultivos como lo era HDL humana normal. La Figura 7 también muestra que LDL tomada de ratones alimentados con la dieta aterogénica e inyectados diariamente con PBS se oxidó más fácilmente e indujo más fácilmente la actividad quimiotáctica de monocitos que la LDL tomada de ratones alimentados con la misma dieta pero inyectados con 20 µg diariamente de péptido 5F. No se observó ninguna toxicidad en las células de la pared arterial humana tratadas con cualquiera de las lipoproteínas (datos no mostrados). Se obtuvieron resultados similares en dos o tres experimentos aparte (datos no mostrados).

#### Formación de lesiones-

Áreas transversales de lesiones promedio se presentan en la Figura 8. Como se esperaba, no se observó ninguna lesión en el grupo al que se dio pienso de ratones normal (datos no mostrados). Como se comunicó previamente (Paigen y col. (1990) *Arteriosclerosis* 10: 316-323), se observaron variaciones considerables en el área de lesiones en todos los grupos que reciben la dieta aterogénica. Sin embargo, los animales inyectados con 5F tuvieron área de lesiones promedio significativamente más baja que los animales inyectados con PBS, si se analizaron por prueba en dos dimensiones ( $p < 0,002$ ) o por análisis de varianza con un factor en rangos ( $p < 0,001$ ; determinado debido a la distribución no normal de las áreas de lesiones promedio). La inyección de MoAI no produjo ninguna diferencia en el área de lesiones comparada con la inyección de PBS y el área de lesión fue significativamente mayor que en animales inyectados con 5F, tanto por prueba-t ( $p < 0,002$ ) como por análisis de varianza con un factor en rangos ( $p < 0,001$ ).

#### Discusión

Los inventores demostraron previamente que los péptidos sintéticos que se diseñaron imitando el resto helicoidal anfipático de clase A fueron capaces de asociarse con fosfolípidos y mostraron muchas propiedades biológicas similares al apo A-I humano (3, 8, 10, 14, 15, 20). Los inventores han mostrado también que cuando estos péptidos se administran intravenosamente en animales, se encuentra que están asociados con lipoproteínas de plasma (11). Este estudio se diseñó para abordar la hipótesis de que un nuevo péptido, 5F, con afinidad lipídica teórica incrementada, poseería propiedades anti-aterogénicas.

Los estudios presentados aquí demostraron que este péptido 5F entró en el plasma después de inyección intraperitoneal y logró niveles en plasma que fueron aproximadamente comparables a MoAI, pero menos que apo A-I humana (**Tabla 3** y Figura 6). El tiempo medio de eliminación en plasma de 5F fue más corto que bien el de la apo A-I de ratón o bien el de la apo A-I humana después de inyección peritoneal. Después de inyección la mayoría de 5F se encontró en la región de HDL (Figura 6), a pesar del hecho de que la preponderancia del colesterol circulante estuvo en las regiones de tamaño de VLDL, de tamaño de IDL y de tamaño de LDL en la dieta aterogénica.

Los niveles y distribuciones de colesterol en plasma no fueron significativamente diferentes entre los grupos inyectados en la dieta aterogénica (**Tabla 5**). Sin embargo, cuando las fracciones de lipoproteínas se expresaron como un porcentaje de colesterol total (**Tabla 5**), el HDL-colesterol comprendió un porcentaje significativamente más bajo en los grupos 5F y MoAI comparados con el grupo PBS.

La HDL normal inhibe tres etapas en la formación de LDL oxidada suavemente. Los inventores demostraron que tratar LDL humana *in vitro* con apo A-I o con péptido mimético de apo A-I retiró moléculas iniciadoras de la LDL que incluyeron HPODE y HPETE. Estas moléculas iniciadoras se requirieron para que cocultivos de células de la pared arterial humana fueran capaces de oxidar LDL y para que la LDL indujera a las células de la pared arterial humana a producir actividad quimiotáctica monocítica (véase la solicitud en trámite junto con el presente documento USN 09/541,468, presentada el 31 de marzo, 2000). Los inventores demostraron también que después de inyección de apo A-I en ratones o de infusión de apo A-I en seres humanos, la LDL aislada de ratones o de voluntarios humanos después de inyección/infusión de apo A-I fue resistente a oxidación por células de la pared arterial humana y no indujeron actividad quimiotáctica monocítica en los cocultivos de células de la pared arterial humana. En los presentes estudios, HDL de ratones que se alimentaron con la dieta aterogénica y se inyectaron con PBS falló inhibiendo la oxidación de LDL humanas (Figura 7, panel A) y falló inhibiendo actividad quimiotáctica monocítica inducida por LDL (Figura 7, panel B) en los cocultivos de pared arterial humana. En completo contraste, se encontró que HDL de ratones alimentados con la misma dieta aterogénica pero inyectados con péptido 5F fue tan efectiva en inhibir oxidación de LDL humanas y en evitar actividad quimiotáctica monocítica inducida por LDL en los cocultivos como lo fue HDL humana normal (Figura 7). LDL tomada de ratones alimentados con la dieta aterogénica e inyectados con 5F fue rápidamente oxidada e indujo menos actividad quimiotáctica monocítica que LDL tomada de ratones alimentados con la misma dieta pero inyectados con PBS (Figura 7). Es posible que 5F interactuase con LDL en la circulación (bien antes o bien después de asociación con HDL) y retirase las moléculas iniciadoras necesarias para oxidación de LDL y la actividad quimiotáctica monocítica inducida por LDL en una manera similar a aquella descrita *in vitro* para un péptido relacionado, 37pA (solicitud en trámite junto con la presente USN 09/541,468, presentada el 31 de marzo, 2000).

Las respuestas *in vitro* de células de la pared arterial humana para HDL y LDL de ratones alimentados con la dieta aterogénica e inyectados con péptido 5F son consistentes con la acción protectora de 5F *in vivo*. A pesar de ello, niveles similares de colesterol total, LDL-colesterol, IDL+VLDL-colesterol y HDL-colesterol inferiores como un porcentaje del colesterol total, los animales alimentados con la dieta aterogénica e inyectados con el péptido 5F tuvieron puntuaciones de lesiones significativamente inferiores (Figura 8). Estos resultados son algo análogos a aquellos de Shah y col. (Shah y col. (1998) *Circulation* 97: 780-785) quienes encontraron que, a pesar de la persistencia de hipercolesterolemia, apo A-I<sup>Milano</sup> evitó la progresión de lesiones ateroscleróticas en ratones deficientes en apo E.

La razón de que la apo A-I humana se haya usado exitosamente evitando/reduciendo aterosclerosis en animales (Wilson y col. (1998) *Arteriosclerosis* 8: 737-741; Rubin y col. (1991) *Nature* 353: 265-267; Paszty y col. (1994) *J. Clin. Invest.* 94: 899-903; Plump y col. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 91: 9607-9611; Shah y col. (1998) *Circulation* 97: 780-785) pero la inyección de MoAI a una dosis de 50 µg diariamente no lo hiciera en estos estudios no está clara. Se ha mostrado que MoAI no forma complejos proteína:lipidos tan estables como lo hace apo A-I humana (Gong y col. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1213: 335-342). HDL de ratón también ha mostrado ser más fácilmente desnaturalizada por clorhidrato de guanidina que HDL humana (Gong y col. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1213: 335-342) sugiriendo que péptidos helicoidales anfipáticos podrían desplazar MoAI más fácilmente de HDL de ratón que apo A-I humana de HDL humana. Estas diferencias pueden o pueden no explicar porqué MoAI no redujo significativamente lesiones en este estudio. También puede ser que se requiera una dosis más alta de MoAI según las condiciones que emplean los inventores. En cualquier caso, el péptido 5F fue altamente efectivo según estas condiciones y MoAI no lo fue.

El análisis de ELISA de plasma en la conclusión del protocolo de inyección indicó que los anticuerpos no se formaron contra el péptido 5F. Esto no fue sorprendente porque los péptidos asociados a lípidos no han mostrado producir anticuerpos, presumiblemente debido a que estos péptidos unen lípidos de tal manera que evitan la exposición de epitopes necesarios para facilitar una respuesta inmune (Muranishi (1997) *J. Pharm. Soc. Japan* 117: 394-404; Fricker y Drewer (1996) *J. Peptide Sci.* 2: 195-211).

Un estudio preliminar realizado por los autores de la presente invención sugirió que los ratones transgénicos que expresan un péptido helicoidal anfipático de clase A (37pA) con teóricamente menos afinidad lipídica que el péptido usado en este estudio pueden haber sido resistentes a aterosclerosis (Garber y col. (1997) *Circulation* 96: I-490). El estudio actual sugiere que el péptido 5F probablemente tiene gran potencial para elucidar los mecanismos implicados en aterogénesis y también tiene potencial terapéutico.

## Ejemplo comparativo 2

### Eficacia de péptidos D

Este ejemplo demuestra la eficacia de los péptidos D de la presente invención. Los cocultivos de pared aórtica humana se incubaron con medio solo (LDL, SIN NINGUNA CÉLULA o CÉLULAS, SIN LDL), LDL control de sujetos normales a 250 µg/ml (LDL) y LDL más HDL control de células normales a 350 µg/ml (+HDL). Se incubaron otros cocultivos con el LDL control conjuntamente con cantidades que varían (microgramos mostrados en la abscisa) bien de D-2F, o bien de L-2F (tercer panel desde la izquierda, 2F) o D-37-pA o L-37pA (panel final en la derecha, 37pA). Los datos representan promedio ± Desviación Estándar de valores obtenidos a partir de cultivos cuadruplicados. Los valores para HDL o péptidos añadidos fueron todos significativamente diferentes de LDL solo (primer panel en la izquierda) al nivel de  $p < 0,01$ .

Los cocultivos se incubaron durante 4 horas a 37°C en la presencia de LPDS al 10 % produciendo LDL suavemente oxidado. Los sobrenadantes se descartaron después, los cocultivos se lavaron e incubaron con medio de cultivo sin suero o LPDS durante 4 horas adicionales. Este medio acondicionado se recogió y analizó para actividad quimiotáctica monocítica. Como se muestra en la Figura 9, tratar LDL con los péptidos D *in vitro* evita su oxidación por células de la pared arterial.

La Figura 10 demuestra que dar los péptidos D a ratones vuelve sus células rojas de la sangre resistentes a hemólisis (un fenómeno debido a la oxidación ya que puede evitarse con Vitamina E, datos no mostrados). Los grupos de ratones deficientes en receptor de LDL (n = 3) usados comúnmente como un modelo animal de formación de lesión aterosclerótica fueron administrados con los péptidos D o el vehículo de solución salina mediante sonda. A cada animal se administraron 100 µl de solución salina, 100 µg/100 µl de péptido D-2F o péptido D-37pA. La sangre se recogió de seno retroorbital con anestesia suave 17n y 48 horas después. Las células rojas se separaron mediante centrifugación, se diluyeron a hematocrito del 10 % con PBS y se incubaron a 37°C con agitación suave. La alícuotas se eliminaron en los puntos temporales t = 0, 2, 6 y 18 horas, los sedimentos celulares se centrifugaron hacia abajo y se determinó la densidad óptica debida a la hemoglobina liberada.

La Figura 11 demuestra que administrar los péptidos D a ratones por sonda y después aislar sus LDL vuelve a las LDL resistentes a oxidación de células de la pared arterial según se mide por el bioensayo de quimiotaxis monocítica.

Otro experimento demostró que el D-péptido se absorbió desde el estómago y volvió a LDL incapaz de inducir

actividad quimiotáctica monocítica en el modelo de cocultivo de células de la pared arterial humana de los inventores mientras que el L-péptido de 2F no tiene esta propiedad. Se instiló bien solución salina o 2F sintetizado a partir de aminoácidos D o a partir de aminoácidos L en los estómagos de ratones por sonda (instilación en el estómago mediante tubo). Después de la sonda los ratones se sangraron y sus LDL se aislaron y se añadieron a los cocultivos de células de pared arterial humana. El D-péptido cuando se dio por sonda protegió las LDL como se evidencia por la quimiotaxis monocítica reducida inducida por las LDL tomadas de ratones que recibieron el péptido D-2F (D2FLDL) (sintetizado a partir de aminoácidos D), mientras que LDL tomado de ratones que recibió el L-2F (sintetizado a partir de los aminoácidos L naturales) (L2FLDL) indujo fácilmente quimiotaxis monocítica (véase Figura 12).

2F sintetizado a partir de aminoácidos L cuando se presentó a LDL *in vitro* fue tan efectivo como el 2F sintetizado a partir de los aminoácidos D (véase Figura 9). Así, la diferencia en los resultados con este experimento donde los péptidos se dieron *in vivo* por sonda indica que el 2F sintetizado a partir de aminoácidos D debe haberse absorbido intacto desde el estómago mientras que el péptido 2F sintetizado a partir de los aminoácidos L naturales debe haber sido degradado en el estómago en el procedimiento de digestión y/o en el plasma como plantearon la hipótesis los inventores de que sería el caso. En otros estudios los autores de la presente invención no han visto evidencia de formación de anticuerpos contra el péptido D-2F.

La Figura 13A y la Figura 13B son dos gráficas de experimentos en las que se dio a ratones que tienen desactivado el receptor de LDL 50 microgramos de D-5F por sonda. Los animales se sangraron 1,5, 3 o 6 horas más tarde y se aislaron sus HDL, LDL y VLDL/IDL. Como se indica en la gráfica, HDL tomadas 1,5 horas después de la sonda no protegieron LDL control (cont.) de modificación pero el HDL tomado después de 3 horas y después de ligeramente menos de 6 horas tras sonda fueron tan protectores contra producción de actividad quimiotáctica monocítica inducida por LDL por células de la pared arterial humana como un HDL control (Figura 13A). En la otra gráfica (Figura 13B), 1,5, 3, o 6 horas después de 50 microgramos de D-5F por sonda se aislaron LDL de ratón y VLDL/IDL de ratón. En el panel izquierdo se añadió una LDL control a las células de la pared arterial humana sin o con una HDL control y se midió la actividad quimiotáctica monocítica producida por las células de la pared arterial. En el panel medio se añadió la LDL de ratón tomada después de 1,5, 5 o 6 horas de sonda de 50 microgramos de D-5F a las células de la pared arterial. Los resultados indican que después de 3 horas y después de 6 horas la LDL indujo significativamente menos actividad quimiotáctica monocítica. En el lado derecho de la gráfica se añadió la fracción de VLDL/IDL de lipoproteínas (VI LDL) y según muestra el punto temporal de 3 horas indujo significativamente menos actividad quimiotáctica de monocitos.

### Ejemplo 1 y ejemplo comparativo 3

#### Efectos de hidrofobicidad creciente en las propiedades físico-químicas y biológicas de un péptido helicoidal anfipático de clase A

##### Lista de abreviaturas

Ac<sub>2</sub>O, anhídrido acético, apo A-I, apolipoproteína A; BSA, seroalbúmina bovina; CAD, enfermedad cardíaca coronaria; CD, dicroísmo circular; DMPC, dimiristoil-fosfatidilcolina; DiPoPE, Di (16:1) palmitoleoil-fosfatidiletanolamina; DSC, Calorimetría de Exploración Diferencial; EDTA, ácido etileno-diamina-tetraacético; EPC, fosfatidilcolina de huevo; FMOC, Fluorinilmetoxicarbonilo; Gdn HCl, Clorhidrato de Guanidina; HAEC, células endoteliales humanas aórticas; HASMC, células musculares lisas aórticas humanas; HBTU, hexafluorofosfato de 2-(H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio; HDL, lipoproteína de alta densidad; HPLC, Cromatografía Líquida de Alta Resolución; LCAT, lecitina-colesterol aciltransferasa; MCP-1, proteína-1 quimiotáctica de monocitos; M-CSF, factor estimulador de colonias de macrófagos; MLV vesículas multilamelares; NMM, N-metilmorfolina; PBS, solución salina tamponada con fosfato; PIPES, piperazina-N,N'-bis[ácido 2-etanosulfónico]; RP-HPLC, cromatografía líquida de alta realización en fase reversa; TFA, ácido trifluoroacético.

##### Sumario

Los inventores muestran que un péptido 5F anfipático de clase A con anfipaticidad incrementada protegió ratones de aterosclerosis inducida por dieta. Los autores de la presente invención han examinado ahora los efectos de incrementar la hidrofobicidad de una serie de péptidos anfipáticos de clase A homólogos, incluyendo 5F, en propiedades físicas y funcionales relacionadas con inhibición de aterosclerosis reemplazando sistemáticamente los aminoácidos no polares existentes con fenilalanina. Los péptidos, basados en la secuencia Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH<sub>2</sub> (SEC ID N.º: 1, Ac-18A-NH<sub>2</sub> o 2F) fueron: 3F<sup>3</sup> (Ac-F<sup>3</sup>18A-NH<sub>2</sub>), 3F<sup>14</sup> (Ac-F<sup>14</sup>18A-NH<sub>2</sub>), 4F (Ac-F<sup>3,14</sup>18A-NH<sub>2</sub>), 5F (Ac-F<sup>11,14,17</sup>18A-NH<sub>2</sub>), 6F (Ac-F<sup>10,11,14,17</sup>18A-NH<sub>2</sub>) y 7F (Ac-F<sup>3,10,11,14,17</sup>18A-NH<sub>2</sub>). Medidas de solubilidad acuosa, tiempo de retención de HPLC, presión de exclusión para penetración dentro de una monocapa de PC de huevo y velocidades de solubilización de PC de huevo revelaron un incremento abrupto en la hidrofobicidad entre péptidos 4F y 5F; esto se acompañó por capacidad incrementada para asociarse con fosfolípidos. Los péptidos 6F y 7F fueron menos efectivos, indicando un límite para hidrofobicidad incrementada para promover interacción lipídica en estos péptidos. A pesar de este marcado incremento en afinidad lipídica, estos péptidos fueron menos efectivos que apo A-I en activar la enzima plasmática, lecitina: colesterol-acetil-transferasa (LCAT) con 5F siendo la mejor activando LCAT (80 % de la apo A-I). Los péptidos 4F, 5F y 6F fueron igualmente

potentes en inhibir actividad quimiotáctica monocítica inducida por LDL. Estos estudios sugieren que se requiere un equilibrio apropiado entre interacciones péptido-péptido y péptido-lípido para actividad biológica óptima de péptidos anfipáticos. Estos estudios proporcionan una base lógica para el diseño de imitadores de apo A-I pequeños con potencia incrementada para inhibición de aterosclerosis.

## 5 Introducción.

Los niveles plasmáticos de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y de apolipoproteína A-I (apo A-I), el constituyente proteico principal de HDL, están inversamente correlacionados con enfermedad arterial coronaria (CAD) (Sprecher y col. (1993) *Arterioscler. Thromb.* 13: 495-504; Phillips y col. (1993) *Circulation* 88: 2762-2770). La apo A-I humana es una proteína de 243 residuos, que contiene ocho repeticiones helicoidales anfipáticas 22-meras, la mayoría de las cuales han estado mostrando poseer el resto de Clase A (Segrest y col. (1990) *Proteins* 8: 103-117; Anantharamaiah y col. (1993) páginas 109-142 En: *The Amphipathic Helix* (Epanand, R.M., ed.), CRC Press, Boca Ratón, FL). Las hélices anfipáticas de clase A tienen una distribución de cargas característica; tienen un agrupamiento de aminoácidos cargados positivamente en el límite polar/no polar de la hélice  $\alpha$  y residuos cargados negativamente en el centro de la cara polar (Segrest y col. (1990) *Proteins* 8: 103-117; Anantharamaiah y col. (1993) páginas 109-142 En: *The Amphipathic Helix* (Epanand, R.M., ed.), CRC Press, Boca Ratón, FL; Segrest y col. (1992) *J. Lipid Res.* 33: 141-66). Este resto estructural secundario único se ha postulado para ser responsable de la propiedad de asociación con lípidos de apo A-I (Segrest y col. (1990) *Proteins* 8: 103-117). Muchos estudios con análogos sintéticos de hélices anfipáticas de Clase A han respaldado este concepto (Segrest y col. (1994) *Adv. Prot. Chem.*, 45: 303-369; Brouillette y Anantharamaiah (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1256: 103-129). Recientemente, los inventores han sintetizado cada una de las hélices 22-meras teóricas presentes en apo A-I humana como monómeros y dímeros en tándem y han mostrado que las hélices anfipáticas N-terminales y C-terminales poseen la capacidad de asociación con lípidos máxima (Mishra y col. (1998) *Biochemistry* 37: 10313-10324). Los estudios de estructura cristalina de rayos X y los estudios de modelización molecular del exón 4 (residuos 44-243) de apo A-I sugieren que un estado autoasociado de la apo A-I entera es necesario para asociación lipídica (Borran y col. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 94: 12291-12296; Segrest y col. (2000) *Current Opin. Lipidol.* 11: 105-115). En este modelo, se disponen dos moléculas de apo A-I en forma de un dímero de la cabeza a la cola con los monómeros interaccionando entre sí unos con otros estabilizando la estructura asociada a lípidos de apo A-I.

La evidencia experimental sugiere que el efecto protector de apo A-I y HDL contra enfermedad arterial coronaria podría deberse a su papel en "transporte de colesterol inverso" (Fielding y Fielding (1995) *J. Lipid Res.* 36: 211-228; Glomset (1968) *J. Lipid Res.* 9: 155-167). El transporte de colesterol inverso es la suma de tres etapas que implican HDL/apo A-I, a) flujo de salida de colesterol a partir de células xx (Johnson y col. (1991) *Biochim. Biophys. Acta.* 1085: 273-298; Oram y Yokohama (1996) *J. Lipid Res.* 37: 2473-2491), b) esterificación por LCAT de colesterol asociado a HDL (Fielding y col. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 46: 1493-1498; Jonas (1991) *Biochim. Biophys. Acta.* 1084: 205-220) y c) administración mediada por receptor de éster de colesterol al hígado (Kreiger (1999) *Ann. Rev. Biochem.* 68: 523-558). Los estudios *in vivo* han mostrado que tanto apo A-I humana como un péptido helicoidal anfipático sistémico de clase A inhiben aterosclerosis sin alterar niveles de colesterol plasmático por un mecanismo que es independiente de transporte de colesterol inverso (Shah y col. (1998) *Circulation* 97: 780-785). Recientemente, los autores de la presente invención han sugerido que la inhibición de quimiotaxis monocítica inducida por LDL en células de la pared arterial ha estado sugiriendo ser otro papel principal jugado por apo A-I y HDL en evitar aterosclerosis (Navab y col. (2000) *J. Lipid Res.*: 41: 1481-1494; Navab y col. (2000) *J. Lipid Res.*: 41: 1495-1508).

Un péptido que ha mostrado imitar las propiedades de la apo A-I humana, 18A, ha estado mostrando también poseer capacidades de activar LCAT (Anantharamaiah y col. (1990) *Arteriosclerosis* 10: 95-105; Epanand y col. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 9389-9396) y capacidades de flujo de salida de colesterol (Davidson y col. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 22975-22982; Yancey y col. (1995) *Biochemistry*, 34: 7955-7965). Se mostró la neutralización de las cargas terminales de 18A formando Ac-18A-NH<sub>2</sub> incrementando su afinidad lipídica y actividades biológicas (Yancey y col. (1995) *Biochemistry*, 34: 7955-7965; Venkatachalapathi y col. (1993) *Proteins: Structure, Function and Genetics.* 15: 349-359). Se han hecho varias modificaciones de la secuencia de aminoácidos de esta molécula "parental", 18A, en un intento de incrementar sus propiedades que imitan apo A-I (Brouillette y Anantharamaiah (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1256: 103-1291; Mishra y col. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 7185-7191; Mishra y col. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 1602-1611). Nuestros estudios anteriores (Brouillette y Anantharamaiah (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1256: 103-1291; Epanand y col. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 9389-9396) han mostrado que un incremento en la hidrofobicidad de este péptido incrementa su afinidad por lípidos y las propiedades que imitan a apo A-I. Un péptido 5F sintético, un análogo de Ac-18A-NH<sub>2</sub> con anfipaticidad incrementada ha mostrado inhibir aterosclerosis inducida por dieta en ratones (véanse, por ejemplo, Ejemplos 1 y 2). Sin embargo, el péptido 2F no inhibió significativamente formación de lesiones inducidas por dieta en ratones C57 CL6 (Garber y col. (1999) *Circulation* 100: 1538). Un estudio de péptidos diméricos de 18A indicó que la asociación péptido-péptido incrementada disminuyó la asociación péptido:lípido (Mishra y col. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 1602-1611). Para determinar el máximo grado al que la afinidad lipídica del péptido 18A puede incrementarse con un efecto positivo en las propiedades de asociación con lípidos y de imitación de apo A-I, los autores de la presente invención diseñaron una serie homóloga de péptidos en la que los residuos de Phe estuvieron significativamente incrementados sustituyendo aminoácidos hidrófobos tales como, Leu y Ala en la cara no polar con Phe. De acuerdo con la escala de hidrofobicidad determinada experimentalmente de Wimley y White (Wimley y White (1996) *Nature Struc. Biol.* 3: 842-848), Trp y Phe son los

aminoácidos más hidrófobos en el sentido de que ellos presentan la mayor división dentro de la membrana de la fase acuosa. Los inventores eligieron usar Phe para incrementar la hidrofobicidad del péptido debido a que es el aminoácido hidrófobo más resistente en los péptidos activos de membrana y los péptidos que contienen Phe pueden sintetizarse más fácilmente que los péptidos que contienen Trp. Se estudiaron los efectos de este incremento en hidrofobicidad sobre las propiedades físicas y sobre las propiedades de asociación con lípidos y sobre las propiedades biológicas de imitación de apo A-I tales como activación de LCAT e inhibición de actividades quimiotácticas inducidas por LDL.

#### Procedimientos experimentales.

##### Síntesis de péptidos.

Los péptidos se sintetizaron por el procedimiento en fase sólida usando un sintetizador de fase sólida automatizado (PS3 Protein Technologies, Woburn, MA). Los Fmoc-aminoácidos se acoplaron a una resina de amida de pista de patinaje [0,536 mEq/g], (Península Laboratorios, Inc. Belmont, CA) en la presencia de HTBU y NMM y se acetilaron con anhídrido acético en el extremo N-terminal. Los péptidos se escindieron del soporte sólido usando TFA al 70 % en diclorometano en presencia de anisol (al 1 %), mercaptoetanol (al 0,1 %) y triptófano (al 20 % en peso de la resina peptídica) y se purificaron en una columna de HPLC de fase reversa (RP-HPLC) VYDAC C-4 (22 mm x 25 cm, tamaño de partícula 10 µm) usando un gradiente de acetonitrilo del 25 % al 58 % en agua conteniendo TFA al 0,1 % en 66 minutos con una velocidad de flujo de 4,8 ml/minuto. La pureza de los péptidos se verificó por RP-HPLC analítica usando una columna C<sub>18</sub> (VYDAC, 4,6 mm x 25 cm, 5 µm) y un gradiente de acetonitrilo-agua (en presencia de TFA al 0,1 %) lineal del 25 % al 58 % en 33 minutos y por el análisis espectral de masas.

##### Dicroísmo circular.

Los espectros de CD se registraron en un espectropolarímetro AVIV 62DS como se describe en Mishra y col. (1994) J. Biol. Chem. 269: 7185-7191. Brevemente, se obtuvieron espectros usando una célula con 0,1 cm de longitud de recorrido y se tomaron medidas cada nm de 260 nm a 190 nm a 25°C. Todos los espectros de CD se promediaron en su señal añadiendo cuatro exploraciones, se corrigieron a partir de línea base y se suavizaron. Las soluciones de péptidos en PBS, pH 7,4, se usaron a una concentración de 11 µM. Los complejos péptido-DMPC (1:20 mol:mol) se usaron para determinar el efecto de unión de lípidos en la helicidad de estos péptidos. Estos complejos se prepararon añadiendo el volumen apropiado de la solución peptídica de las vesículas multilamelares de DMPC. Las vesículas multilamelares de DMPC se prepararon como sigue: se disolvió una cantidad conocida de lípidos en etanol y el disolvente se eliminó evaporando lentamente en una corriente fina de nitrógeno. El disolvente residual se eliminó almacenando la película lipídica al vacío durante toda una noche. Se añadió un volumen apropiado de PBS, pH 7,4 a la película de lípidos fina dando la concentración final requerida de DMPC. Los complejos péptido-lípido se prepararon añadiendo el volumen requerido de soluciones peptídicas dando una proporción molar péptido:lípido de 20:1. Debido a la pobre solubilidad de estos péptidos, se usó una concentración peptídica de 0,11 µM. La elipticidad del residuo promedio,  $[\theta]_{MRE}$  (grados · cm<sup>2</sup> · dmo<sup>-1</sup>) a 222 nm se calculó usando la siguiente ecuación:

$$[\theta]_{MRE} = MRW[\theta]/10cl$$

donde, MRW es el peso de residuo promedio del péptido,  $\theta$  es la elipticidad observada en grados, c es la concentración del péptido en g/ml y l es la longitud de recorrido de la célula en centímetros. El porcentaje de helicidad del péptido se estimó a partir de la siguiente ecuación como se describe por Morrisett y col. (1973) Biochemistry, 12: 1290-1299.

$$\% \text{ de helicidad } \alpha = ([\theta]_{222} + 3.000)/(36.000 + 3.000)$$

en la que,  $[\theta]_{222}$  es la elipticidad del residuo promedio a 222 nm.

##### Calorimetría de exploración diferencial.

Los estudios de DSC se llevaron a cabo usando un calorímetro de rastreo Microcal MC-2 (Microcal, Inc., Amerst, MA) a una velocidad de rastreo de 20° h<sup>-1</sup> para DMPC y 37°C h<sup>-1</sup> para DiPoPE, usando el procedimiento descrito por Mishra y col. (1994) J. Biol. Chem. 269: 7185-7191. Se disolvió en cloroformo una cantidad conocida de fosfolípido. Para un grupo de muestras, se disolvió péptido en metanol y se añadió a una solución de DiPoPE en cloroformo/metanol (2:1, v:v). Para ambas, las muestras de lípidos puros y las soluciones orgánicas de lípido y péptido, el disolvente se eliminó con una corriente lenta de nitrógeno. El disolvente residual se retiró en agitación. Se añadió tampón (PBS, pH 7,4 para DMPC o PIPES 20 nM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM y NaN<sub>3</sub> al 0,002 %, pH 7,4, para DiPoPE) solo o una concentración conocida de solución peptídica en tampón dando una proporción molar lípido/péptido a la película secada y se hidrató agitando a temperatura ambiente durante 30 minutos. Para DMPC, se tomaron cuatro exploraciones consecutivas con un tiempo de equilibrio de 60 minutos entre exploraciones. Los termogramas de DSC se analizaron usando el software proporcionado por MicroCal Inc., Amherst, MA y Origin, versión 5.0.

##### Medidas de presión de superficie.

Las medidas de presión de exclusión en monocapa dan la afinidad de los péptidos por una interfase lípido-agua; se siguió el procedimiento de Phillips y Krebs (Phillips y Krebs (1986) *Methods Enzymol.* 128: 387-403; Ibdá y col. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 1004: 300-308). Se diseminó una monocapa insoluble de fosfatidilcolina de huevo (EPC) en la interfase aire-agua en una placa de Teflón a temperatura ambiente dando una presión de superficie inicial ( $\pi_i$ ) en el intervalo de 0,00005-0,0045 N/cm (5-45 dinas/cm). Una solución de péptidos en PBS conteniendo Gdn. HCl 1,5 M se inyectó cuidadosamente a la subfase dando una concentración final de 50  $\mu\text{g}/\text{dl}$ . El Gdn. HCl se diluyó en la subfase a una concentración final de  $\leq 1$  mM permitiendo a los péptidos renaturalizarse. La subfase se agitó continuamente y el incremento en presión de superficie de monocapa de EPC ( $\Delta\pi$ ) se registró hasta que se obtuvo un valor de estado estacionario. El valor de la presión de superficie inicial ( $\pi_i$ ) al que los péptidos no penetran más en la monocapa de EPC es decir la presión de exclusión ( $\pi_e$ ) se calculó extrapolando el ajuste de regresión lineal de  $\pi_i$  frente a  $\Delta\pi$  para  $A_n = 0$  N/cm (0 dinas/cm).

#### Medidas de dispersión de luz en ángulo recto.

La asociación de estos péptidos con fosfatidilcolina de huevo se determinó siguiendo la disolución de vesículas multilamelares de EPC (MLV) por suspensión de luz en ángulo recto usando un espectrofluorímetro de cuentas de fotón SLM 8000C como se describe en (Mishra y col. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 7185-7191). Se preparó EPC MLV evaporando una solución de EPC (Avanti Polar, AL) en nitrógeno e hidratando la película lipídica con solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4). La muestra que contiene EPC 105  $\mu\text{M}$  y una cantidad equimolecular de péptido se mantuvo a 25°C y se agitó continuamente. La eliminación de turbidez se controló durante 30 minutos. La disolución completa de vesículas de EPC se logró por adición de Tritón X-100 a una concentración final de 1 mM.

#### Purificación de lecitina:aciltransferasa de colesterol (LCAT).

LCAT se aisló a partir de plasma normolipidémico recién preparado por el procedimiento de Albers y col. (1986) *Methods Enzymol.* 129: 763-783, con algunas modificaciones. La densidad del plasma se ajustó a 1,21 g/ml y se centrifugó a 175.000 g durante 24 horas. La fracción que contiene LCAT se sometió a cromatografía de Affi-Gel Blue seguida por cromatografía DE-52. LCAT se eluyó a partir de la columna de DE-52 usando un gradiente de NaCl de 75 a 200 mM en tampón de Tris (10 mM, pH 7,6). SDS-PAGE mostró pureza mayor del 90 % del enzima sin ninguna contaminación humana de apo A-I.

#### Ensayo de actividad de LCAT:

Se preparó el sustrato sonicando PC de huevo/colesterol (90:20 mol/mol) conteniendo cantidades traza de  $7\alpha$ - $^3\text{H}$  colesterol en un sonicador Branson 250 durante 12 minutos obteniéndose vesículas unilamelares pequeñas. El sustrato (50  $\mu\text{l}$ ) se incubó con 5  $\mu\text{g}$  de péptido o con apo A-I humana y 50  $\mu\text{l}$  de BSA (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 1 hora a 37°C. El volumen total se llevó hasta 150  $\mu\text{l}$ . Después de incubar durante 1 hora, se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de LCAT y se incubaron durante 1 hora a 37°C y la reacción se desactivó trasladando 10  $\mu\text{l}$  en una tira de sílice. Se separaron colesterol y éster de colesterol por cromatografía en capa fina de la tira de sílice en mezcla hexano:cloroformo (2:1 v/v). Se visualizaron estándares de colesterol y oleato de colesterol sumergiendo la placa de TLC en un 3 % de acetato cúprico, tampón de ácido fosfórico al 8 % y calentándola. Las posiciones de los estándares se usaron para cortar la tira en dos y las dos partes se contaron en fluido de centelleo en un Packard Tri Carb 4530. Todas las reacciones se hicieron por triplicado. La activación de LCAT por los péptidos se expresa como porcentaje de la activación total por apo A-I.

#### Electroforesis:

Se llevó a cabo SDS-PAGE no desnaturalizante y usando el procedimiento de Laemmli (1970) *Nature* 227: 680-685. Se usaron los geles Premade Novex y el gel se tiñó con azul de Coomassie para identificar las bandas de proteína.

#### Actividad quimiotáctica monocítica inducida por LDL:

Se llevaron a cabo cocultivos de células de la pared arterial humana, aislamiento de monocitos, aislamiento de lipoproteínas por ultracentrifugación a partir del plasma de donantes humanos normales o a partir del plasma de ratón por FPLC y determinación de hidroperóxidos de lípidos y actividad quimiotáctica monocítica como se describe por Navab y col. (Navab y col. (1991) *J. Clin. Invest.* 88: 2039-2046; Navab y col. (1977) *J. Clin. Invest.* 99: 2005-2019). Brevemente, LDL y HDL se aislaron a partir de plasma humano por el procedimiento de Havel y col. (Havel y col. (1955) *J. Clin. Invest.* 43: 1345-1353). Las células endoteliales aórticas humanas (HAEC) y las células musculares lisas humanas (HASMC) se aislaron como se describe por Navab y col. (1991) *J. Clin. Invest.* 88: 2039-2046. Las placas de microvaloración se trataron con gelatina al 0,1 % a 37°C durante toda una noche. Se añadieron HASMC a una densidad confluyente de  $1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>. Las células se cultivaron durante dos días, tiempo al que habían cubierto la superficie completa del pocillo y habían producido una cantidad sustancial de matriz extracelular. Se añadieron HAEC subsiguientemente a  $2 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> y se dejaron crecer, formando una monocapa completa de HAEC confluyentes en dos días. En todos los experimentos, las HAEC y las HASMC autólogas (del mismo donante) se usaron a niveles de paso de cuatro a seis. Los monocitos se aislaron de sangre de donantes normales como se describe por Fogelman y col. (1988) *J. Lipid Res.* 29: 1243-1247. Los cocultivos se trataron con LDL nativo (250  $\mu\text{g}$  proteína/ml) o presencia de HDL (350  $\mu\text{g}$  proteína/ml) o péptidos durante 8 horas. Los cocultivos se lavaron después y se incubaron con medio 199 durante unas 8 horas adicionales. Los sobrenadantes de



cocultivos resultantes se ensayaron por actividad quimiotáctica monocítica como se describe por Navab y col. (1997) J. Clin. Invest., 99: 2005-2019.

## Resultados.

### Análisis de los péptidos.

- 5 La **Tabla 6** muestra las secuencias de los diversos análogos de 18A que se sintetizaron. El péptido 6F forma parte de la invención reivindicada. Los otros péptidos no forman parte de la invención reivindicada pero se proporcionan para una comprensión más amplia. El péptido Ac-18A-NH<sub>2</sub>, que tiene dos residuos de Phe en las posiciones 6 y 18 (cerca de los residuos de Lys de la interfase) se refiere como 2F. Se sintetizaron dos péptidos 3F, 3F<sup>3</sup> o 3F<sup>4</sup>, donde Leu en posición 3 y 14 (ambos presentes en el centro de la fase no polar) se reemplazan por Phe, respectivamente.
- 10 El péptido 4F tiene dos residuos de Phe en el centro de la fase no polar lo que es el resultado de sustitución de dos residuos de Leu centrales. Las sustituciones en los péptidos (3F a 7F) se muestran en la **Tabla 6**. Con un incremento en el número de residuos de Phe la hidrofobicidad teórica por residuo en la fase no polar se incrementa desde 2,05 para el péptido, 2F, hasta 3,15 para 7F.

**Tabla 6:** Modificaciones de Ac-18A-NH<sub>2</sub> para incrementar hidrofobicidad

Péptido	Secuencia <sup>1</sup>	Hidrofobicidad <sup>2</sup>	Afinidad por lípidos teórica (Λ) <sup>3</sup>
2F	Ac-18A-NH <sub>2</sub>	2,05	13,03
3F <sup>3</sup>	Ac-[F <sup>3</sup> 18A]-NH <sub>2</sub>	2,20	13,84
3F <sup>14</sup>	Ac-[F <sup>14</sup> 18A]-NH <sub>2</sub>	2,20	13,79
4F	Ac-[F <sup>3,14</sup> 18A]-NH <sub>2</sub>	2,35	14,59
5F	Ac-[F <sup>11,14,17</sup> 18A]-NH <sub>2</sub>	2,81	19,07
6F	Ac-[F <sup>10,11,14,17</sup> 18A]-NH <sub>2</sub>	2,96	19,87
7F	Ac-[F <sup>3,10,11,14,17</sup> 18A]-NH <sub>2</sub>	3,15	20,78

<sup>1</sup>Secuencia de línea 18A DWLKAFYDKVAEKLKEAF (SEC. ID N.º: 2)

<sup>2</sup>La hidrofobicidad se expresa como la hidrofobicidad por residuo en la fase no polar.

<sup>3</sup>La afinidad por lípidos teórica se ha calculado como se muestra en (Palgunachari y col. (1996) Arterioscler. Thomb. Vasc. Biol. 16: 328-338).

- 15 Los péptidos se purificaron en una columna Vydac C<sub>4</sub> por HPLC de fase reversa (RP-HPLC) usando agua (con ácido trifluoroacético al 0,1 %) y acetonitrilo (ácido trifluoroacético al 0,1 %). La pureza y los tiempos de retención de los péptidos se determinaron en una columna analítica Vydac C<sub>18</sub> usando un gradiente de acetonitrilo al 25 %-28 % en agua conteniendo TFA al 0,1 %. La pureza de estos péptidos se confirmó también por espectrometría de masas. La masa estuvo de acuerdo con el peso molecular calculado. Los tiempos de retención de los péptidos se enumeran en la **Tabla 7**. Aunque tanto los péptidos 3F como los péptidos 4F tienen residuos Phe adicionales comparados con 2F, los tiempos de retención de estos péptidos en la columna C<sub>18</sub> no son muy diferentes (~ 22 min.). Un incremento repentino en el tiempo de retención es patente con 5F, 6F y 7F (-26 minutos). Con números crecientes de los residuos de Phe, la solubilidad de estos péptidos en PBS disminuye. Como se puede ver a partir de la **Tabla 7**, las solubilidades de 2F, 3F<sup>3</sup>, 3F<sup>14</sup> y 4F (1,25 a 1,4 mg/ml) son significativamente más altas que aquellas de 5F, 6F y 7F (0,03 a 0,1 mg/ml).
- 20
- 25

**Tabla 7.** Propiedades Físicas de los Péptidos F.

Péptido	Peso Molecular <sup>1</sup>	Tiempo de Retención (minutos)	Solubilidad (mg/ml) <sup>3</sup>	Presión de Exclusión en Monocapa (π <sub>e</sub> ) <sup>4</sup>
Apo A-I	28000	28,0	>2,0	34
18A	2200	19,8	>2,0	30

(continuación)

Péptido	Peso Molecular <sup>1</sup>	Tiempo de Retención (minutos)	Solubilidad (mg/ml) <sup>3</sup>	Presión de Exclusión en Monocapa ( $\pi_e$ ) <sup>4</sup>
37pA	4580	26,0	>2,0	41
2F	2242	22,5	>2,0	38
3F <sup>3</sup>	2276	21,0	1,25	38
3F <sup>14</sup>	2276	21,2	1,45	39
4F	2310	22,0	1,30	40
5F	2429	26,5	0,10	45
6F	2462	27,0	0,03	46

(continuación)

Péptido	Peso Molecular <sup>1</sup>	Tiempo de Retención (minutos)	Solubilidad (mg/ml) <sup>3</sup>	Presión de Exclusión en Monocapa ( $\pi_e$ ) <sup>4</sup>
7F	2510	26,0	0,10	45

<sup>1</sup>La masa según se determina por espectroscopía de masas estuvo muy cerca del peso molecular calculado teóricamente.

<sup>2</sup>El tiempo de retención es el tiempo tomado por el péptido para eluir a partir de una columna Vydac C<sub>18</sub> usando el gradiente 25 %-58 % de acetonitrilo en agua conteniendo TFA al 0,1 % en 33 minutos.

<sup>3</sup>La solubilidad se determinó en PBS.

<sup>4</sup>Reproducibilidad de estas medidas es  $\pm 0,00001$  N/cm (1 dina/cm)

La autoasociación de estos péptidos anfipáticos se examinó por electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante (PAGE). La Figura 14 mostró la movilidad de 2F tanto en geles desnaturalizantes (Figura 14A) como en geles no desnaturalizantes (14B). El peso molecular de 2F es 2242 y puede verse como una banda única en el gel SDS (Figura 14A) que se mueve ligeramente más bajo que el estándar de peso molecular más bajo (3,5-2,5 kDa). Sin embargo, según condiciones no desnaturalizantes forma agregados en una manera dependiente de concentración como se ve en la Figura 14B. A concentraciones más bajas (100  $\mu$ g/ml) forma agregados de dos tamaños mientras que a una concentración mayor (250  $\mu$ g/ml) solo se observan los agregados más grandes (Figura 14B). Todos los otros péptidos estudiados presentaron también agregación en condiciones no desnaturalizantes sugiriendo que los péptidos poseen una fuerte tendencia a la autoasociación.

#### Dicroísmo circular.

La estructura secundaria de los péptidos se determinó por espectroscopía de dicroísmo circular. La tabla 8 mostró el porcentaje de helicidad de los péptidos en PBS y en la presencia de DMPC. En PBS, los homólogos 2F, 4F, 5F, 6F, 7F tienen un porcentaje de helicidad más alto que 3F<sup>3</sup> y 3F<sup>14</sup> (Tabla 8). Dado que 5F, 6F y 7F son solubles en poca cantidad en PBS, los estudios de CD se llevaron a cabo usando 11  $\mu$ M de los péptidos (una concentración a la que todos ellos son solubles). El péptido 2F mostró helicidad al 55 %, comparable a 5F en solución. Tanto 6F como 7F fueron ligeramente más helicoidales (al 67 % y al 58 % respectivamente) mientras que 4F lo fue ligeramente menos (45 %). Ambos péptidos 3F fueron mucho menos (= 20 %) helicoidales. Sin embargo, la unión a DMPC incrementó considerablemente la helicidad de todos los péptidos salvo para 6F (Tabla 8). En un ambiente lipídico, 2F, 5F y 7F mostraron un contenido helicoidal alto (68 % a 76 %). Aunque los péptidos 3F<sup>3</sup> y 3F<sup>14</sup> tuvieron un contenido helicoidal muy pequeño en PBS, hubo un incremento significativo en helicidad en un ambiente lipídico, desde aproximadamente el 22 % al 42 % para 3F<sup>3</sup> y desde el 19 % hasta el 55 % para 3F<sup>14</sup>. La helicidad de los péptidos 6F y 4F no cambió apreciablemente en la presencia de lípidos. Sin embargo, estos péptidos fueron aún menos helicoidales que los péptidos 2F y 5F. Los resultados de CD sugieren que no hay cambio sistemático en las helicidad de los péptidos con sustitución creciente por Phe; los péptidos 2F y 5F presentaron helicidad máxima en solución y en la presencia de fosfolípidos.

**Tabla 8.** Helicidades de los péptidos F en ambientes acuosos y lipídicos

Péptidos	Porcentaje de Helicidad	
	PSB <sup>1</sup>	DMPC <sup>1</sup>
2F	55	72
3F <sup>3</sup>	22	42
3F <sup>14</sup>	19	55
4F	45	44
5F	55	76
6F	67	50
7F	58	68

<sup>1</sup>Se usaron soluciones 11  $\mu$ M de péptido. La proporción péptido:DMPC usada fue 1:20 (mol/mol). Se hicieron tres medidas y se obtuvo un error de  $\pm$  10 %.

**Estudios de DSC con DMPC y DiPoPE.**

5 El efecto de estos análogos de 18A en la transición de fusión en cadena de vesículas multilamelares de DMPC se estudió por DSC usando mezclas péptido-lipídicas a una proporción molar de 100:1 lípidos/péptidos. La **Tabla 9** muestra las temperaturas de transición y las entalpías de la transición de fusión en cadena de DMPC en la presencia y en la ausencia de péptidos. El lípido puro sufre una pretransición a 13°C y una transición de fusión de cadena principal a 23°C. La adición de los péptidos a DMPC dio como resultado un ensanchamiento del gel a la transición líquido-cristalina y a una disminución de la entalpía de transición (**Tabla 9**). La presentación no se vio en presencia de cualquiera de los péptidos. Entre los péptidos estudiados, 2F, 3F<sup>3</sup>, 5F y 6F redujeron la entalpía de transición al grado máximo (**Tabla 9**). Ninguno de los péptidos cambió la temperatura de transición en más de 0,2°C.

**Tabla 9.** Efecto de los F-péptidos en los parámetros de transición de fusión de cadena de DMPC

Péptido	T <sub>CM</sub> (°C)	$\Delta H_{CM}$ (kilocalorías/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)
DMPC	23,1	6,4	0,2
2F	23,2	4,5	0,5
3F <sup>3</sup>	23,2	4,9	0,4
3F <sup>14</sup>	23,2	5,5	0,3
4F	23,2	5,3	0,4
5F	23,2	4,9	0,5
6F	23,1	4,0	0,5
7F	23,2	4,5	0,5

La proporción DMPC/péptido usada fue 100:1 (mol/mol). La concentración del DMPC usado fue 1,5 mM. T<sub>CM</sub> es la temperatura a la que tiene lugar la transición de fusión de cadena.  $\Delta H_{CM}$  es la entalpía de la transición y  $\Delta T_{1/2}$  es la anchura a la mitad del máximo de la transición.

15 El cambio en la bicapa a temperatura de transición de fase hexagonal (T<sub>H</sub>) se ha usado evaluando los efectos de los péptidos sobre las propiedades de curvatura intrínsecas de fosfolípidos (Epanand (1998) Biochim. Biophys. Acta, 1376: 356-368). Se ha mostrado previamente que 2F eleva T<sub>H</sub> de DiPoPE (Tytler y col. (1993) J. Biol. Chem. 268: 22112-22118). En el estudio actual los autores de la presente invención prepararon las mezclas péptido-lipídicas de dos maneras. Una fue añadir el péptido en disolvente orgánico al lípido en disolvente orgánico seguido por depositar el material como una película e hidratar subsiguientemente con tampón. En el otro procedimiento, el péptido y el lípido se mezclaron después de que cada uno se hidratara por separado. Si la mezcla llega al equilibrio antes del análisis de DSC, no debería importar como el péptido y el lípido se mezclaron originalmente. Sin embargo, los sistemas de

20

membrana se pueden equilibrar lentamente, caso en el que puede haber más péptido en el lípido cuando se incorpora a altas concentraciones dentro de la película lipídica. En general los resultados de ambos procedimientos de preparación de la muestra son similares (no mostrados) pero el cambio en  $T_H$  tiende a ser más grande para muestras en las que el péptido se incorporó en una película compuesta de lípido y péptido. La variación de la  $T_H$  con fracción molar de péptido se muestra para diversos péptidos y apo A-I (Figura 15). Se observa un incremento lineal en  $T_H$  para 2F y 5F mientras 4F se comporta más como apo A-I porque se observa un incremento más rápido a concentraciones peptídicas más bajas. Por otro lado, los análogos 3F así como 6F y 7F no afectan significativamente  $T_H$ .

#### Interacción de péptidos con monocapas de fosfolípidos.

La presión de exclusión de monocapas,  $\pi_e$ , es la presión de superficie a la que los péptidos no son más capaces de penetrar una monocapa de EPC. El valor de  $\pi_e$ , refleja la afinidad lipídica teórica del péptido. La presión de exclusión de los péptidos F se incrementó con número creciente de los residuos de Phe (Tabla 7). Todos los péptidos estudiados aquí tuvieron presiones de exclusión más altas que apo A-I y el péptido parental 18A. El valor de  $\pi_e$  se incrementó gradualmente desde 2F hasta 4F (0,00038 a 0,0004 N/cm (38 a 40 dinas/cm)). Este es el intervalo visto para 37pA, una repetición en tándem de 18A interrumpida por una prolina. El valor de la presión de exclusión se incrementa significativamente para 5F, 6F y 7F (0,0004 a 0,00045 N/cm (40 a 45 dinas/cm)). Es patente que los homólogos de 5F, 6F y 7F poseen una capacidad similar para interactuar con monocapas de EPC, como se determina por la presión de exclusión. Es interesante que los tiempos de retención de HPLC y las presiones de exclusión de monocapa para los péptidos F enumerados en Tabla 7 muestren tendencias paralelas, con un incremento brusco entre 4F y 5F.

#### Dispersión de luz en ángulo recto.

Como se puede ver en la Figura 16, todos los péptidos son capaces de eliminar EPC MLV, menos apo A-I, que no elimina EPC MLV. Los dos péptidos homólogos 3F fueron los menos efectivos en eliminar las EPC MLV. Los péptidos homólogos 2F, 5F, 6F y 7F, eliminaron todos las EPC MLV en unos grados similares. El péptido 4F fue el más efectivo en eliminar EPC MLV con actividad similar a aquella de Tritón X-100. El tiempo para eliminación al 50 % de la turbidez de EPC MLV fue también el más corto para el homólogo 4F. El péptido 7 tomó el tiempo más largo para lograr el 50 % de eliminación; esto se debió a un periodo de demora inicial largo de ~300 segundos (Figura 16). Esto se debe probablemente al requerimiento de las moléculas 7F autoasociadas para disociarse antes de que puedan interactuar con EPC MLV y solubilizarse. Las velocidades más bajas de eliminación exhibidas por los homólogos 2F, 5F y 6F se pueden deber también una autoasociación más alta de estos péptidos.

#### Activación de la enzima LCAT de plasma.

La capacidad de estos péptidos para activar la enzima LCAT de plasma se determinó midiendo la velocidad inicial de la reacción de LCAT con vesículas de PC-colesterol de huevos como sustrato (Figura 17). La activación de LCAT se expresa en relación a aquella por apo A-I, que se considera que es el 100 %. La activación de LCAT por 20  $\mu\text{g/ml}$  de péptidos y apo A-I se muestra en la Figura 4. A esta concentración, apo A-I activa LCAT mejor que cualquiera de los péptidos. Entre los péptidos estudiados aquí, sin embargo, 5F es el mejor activador (80 % de apo A-I). Hasta el punto en el que la activación de LCAT está afectada, tanto 3F<sup>3</sup> como 3F<sup>14</sup> tienen actividades activadoras similares. Por lo tanto, se han representado como una barra (Figura 17).

#### Actividad quimiotáctica monocítica inducida por LDL

Cuando LDL se incuba con el sistema de cocultivo de la pared arterial humana, está atrapada en el espacio subendotelial y llega a oxidarse produciendo lípidos biológicamente activos. Estos lípidos inducen quimiotaxis monocítica. Así, la quimiotaxis de cocultivo de monocitos es un ensayo bien establecido para la formación de lípidos biológicamente activos. Se ha mostrado que la inhibición de quimiotaxis está directamente correlacionada con la eliminación de "moléculas iniciadoras" que son responsables de la secreción de proteína-1 quimiotáctica monocítica (MCP-1) (Navab y col. (2000) J. Lipid Res. 41: 1481-1494; Navab y col. (2000) J. Lipid Res. 41: 1495-1508) y del factor de diferenciación factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF). La Figura 18 muestra que LDL después de incubación con péptidos presentó efectos variados con homólogos 4F, 5F y 6F reduciendo las propiedades quimiotácticas de la mayoría de las LDL. Los péptidos 3F no fueron todos efectivos comparados con 2F y 7F, que fueron menos efectivos que los péptidos 4F, 5F y 6F.

#### Discusión.

##### Efecto de incrementar hidrofobicidad de un análogo peptídico helicoidal anfipático de clase A en sus propiedades físico-químicas y de unión de lípidos:

Los péptidos estudiados en el presente documento son homólogos del péptido parental, 18A. La hidrofobicidad calculada por residuo (de acuerdo con la escala de GES modificada (Palgunachari y col. (1996) Arterioscler. Thomb. Vasc. Biol. 16: 328-338)) en la cara no polar se incrementó según se incrementó el número de residuos de Phe. Este incremento en hidrofobicidad (Tabla 6) se refleja en la afinidad lipídica teórica,  $\Lambda$  (*Ibid.*). Sin embargo, el valor de  $\Lambda$

se incrementa gradualmente de 2F a 4F (desde 13,03 hasta 14,59) con un incremento repentino en el valor de 14,59 (para 4F) a 19,07 para 5F. Un incremento gradual en  $\Lambda$  se observó de nuevo después de 5F en los valores para 6F y 7F (**Tabla 6**). Esto se debe a la sustitución de Leu en las posiciones 3 y 14 en Ac-18A-NH<sub>2</sub> con Phe que da como resultado un ligero incremento la hidrofobicidad de la fase no polar y así, da como resultado un ligero incremento en valores de  $\Lambda$  para los dos análogos 3F y 4F. En homólogos 5F, 6F y 7F sin embargo, además de las sustituciones de Leu por Phe, Ala en posiciones 11 y 17 están también sustituidas por Phe, dando como resultado un incremento significativo en los valores de  $\Lambda$  (**Tabla 6**). Dado que Ala es menos hidrófoba que Leu y Leu es menos hidrófoba que Phe, la sustitución de Ala por Phe causa un mayor cambio en hidrofobicidad y afinidad lipídica teórica del péptido resultante que una sustitución Leu por Phe.

El tiempo de retención en una columna de HPLC de fase reversa C<sub>18</sub>, la solubilidad de estos péptidos y su capacidad para penetrar una monocapa de EPC, presentaron todos una tendencia similar a aquella vista en los valores de afinidad lipídica teórica (Tabla 7). Los tiempos de retención de los péptidos 2F, 3F<sup>3</sup>, 3F<sup>14</sup> y 4F son aproximadamente los mismos (21-22 min.) y son significativamente menores que aquellos de 5F, 6F y 7F, que comprenden un segundo grupo (26-27 minutos). Los péptidos 2F a 4F tienen solubilidad acuosa considerablemente más alta que homólogos 5F a 7F, que son solubles en poca cantidad (Tabla 7). Se observó un incremento gradual en presión de exclusión de 2F a 4F después de lo que hay un incremento brusco de 0,0004 a 0,00045 N/cm (40 a 45 dinas/cm). Las presiones de exclusión para los péptidos 5F, 6F y 7F no son muy diferentes unas de otras y son significativamente más altas que aquellas de apo A-I (Tabla 7). El péptido parental 18A (0,0003 N/cm (30 dinas/cm)) e incluso el dímero de 18A, 37pA (0,00004 N/cm (4 dinas/cm)) fueron también significativamente menos efectivos en penetrar dentro de una monocapa de PC de huevo dispersa en la interfase aire-agua. En base a las propiedades físicas los péptidos F se pueden separar en dos grupos; grupo I con 2F, 3F<sup>3</sup>, 3F<sup>14</sup>, 4F y grupo II con péptidos 5F, 6F y 7F.

Los datos de CD (Tabla 8) indican que el valor de helicidad en porcentaje de todos los péptidos se incrementa en la presencia de DMPC sugiriendo que todos los péptidos están asociados con lípidos. La unión de estos péptidos a DPCM parece ser similar a como se sugiere por DSC (**Tabla 9**). Sin embargo, el efecto de estos péptidos en la estabilización de la estructura bicapa de de DiPoPE es diferente. 4F y 5F parecen interactuar mejor con DiPoPE debido a que parecen ser mejores estabilizadores que los otros péptidos.

Mientras que apo A-I no es capaz de eliminar EPC MLV, todos los análogos de péptidos son capaces de hacerlo, pero en diferentes grados. Entre los péptidos de grupo I que son fácilmente solubles en tampón acuoso y que presentan un valor de presión de exclusión de monocapa en el intervalo 0,00038 a 0,00040 N/cm (38 a 40 dinas/cm) (2F, análogos de 3F y 4F), 4F parece ser el más eficiente y en la proporción péptido:lípido en investigación, presenta cinéticas similares a aquellas de Tritón X-100 (Figura 16). Mientras las presiones de exclusión de monocapa de los péptidos 2F y 3F son similares, los homólogos 3F son los más lentos en eliminar EPC MLV. La razón para la capacidad eliminadora de EPC reducida de los homólogos 3F no está clara en este momento. Los péptidos de grupo II (5F, 6F y 7F) que no son fácilmente solubles en tampón acuoso y que poseen valores de presión de superficie de 0,00045 N/cm (45 dinas/cm) solubilizan EPC MLV de forma relativamente lenta. Estos resultados son consistentes con agregados peptídicos que tienen que disociarse y después tienen que interactuar con EPC. La reactividad superior de 4F se puede explicar por el hecho de su hidrofobicidad es óptima de tal forma que las interacciones hidrófobas péptido:péptido que favorecen su autoasociación no evitan interacciones péptido:lípido.

#### 40 **Efecto de la hidrofobicidad incrementada en activación de LCAT:**

La activación de LCAT es un procedimiento complejo y no solo es dependiente de afinidad lipídica sino también de la interacción de la proteína helicoidal anfipática con la enzima LCAT (Jonas (2000) Biochim. Biophys. Acta 1529: 245-256). De acuerdo con esto, la capacidad para activar LCAT se encuentra que es diferente para los péptidos homólogos. El péptido 5F mostró la capacidad de activación de LCAT máxima, de acuerdo con las propiedades físicas estudiadas en Tabla 7 en las que se vio un incremento abrupto de 4F a 5F, incluyendo valores de presión de exclusión en la interfase PC de huevos-agua. El hecho de que los péptidos 6F y 7F no sean tan efectivos como 5F podría explicarse por la interacción péptido-péptido incrementada (como se refleja en la baja solubilidad acuosa de estos péptidos) que no permitirá interacción péptido:lípido o péptido:LCAT. Estos resultados están de acuerdo con las observaciones anteriores de los autores de la presente invención con los péptidos dimericos de 18A en los que la autoasociación potenciada del péptido dimerico 18A-18A (36A) redujo su capacidad para interactuar con lípidos comparado con péptido 18A-Pro-18A (Jonas (2000) Biochim. Biophys. Acta 1529: 245-256). Aunque la activación de LCAT con los péptidos se ha comparado con aquella de apo A-I, se destacaría que apo A-I y los péptidos interactúan de forma diferente con el sustrato dado que tienen reactividades diferentes a EPC (Figura 16). Se han hecho observaciones similares por Chung y col. quienes mostraron que un péptido sintético 18A-Pro-18A y apo A-I interactúan de forma diferente con EPC (Chung y col. (1985) J. Biol. Chem. 260: 10256-10262).

#### **Efectos de hidrofobicidad incrementada de la cara no polar en quimiotaxis monocítica inducida por LDL:**

Dado que la eliminación de "moléculas iniciadoras" depende de la anfipaticidad del péptido como se comunica por los autores de la presente invención (Navab y col. (2000) J. Lipid. Res. 41: 1481-1494; Navab y col. (2000) J. Lipid Res. 41: 1495-1508), los inventores examinaron la capacidad de estos péptidos para inhibir quimiotaxis monocítica

inducida por LDL. En este ensayo, los péptidos 4F, 5F y 6F a nivel de 100 µg/ml, mostraron inhibición significativa y similar de quimiotaxis inducida por LDL en base a análisis de varianza con un factor. Aunque el homólogo de 2F mostró alguna actividad inhibitoria, por razones que no están claras, los análogos del péptido 3F no mostraron ninguna inhibición comparados con LDL sola. Estos resultados estuvieron de acuerdo con el hecho de que el péptido 3F no fue capaz de eliminar los hidroperóxidos de litio (resultados no mostrados) y con la capacidad reducida de eliminar EPC MLV. El péptido 7F fue significativamente menos efectivo que los péptidos 4F, 5F y 6F ( $P < 0,001$ ). La capacidad reducida de 7F puede de nuevo explicarse por autoasociación incrementada del péptido que disminuye su capacidad para interactuar con el lípido como se ve en los estudios de eliminación de EPC MLV. Estos resultados demuestran de nuevo que el balance delicado que existe entre las contribuciones de la hidrofobicidad del péptido a la autoasociación puede afectar críticamente propiedades de imitación de apo A-I.

La administración *in vivo* de péptido 5F, que posee capacidad de activación de LCAT incrementada y capacidad incrementada para retirar las "moléculas iniciadoras" protegió a los ratones de aterosclerosis inducida por dieta. En contraste, la administración de 2F, que es similar a la capacidad de activación de LCAT de 4F, pero menos efectiva que 4F y 5F en retirar "moléculas iniciadoras" de LDL, no inhibió significativamente la formación de lesiones inducidas por dieta en ratones C57 BL6 (área de lesión promedio para ratones control administrados con PBS  $14,7 \pm 1,8 \mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$  comparados con ratones administrados con 2F  $13,2 \pm 1,7 \mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$ ,  $n = 15$ ). Se deduce que en este modelo de ratón, la inhibición de quimiotaxis monocítica inducida por LDL es más anti-aterogénica que activación de LCAT. Dado que los péptidos 2F y 4F son similares en activar LCAT y 4F y 5F son similares en eliminar "moléculas iniciadoras" de LDL, el péptido 4F puede servir como un reactivo para distinguir entre la importancia de la activación de LCAT y la inhibición de quimiotaxis monocítica inducida por LDL en diferentes modelos de ratón sensibles a aterosclerosis. Si la inhibición de quimiotaxis inducida por LDL es más importante que la capacidad activadora de LCAT, entonces 4F sería mejor péptido para su uso como un inhibidor de aterosclerosis dado que este péptido es más soluble que los péptidos 5F, 6F y 7F.

#### **Ejemplo comparativo 4. Los péptidos D-4F mantienen niveles de paraoxinasa y bloquean producción de fosfolípidos oxidados durante una respuesta inflamatoria aguda**

Los inventores han observado que la instilación intranasal del virus influenza A en ratones causó una pérdida dependiente del tiempo en las propiedades antiinflamatorias de HDL alcanzó un máximo de 7 a 9 días después de la inoculación. La dosis escogida fue una que no causó viremia y así los cambios no se debieron directamente al virus sino que se debieron al estado inflamatorio inducido por la respuesta sistémica del huésped a la infección viral. Esta respuesta es parte del sistema inmune innato y se conoce como la reacción de fase aguda o la respuesta de fase aguda.

Una de las consecuencias fue la disminución en paraoxonasa y actividad acetilhidrolasa activadora de plaquetas en la HDL de los ratones después de la infección por influenza. Como un resultado de la pérdida de estas actividades enzimáticas de HDL y también como un resultado de la asociación de proteínas pro-oxidantes con HDL durante la fase de respuesta aguda, HDL no fue capaz más de evitar oxidación de LDL y no fue capaz más de evitar la producción inducida por LDL de actividad quimiotáctica de monocitos por células endoteliales. La HDL normal es capaz de prevenir la producción inducida por la LDL de actividad quimiotáctica monocítica por células endoteliales debido a que la HDL normal contiene suficientes actividades paraoxonasa y acetilhidrolasa activadora de plaquetas para destruir los fosfolípidos oxidados biológicamente activos.

En este ejemplo, los inventores demostraron que pronto (dos días) tras la infección con influenza A los hígados de ratones infectados generaron estos fosfolípidos oxidados (Figura 19) y después (7 a 9 días después de la infección) estos fosfolípidos oxidados biológicamente activos aparecieron en la aorta de ratones. Sin embargo, si los ratones se inyectaron con 20 microgramos de D-4F diariamente después de la infección con el virus de la influenza A los niveles de paraoxonasa no cayeron (Figura 20) y los fosfolípidos biológicamente activos oxidados no se generaron más allá de los antecedentes (Figura 21).

Estos datos indican que D-4F (y/o otros péptidos de la presente invención) se pueden dar bien oralmente o bien por inyección a pacientes con enfermedad arterial coronaria conocida durante la infección con influenza u otros eventos que pueden generar una respuesta inflamatoria de fase aguda (*por ejemplo* debido a infección viral, infección bacteriana, traumatismo, trasplante, diversas afecciones autoinmunes, etc.) y así los autores de la presente invención pueden evitar por este tratamiento a corto plazo la incidencia incrementada de ataque al corazón y apoplejía asociada con patologías que general tales estados inflamatorios.

#### **Ejemplo comparativo 5. La administración oral de imitadores de péptidos de Apo A-I sintetizados a partir de aminoácidos-D reduce drásticamente aterosclerosis en ratones**

Los imitadores de péptidos de Apo A-I sintetizados bien a partir de aminoácidos D o bien a partir de aminoácidos L fueron efectivos *in vitro* en proteger lipoproteína de baja densidad (LDL) contra oxidación por células de la pared arterial. Sin embargo, cuando los péptidos se dieron oralmente a ratones con el receptor de LDL anulado y su HDL se aisló y ensayó por su capacidad protegiendo LDL contra oxidación *in vitro*, solo los péptidos sintetizados a partir de aminoácidos-D fueron efectivos. El péptido sintetizado a partir de aminoácidos-D fue estable en la circulación y se encontró en fracciones asociado con las lipoproteínas de alta densidad (HDL). El péptido sintetizado a partir de

aminoácidos L se degradó rápidamente y se excretó en la orina. Cuando el péptido sintetizado a partir de aminoácidos-D conocidos como D-4F se administró oralmente, dos veces al día, a ratones con el receptor de LDL anulado a una dieta de Western, las lesiones decrecieron en un 79 %. Cuando se añadió al agua de beber de ratones con apo E anulada, D-4F disminuyó las lesiones en más del 84 %. Los inventores concluyen que los imitadores de péptidos de apo A-I administrados oralmente sintetizados a partir de aminoácidos-D son útiles para la prevención y tratamiento de aterosclerosis y otras enfermedades inflamatorias crónicas que están causadas por lípidos oxidados.

#### Antecedentes.

Las concentraciones de HDL-colesterol están inversamente relacionadas con el riesgo de enfermedad arterial coronaria aterosclerótica (Miller y Miller (1975) Lancet, 1: 16-19). La infusión (Badimon y col. (1990) J. Clin Invest. 85: 1234-1241) o expresión transgénica (Plump y col. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 91: 9607-9611) de apo A-I, la apolipoproteína principal de HDL, ha estado mostrando proteger contra aterosclerosis en modelos animales. Los mecanismos por los que apo A-I protege contra el desarrollo de aterosclerosis se han postulado incluyendo transporte de colesterol inverso (Shah y col. (2001) Circulation, 103: 3047-3050) y eliminación de niveles bajos de lípidos oxidados, "moléculas iniciadoras" que se requieren oxidando LDL (Navab y col. (2000) J. Lipid Res. 41: 1481-1494; Navab y col. (2000) J. Lipid. Res. 41: 1495-1508; Navab y col. (2001) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 21: 481-488). Los análogos peptídicos helicoidales anfipáticos de clase A han estado mostrando imitar varias propiedades *in vitro* de apo A-I incluyendo la eliminación de las "moléculas iniciadoras" que se requieren para oxidación de LDL (Navab y col. (2000) J. Lipid Res. 41: 1481-1494; Navab y col. (2000) J. Lipid. Res. 41: 1495-1508). La administración intraperitoneal de péptidos helicoidales anfipáticos de clase A ha estado mostrando recientemente proteger ratones de aterosclerosis inducida por la dieta sin cambiar sus niveles de colesterol en plasma (Garber y col. (2001) J. Lipid Res. 42: 545-552). La reducción en lesiones estuvo asociada con un incremento significativo en la capacidad de HDL inhibiendo oxidación de LDL *in vitro* (*Id.*). Hasta ahora, la limitación principal para el uso de apo A-I o imitadores de péptidos de apo A-I como agentes farmacológicos ha sido la necesidad de una vía parenteral de administración.

Las enzimas de mamíferos tales como proteasas reconocen péptidos y proteínas sintetizadas a partir de aminoácidos L pero raramente reconocen aquellas sintetizadas a partir de aminoácidos D. Los inventores demuestran aquí que las formulaciones específicas de imitadores de péptidos de apo A-I sintetizadas a partir de aminoácidos D se pueden administrar oralmente y pueden inhibir drásticamente aterosclerosis en ratones.

#### Procedimientos

##### Ratones.

Se adquirieron ratones con el receptor de LDL anulado hembras o ratones con apo E anulada hembras en un antecedente C57BL/6J del Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME. Los ratones con el receptor de LDL anulado se mantuvieron a dieta de pienso de Purina (Ralston Purina Co.) hasta que fueron de 4 semanas de edad cuando se cambiaron a una dieta Western (Teklad, Madison, WI, dieta n.º: 88137) durante 6 semanas. Los ratones con apo E anulada se mantuvieron a dieta de pienso de Purina a lo largo de todo el estudio. Los ratones con el receptor de LDL anulado recibieron el péptido de prueba o un vehículo control mediante sonda gástrica dos veces al día durante los periodos indicados en las leyendas de la figura. A las cuatro semanas de edad el péptido de prueba se añadió al agua de beber de algunos de los ratones con apo E anulada a las concentraciones indicadas en las leyendas de la figura y los ratones con apo E anulada se continuaron a la dieta de pienso.

Los ratones se sangraron con anestesia a partir del plexo venoso retroorbital, de acuerdo con protocolos aprobados por el Comité de Investigación Animal de UCLA. Las lesiones ateroscleróticas se midieron como se describe previamente<sup>9</sup>.

##### Lipoproteínas

LDL y HDL se aislaron como se describe (Navab y col. (2000) J. Lipid Res. 41: 1481-1494 y ejemplos en el presente documento) después de obtener consentimiento informado de los voluntarios humanos y a partir de la sangre de los ratones como se destaca anteriormente.

##### Cocultivos, oxidación celular de LDL, aislamiento monocítico y ensayo de quimiotaxis monocítica

Se aislaron y cultivaron células endoteliales aórticas humanas y células musculares lisas humanas como se describe previamente (*Id.*). La oxidación celular de LDL en la presencia y ausencia de HDL se determinó como se describe (*Id.*). Los monocitos de sangre humana se aislaron después de obtener consentimiento informado y la quimiotaxis de monocitos se determinó como se describe previamente<sup>5</sup>.

##### Síntesis y preparación de imitadores de péptidos de apo A-I

Los péptidos miméticos de apo A-I se sintetizaron como se describe previamente salvo porque en algunos ejemplos cada aminoácido en el péptido fue el estereoisómero-D del aminoácido. Los péptidos están basados en la secuencia

Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-KL-K-E (SEC ID N.º: 1) (Ac-18A-NH<sub>2</sub> o 2F). Se usó 2F o un análogo de 2F con la secuencia de aminoácidos primaria Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH<sub>2</sub> (SEC ID N.º: 5, también designada 4F) en los estudios comunicados aquí. Los péptidos sintetizados a partir de los aminoácidos-L se designaron con una L (por ejemplo L-4F) y los péptidos sintetizados a partir de los aminoácidos D se designaron con una D (por ejemplo D-4F) (Ejemplo 2). En algunos casos los péptidos se yodaron usando reactivo YODO-BEAD (Pierce Rockford, IL) de acuerdo con las recomendaciones hechas por el fabricante. Los liposomas hechos de L- $\alpha$ -1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfolina (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) con y sin D-4F se fabricaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La extracción y la detección de péptidos intactos a partir de plasma de ratón se llevó a cabo como se describe por Garber y col. (1992) *Arterioscler. Thromb.* 12: 886-894, usando HPLC de fase reversa.

### Otros procedimientos

Se llevaron a cabo análisis de contenido en proteínas (Navab y col. (2000) *J. Lipid Res.* 41: 1481-1494) y en colesterol (Van Lenten y col. (2001) *Circulation*, 103: 2283-2288) de lipoproteínas y análisis estadísticos como se describen por Van Lenten y col. (2001) *Circulation*, 103: 2283-2288, con la significancia definida como  $P < 0,05$ .

### Resultados

*In vitro*, tanto L-2F y D-2F fueron igualmente capaces de bloquear oxidación de LDL y actividad quimiotáctica monocítica inducida por LDL en cocultivos de células de la pared arterial humana (datos no mostrados). *In vivo* sin embargo, como se muestra en la Figura 22A después de administración oral, solo D-4F permaneció intacta en la circulación y fue capaz de potenciar capacidad protectora de HDL (Figura 22B) y de disminuir actividad quimiotáctica monocítica inducida por LDL (Figura 22C). Dos horas después de la administración oral de <sup>125</sup>I-L-4F o, <sup>125</sup>I-D-4F la orina de ratones a los que se dio L-4F tuvo aproximadamente 15 veces más radiactividad que lo que fue el caso para ratones a los que se dio D-4F (datos no mostrados).

Figura 23, demuestra que la administración dos veces diarias de D-4F por sonda redujo lesiones ateroscleróticas en ratones con el receptor de LDL anulado a una dieta Western en el 79 %. Los niveles de colesterol en plasma totales no difirieron significativamente en los ratones con el receptor de LDL anulado a los que se dio D-4F y en aquellos a los que se dio liposomas solo o medio salino solo. El colesterol total fue  $761 \pm 69$  mg/dl para el grupo de DF-4,  $677 \pm 52$  mg/dl para el grupo de liposomas y  $699 \pm 31$  para el grupo de solución salina. El nivel de HDL-colesterol promedio fue ligeramente superior en el grupo de D-4F,  $73 \pm 8,7$  mg/dl, comparado con  $65,9 \pm 9,2$  para el grupo de liposomas y  $67 \pm 6,3$  para el grupo de solución salina, pero estas diferencias no alcanzaron significancia estadística.

La figura 24 demuestra que los ratones con apo E anulada a los que se dio D-4F en su agua de beber tuvieron más de un 84 % de reducción en lesiones y no fueron significativamente diferentes si se dio a los ratones 2,5 mg/día/ratón o 5,0 mg/día/ratón. No hubo diferencias significativas en la cantidad de agua consumida (2,5 ml/día/ratón) entre los ratones con apo E anulada que no recibieron ningún péptido, o entre aquellos que recibieron 2,5 mg de D-4F/ratón/día o 5,0 mg de D-4F/ratón/día y no hubo ninguna diferencia significativa en pesos corporales, cardiacos o hepáticos de los ratones con apo E anulada en los tres grupos (datos no mostrados). Además, la concentración de colesterol total en plasma no fue significativamente diferente en los ratones con apo E anulada que recibieron D-4F ( $478 \pm 149$  mg/dl para ratones que recibieron agua sin péptido,  $534 \pm 12,3$  mg/dl para ratones que recibieron D-4F a 2,5 mg/ratón/día y  $579 \pm 4,6$  mg/dl para ratones que recibieron D-4F a 5,0 mg/ratón/día). El HDL-colesterol promedio se incrementó suavemente en los ratones que recibieron D-4F pero las diferencias no alcanzaron significancia estadística ( $32,2 \pm 7$  mg/dl para ratones que recibieron agua sin péptido,  $38,7 \pm 5$  mg/dl para ratones que recibieron D-4F a 2,5 mg/ratón/día y  $43,4 \pm 6$  mg/dl para ratones que recibieron DF-4 a 5,0 mg/ratón/día).

### Discusión

Hasta ahora, el uso de apo A-I y de imitadores de péptidos de apo A-I como agentes farmacológicos ha estado limitado por la necesidad de administración parenteral. La reducción marcada en lesiones ateroscleróticas en el presente estudio ocurre a pesar de la ausencia de cambios significativos en colesterol de plasma total. Aunque hubo una tendencia hacia niveles de HDL-colesterol ligeramente más altos en los ratones que recibieron D-4F, esta no alcanzó significancia estadística. Los estudios presentados aquí sugieren que los imitadores de péptidos apo A-I administrados oralmente sintetizados a partir de aminoácidos-D pueden ser útiles para la prevención y tratamiento de aterosclerosis y otras enfermedades inflamatorias crónicas que están causadas por lípidos oxidados.

### Listado de secuencias

<110> Los Rectores de la Universidad de California

<120> PÉPTIDOS ADMINISTRADOS ORALMENTE PARA MEJORAR ATROSCLEROSIS

<130> 407T-911220PC

<150> US 09/896.841



<151> 29-6-2001

<150> US 09/645.454

<151> 24-8-2000

<160> 87

5 <170> Patent In version 3.0

<210> 1

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

10 <220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 1

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu  
1 5 10 15

Ala Phe

<210> 2

15 <211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

20 <400> 2

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu  
1 5 10 15

Ala Phe

<210> 3

<211> 18

<212> PROTEÍNA

25 <213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 3

Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu  
1 5 10 15

Ala Phe

30 <210> 4

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

5 <223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 4

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu  
1 5 10 15

Ala Phe

<210> 5

<211> 18

10 <212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 5

Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu  
1 5 10 15

Ala Phe

15

<210> 6

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

20 <220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 6

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu  
1 5 10 15

Phe Phe

<210> 7

25 <211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 7

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Phe Phe Glu Lys Phe Lys Glu  
 1    5    10    15

Phe Phe

<210> 8

<211> 18

5

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 8

Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Phe Phe Glu Lys Phe Lys Glu  
 1    5    10    15

Phe Phe

10

<210> 9

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

15

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 9

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu  
 1    5    10    15

Phe Phe

<210> 10

20

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

25

<400> 10

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu  
 1    5    10    15

Ala Phe

<210> 11

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

5 <400> 11

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Leu Lys Glu  
1 5 10 15

Phe Phe

<210> 12

<211> 18

<212> PROTEÍNA

10 <213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 12

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu  
1 5 10 15

Phe Phe

15 <210> 13

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

20 <223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 13

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu  
1 5 10 15

Phe Phe

<210> 14

<211> 18

25 <212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 14

Glu Trp Leu Lys Leu Phe Tyr Glu Lys Val Leu Glu Lys Phe Lys Glu  
 1 5 10 15

Ala Phe

<210> 15

<211> 18

<212> PROTEÍNA

5 <213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 15

Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu  
 1 5 10 15

Ala Phe

10 <210> 16

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

15 <223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 16

Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu  
 1 5 10 15

Phe Phe

<210> 17

<211> 18

20 <212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 17

Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu  
 1 5 10 15

Ala Phe

25 <210> 18

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

ES 2 438 779 T3

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 18

Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Leu Lys Glu  
1 5 10 15

Phe Phe

5

<210> 19

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

10

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 19

Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu  
1 5 10 15

Phe Phe

<210> 20

<211> 18

15

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 20

Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu  
1 5 10 15

Phe Phe

20

<210> 21

<211> 14

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

25

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 21

Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu Ala Phe  
1 5 10

<210> 22

30

<211> 14

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

5 <400> 22

Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu Ala Phe  
1 5 10

<210> 23

<211> 14

<212> PROTEÍNA

10 <213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 23

Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu Ala Phe  
1 5 10

15 <210> 24

<211> 14

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

20 <223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 24

Ala Phe Tyr Asp Lys Phe Phe Glu Lys Phe Lys Glu Phe Phe  
1 5 10

<210> 25

<211> 14

25 <212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 25

Ala Phe Tyr Asp Lys Phe Phe Glu Lys Phe Lys Glu Phe Phe  
1 5 10

30 <210> 26

<211> 14

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 26

5

Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu Ala Phe  
1 5 10

<210> 27

<211> 14

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

10

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 27

Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu Phe Phe  
1 5 10

<210> 28

15

<211> 14

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

20

<400> 28

Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu Ala Phe  
1 5 10

<210> 29

<211> 14

<212> PROTEÍNA

25

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 29

Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Leu Lys Glu Phe Phe  
1 5 10

30

<210> 30

<211> 14

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial



<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 30

Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu Phe Phe  
 1 5 10

5 <210> 31

<211> 14

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

10 <223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 31

Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu Phe  
 1 5 10

<210> 32

<211> 14

15 <212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 32

Leu Phe Tyr Glu Lys Val Leu Glu Lys Phe Lys Glu Ala Phe  
 1 5 10

20 <210> 33

<211> 14

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

25 <220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 33

Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu Ala Phe  
 1 5 10

30 <210> 34

<211> 14

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 34

Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu Phe Phe  
1 5 10

5 <210> 35

<211> 14

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

10 <223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 35

Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu Ala Phe  
1 5 10

<210> 36

<211> 14

15 <212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 36

Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Leu Lys Glu Phe Phe  
1 5 10

20 <210> 37

<211> 14

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

25 <220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 37

Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu Phe Phe  
1 5 10

<210> 38

30 <211> 14

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

ES 2 438 779 T3

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 38

Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu Phe Phe  
1 5 10

<210> 39

5

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

10

<400> 39

Asp Trp Leu Lys Ala Leu Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu  
1 5 10 15

Ala Leu

<210> 40

<211> 18

<212> PROTEÍNA

15

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 40

Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu  
1 5 10 15

Phe Phe

20

<210> 41

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

25

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 41

Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Phe Phe Glu Lys Phe Lys Glu  
1 5 10 15

Phe Phe

<210> 42

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

5 <223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 42

Glu Trp Leu Lys Ala Leu Tyr Glu Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu  
1 5 10 15

Ala Leu

<210> 43

<211> 18

10 <212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 43

Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu  
1 5 10 15

Ala Phe

15

<210> 44

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

20 <220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 44

Glu Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu  
1 5 10 15

Phe Phe

<210> 45

25 <211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

30 <400> 45

Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu  
 1 5 10 15

Phe Phe

<210> 46

<211> 18

<212> PROTEÍNA

5 <213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 46

Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Phe Phe Glu Lys Phe Lys Glu  
 1 5 10 15

Phe Phe

10 <210> 47

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

15 <223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 47

Glu Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Phe Phe Glu Lys Phe Lys Glu  
 1 5 10 15

Phe Phe

<210> 48

<211> 18

20 <212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 48

Asp Phe Leu Lys Ala Trp Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu  
 1 5 10 15

Ala Trp

25 <210> 49

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 49

**Glu Phe Leu Lys Ala Trp Tyr Glu Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu**  
**1 5 10 15**

**Ala Trp**

5

<210> 50

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

10

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 50

**Asp Phe Trp Lys Ala Trp Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu**  
**1 5 10 15**

**Trp Trp**

<210> 51

15

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

20

<400> 51

**Glu Phe Trp Lys Ala Trp Tyr Glu Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu**  
**1 5 10 15**

**Trp Trp**

<210> 52

<211> 18

<212> PROTEÍNA

25

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 52

Asp Lys Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Trp Ala Lys Glu  
 1 5 10 15

Ala Phe

<210> 53

<211> 18

<212> PROTEÍNA

5 <213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 53

Asp Lys Trp Lys Ala Val Tyr Asp Lys Phe Ala Glu Ala Phe Lys Glu  
 1 5 10 15

Phe Leu

10 <210> 54

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

15 <223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 54

Glu Lys Leu Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Val Phe Glu Trp Ala Lys Glu  
 1 5 10 15

Ala Phe

<210> 55

<211> 18

20 <212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 55

Glu Lys Trp Lys Ala Val Tyr Glu Lys Phe Ala Glu Ala Phe Lys Glu  
 1 5 10 15

Phe Leu

25 <210> 56

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

5

<400> 56

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Val Asp Lys Phe Ala Glu Lys Phe Lys Glu  
 1 5 10 15  
 Ala Tyr

<210> 57

<211> 18

<212> PROTEÍNA

10

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 57

Glu Lys Trp Lys Ala Val Tyr Glu Lys Phe Ala Glu Ala Phe Lys Glu  
 1 5 10 15  
 Phe Leu

15

<210> 58

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

20

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 58

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Val Tyr Asp Lys Val Phe Lys Leu Lys Glu  
 1 5 10 15  
 Phe Phe

<210> 59

<211> 18

25

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 59



ES 2 438 779 T3

Glu Trp Leu Lys Ala Phe Val Tyr Glu Lys Val Phe Lys Leu Lys Glu  
1 5 10 15

Phe Phe

<210> 60

<211> 18

<212> PROTEÍNA

5 <213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 60

Asp Trp Leu Arg Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu  
1 5 10 15

Ala Phe

10 <210> 61

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

15 <223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 61

Glu Trp Leu Arg Ala Phe Tyr Glu Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu  
1 5 10 15

Ala Phe

<210> 62

<211> 18

20 <212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 62

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Arg Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu  
1 5 10 15

Ala Phe

25 <210> 63

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 63

Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Glu Arg Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu  
 1 5 10 15  
 Ala Phe

5 <210> 64

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

10 <223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 64

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Arg Leu Lys Glu  
 1 5 10 15  
 Ala Phe

<210> 65

<211> 18

15 <212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 65

Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Val Ala Glu Arg Leu Lys Glu  
 1 5 10 15  
 Ala Phe

20 <210> 66

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

25 <220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 66

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Ala Phe

<210> 67

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

5 <223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 67

Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Val Ala Glu Lys Leu Arg Glu  
 1 5 10 15

Ala Phe

<210> 68

<211> 18

10 <212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 68

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Arg Val Ala Glu Arg Leu Lys Glu  
 1 5 10 15

Ala Phe

15

<210> 69

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

20 <220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 69

Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Glu Arg Val Ala Glu Arg Leu Lys Glu  
 1 5 10 15

Ala Phe

<210> 70

25 <211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

30 <400> 70

Asp Trp Leu Arg Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Arg Glu  
 1 5 10 15

Ala Phe

<210> 71

<211> 18

<212> PROTEÍNA

5 <213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 71

Glu Trp Leu Arg Ala Phe Tyr Glu Lys Val Ala Glu Lys Leu Arg Glu  
 1 5 10 15

Ala Phe

10 <210> 72

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

15 <223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 72

Asp Trp Leu Arg Ala Phe Tyr Asp Arg Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu  
 1 5 10 15

Ala Phe

<210> 73

<211> 18

20 <212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 73

Glu Trp Leu Arg Ala Phe Tyr Glu Arg Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu  
 1 5 10 15

25 Ala Phe

<210> 74

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 74

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Arg Leu Arg Glu  
1 5 10 15

5

Ala Phe

<210> 75

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

10

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 75

Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Val Ala Glu Arg Leu Arg Glu  
1 5 10 15

Ala Phe

<210> 76

15

<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

20

<400> 76

Asp Trp Leu Arg Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Arg Leu Lys Glu  
1 5 10 15

Ala Phe

<210> 77

<211> 18

<212> PROTEÍNA

25

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 77

Glu Trp Leu Arg Ala Phe Tyr Glu Lys Val Ala Glu Arg Leu Lys Glu  
1 5 10 15

Ala Phe

<210> 78

<211> 37

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

5

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 78

```

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
1           5           10           15
Ala Phe Pro Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys
           20           25           30
Leu Lys Glu Ala Phe
           35
    
```

<210> 79

10

<211> 37

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

15

<400> 79

```

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
1           5           10           15
Phe Phe Pro Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys
           20           25           30
Leu Lys Glu Phe Phe
           35
    
```

<210> 80

20

<211> 37

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 80

```

Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
1           5           10           15
Ala Phe Pro Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys
           20           25           30
Leu Lys Glu Ala Phe
           35
    
```

<210> 81

<211> 37

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

5

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 81

```

Asp Lys Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Trp Ala Lys Glu
 1           5           10           15
Ala Phe Pro Asp Lys Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Trp
 20           25           30
Leu Lys Glu Ala Phe
 35
    
```

<210> 82

10

<211> 37

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

15

<400> 82

```

Asp Lys Trp Lys Ala Val Tyr Asp Lys Phe Ala Glu Ala Phe Lys Glu
 1           5           10           15
Phe Leu Pro Asp Lys Trp Lys Ala Val Tyr Asp Lys Phe Ala Glu Ala
 20           25           30
Phe Lys Glu Phe Leu
 35
    
```

<210> 83

<211> 37

<212> PROTEÍNA

20

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 83

```

Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu
 1           5           10           15
Ala Phe Pro Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys
 20           25           30
Phe Lys Glu Ala Phe
 35
    
```

25

<210> 84

<211> 37

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

5 <223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 84

```

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Val Tyr Asp Lys Val Phe Lys Leu Lys Glu
1 5 10 15
Phe Phe Pro Asp Trp Leu Lys Ala Phe Val Tyr Asp Lys Val Phe Lys
20 25 30
Leu Lys Glu Phe Phe
35
    
```

<210> 85

<211> 37

10 <212> PROTEÍNA

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<400> 85

```

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Phe Ala Glu Lys Phe Lys Glu
1 5 10 15
Phe Phe Pro Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Phe Ala Glu Lys
20 25 30
Phe Lys Glu Phe Phe
35
    
```

15 <210> 86  
<211> 18

<212> PROTEÍNA

<213> Artificial

20 <220>

<223> péptido de clase A sintético o recombinante

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(1)

25 <223> Xaa es ácido aspártico o ácido glutámico, u homólogos o análogos de los mismos

<220>

<221> misc\_feature

<222> (2)..(3)



- <223> Xaa es triptófano, fenilalanina, alanina, leucina, tirosina, isoleucina, valina, a-naftilalanina, u homólogos o análogos de los mismos
- <220>
- <221> misc\_feature
- 5 <222> (4)..(4)
- <223> Xaa es lisina o arginina
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (5)..(5)
- 10 <223> Xaa es serina, treonina, alanina, glicina, histidina, u homólogos o análogos de los mismos
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (6)..(7)
- 15 <223> Xaa es triptófano, fenilalanina, alanina, leucina, tirosina, isoleucina, valina, α-naftilalanina, u homólogos o análogos de los mismos
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (8)..(8)
- <223> Xaa es ácido aspártico o ácido glutámico, u homólogos o análogos de los mismos
- 20 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (9)..(9)
- <223> Xaa es lisina o arginina
- <220>
- 25 <221> misc\_feature
- <222> (10)..(11)
- <223> Xaa es triptófano, fenilalanina, alanina, leucina, tirosina, isoleucina, valina, a-naftilalanina, u homólogos o análogos de los mismos
- <220>
- 30 <221> misc\_feature
- <222> (12)..(12)
- <223> Xaa es ácido aspártico o ácido glutámico, u homólogos o análogos de los mismos
- <220>
- <221> misc\_feature
- 35 <222> (13)..(13)
- <223> Xaa es serina, treonina, alanina, glicina, histidina, u homólogos o análogos de los mismos
- <220>
- <221> misc\_feature

- <222> (14)..(14)
- <223> Xaa es triptófano, fenilalanina, alanina, leucina, tirosina, isoleucina, valina, a-naftilalanina, u homólogos o análogos de los mismos
- <220>
- 5 <221> misc\_feature
- <222> (15)..(15)
- <223> Xaa es serina, treonina, alanina, glicina, histidina, u homólogos o análogos de los mismos
- <220>
- <221> misc\_feature
- 10 <222> (16)..(16)
- <223> Xaa es ácido aspártico o ácido glutámico, u homólogos o análogos de los mismos
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (17)..(18)
- 15 <223> Xaa es triptófano, fenilalanina, alanina, leucina, tirosina, isoleucina, valina, a-naftilalanina, u homólogos o análogos de los mismos
- <400> 86
- |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <b>Xaa</b> | <b>Xaa</b> | <b>Xaa</b> | <b>Xaa</b> | <b>Xaa</b> | <b>Xaa</b> | <b>Xaa</b> | <b>Xaa</b> | <b>Xaa</b> | <b>Xaa</b> | <b>Xaa</b> | <b>Xaa</b> | <b>Xaa</b> | <b>Xaa</b> | <b>Xaa</b> | <b>Xaa</b> |
| <b>1</b>   |            |            |            | <b>5</b>   |            |            |            |            | <b>10</b>  |            |            |            |            | <b>15</b>  |            |
- Xaa Xaa**
- <210> 87
- 20 <211> 18
- <212> PROTEÍNA
- <213> Artificial
- <220>
- <223> péptido de clase A sintético o recombinante
- 25 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (1)..(1)
- <223> Xaa es ácido aspártico o ácido glutámico, u homólogos o análogos de los mismos
- <220>
- 30 <221> misc\_feature
- <222> (2)..(3)
- <223> Xaa es triptófano, fenilalanina, alanina, leucina, tirosina, isoleucina, valina o alfa-naftilalanina, u homólogos o análogos de los mismos
- <220>
- 35 <221> misc\_feature
- <222> (4)..(4)

- <223> Xaa es lisina o arginina  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (5)..(5)
- 5 <223> Xaa es serina, treonina, alanina, glicina, histidina, u homólogos o análogos de los mismos  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (6)..(7)
- 10 <223> Xaa es triptófano, fenilalanina, alanina, leucina, tirosina, isoleucina, valina o alfa-naftilalanina, u homólogos o análogos de los mismos  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (8)..(8)
- <223> Xaa es ácido aspártico o ácido glutámico, u homólogos o análogos de los mismos  
15 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (9)..(9)
- <223> Xaa es lisina o arginina  
<220>
- 20 <221> misc\_feature  
<222> (10)..(11)
- <223> Xaa es triptófano, fenilalanina, alanina, leucina, tirosina, isoleucina, valina o alfa-naftilalanina, u homólogos o análogos de los mismos  
<220>
- 25 <221> misc\_feature  
<222> (12)..(12)
- <223> Xaa es ácido aspártico o ácido glutámico, u homólogos o análogos de los mismos  
<220>  
<221> misc\_feature
- 30 <222> (13)..(13)
- <223> Xaa es lisina o arginina  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (14)..(14)
- 35 <223> Xaa es triptófano, fenilalanina, alanina, leucina, tirosina, isoleucina, valina o alfa-naftilalanina, u homólogos o análogos de los mismos  
<220>  
<221> misc\_feature

<222> (15)..(15)

<223> Xaa es lisina o arginina

<220>

<221> misc\_feature

5

<222> (16)..(16)

<223> Xaa es ácido aspártico o ácido glutámico, u homólogos o análogos de los mismos

<220>

<221> misc\_feature

10

<222> (17)..(18)

<223> Xaa es triptófano, fenilalanina, alanina, leucina, tirosina, isoleucina, valina, alfa-naftilalanina, u homólogos o análogos de los mismos

<400> 87

```
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1           5           10          15
Xaa Xaa
```

15

## REIVINDICACIONES

1. Un péptido que mejora un síntoma de aterosclerosis, en el que dicho péptido varía en longitud hasta 30 aminoácidos y:
- 5 la secuencia de aminoácidos del péptido comprende la secuencia de aminoácidos D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N.º: 7)
- y
- el péptido protege a un fosfolípido frente a oxidación por un agente oxidante.
2. El péptido de la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos del péptido consiste en la secuencia de aminoácidos D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEC ID N.º: 7).
- 10 3. El péptido de la reivindicación 1 o 2, en el que todos los aminoácidos enantioméricos son aminoácidos "L".
4. El péptido de la reivindicación 1 o 2, que comprende al menos un aminoácido "D".
5. El péptido de la reivindicación 4, en el que todos los aminoácidos enantioméricos son aminoácidos "D".
6. El péptido de cualquier reivindicación precedente, en el que dicho péptido comprende adicionalmente al menos un grupo protector.
- 15 7. El péptido de la reivindicación 6, en el que dicho al menos un grupo protector está acoplado al extremo amino terminal y/o al extremo carboxilo terminal.
8. El péptido de la reivindicación 7, en el que un primer grupo protector está acoplado al extremo amino terminal y un segundo grupo protector está acoplado al extremo carboxilo terminal.
9. El péptido de la reivindicación 6 a 8, en el que cada uno de dichos al menos un grupo protector está seleccionado independientemente del grupo que consiste en acetilo, amida, grupos alquilo de 3 a 20 carbonos, Fmoc, grupo 9-fluorenoacetilo, grupo 1-fluorenocarboxílico, grupo 9-fluorenocarboxílico, grupo 9-fluorenona-1-carboxílico, benciloxicarbonilo, Xantilo (Xan), Tritilo (Trt), 4-metiltritilo (Mtt), 4-metoxitritilo (Mmt), 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo (Mtr), Mesitileno-2-sulfonilo (Mts), 4,4-dimetoxibenzhidrido (Mbh), Tosilo (Tos), 2,2,5,7,8-pentametilo-croman-6-sulfonilo (Pmc), 4-metilbencilo (MeOBzl), 4-metoxibencilo (MeOBzl), Benciloxi (BzIO), Bencilo (Bzl), Benzoilo (Bz), 3-nitro-2-piridinasulfenilo (Npys), 1-(4,4-dimetil-2,6-diclorociclohexilideno)etilo (Dde), 2,6-diclorobencilo (2,6-DiCl-Bzl), 2-clorobenciloxicarbonilo (2-Cl-Z), 2-bromobenciloxicarbonilo (2-Br-Z), Benciloximetilo (Bom), t-butoxicarbonilo (Boc), ciclohexiloxi (cHxO), t-butoximetilo (Bum), t-butoxi (tBuO), t-butilo (tBu), Acetilo (Ac), un grupo benzoilo, un grupo carbobenzoxi, un grupo propilo, un grupo butilo, un grupo pentilo, un grupo hexilo y Trifluoroacetilo (TFA).
- 20 10. El péptido de acuerdo con la reivindicación 8, el que dicho primer grupo protector es un grupo protector seleccionado del grupo que consiste en un grupo benzoilo, un acetilo, un propionilo, un carbobenzoxi, un propilo, un butilo, un pentilo, un hexilo y un alquilo de 3 a 20 carbonos.
11. El péptido de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 10, en el que dicho segundo grupo protector es una amida.
- 35 12. El péptido de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho grupo protector es un acetilo.
13. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que dicho péptido está mezclado con un excipiente farmacológicamente aceptable.
14. El péptido de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho excipiente farmacológicamente aceptable es adecuado para administración oral a un mamífero.
- 40 15. El péptido de acuerdo con la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en el que dicho péptido está formulado como una formulación de dosificación unitaria.
16. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-15 para su uso en la prevención o tratamiento de aterosclerosis.
- 45 17. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-15 para su uso en la prevención o tratamiento de una complicación coronaria asociada con una respuesta de fase aguda a una inflamación.

FIG. 1A

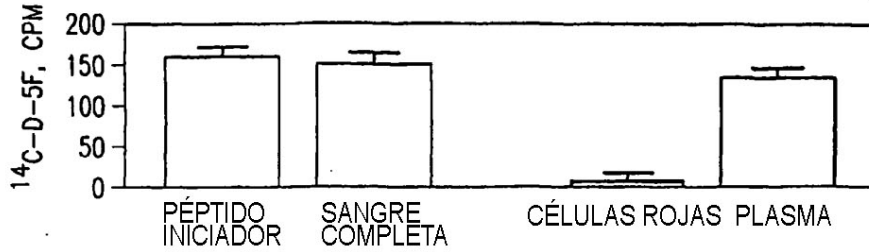


FIG. 1B

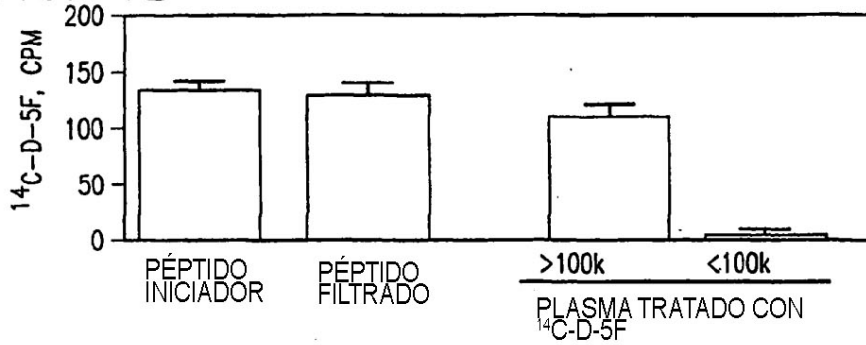


FIG. 1C

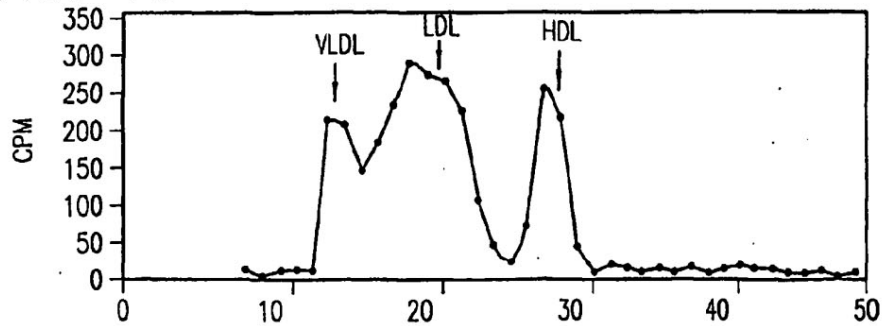
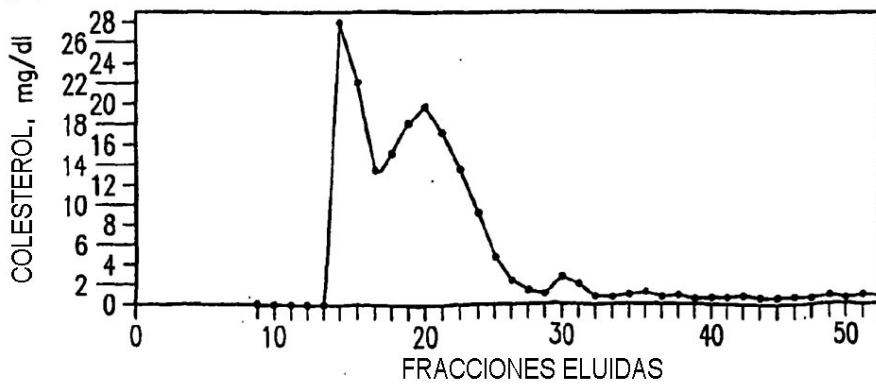


FIG. 1D



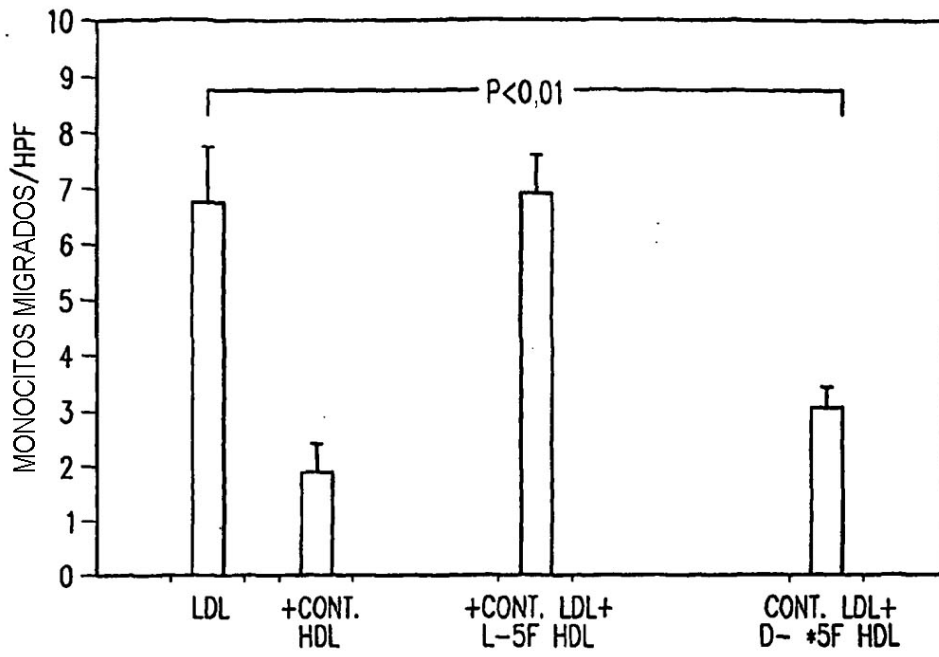


FIG. 2A

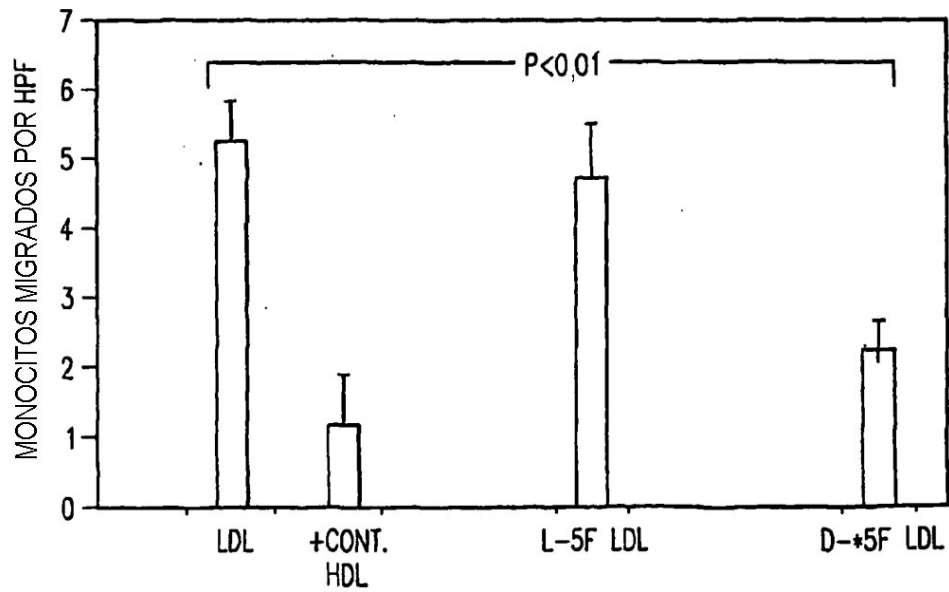


FIG. 2B

FIG. 3A

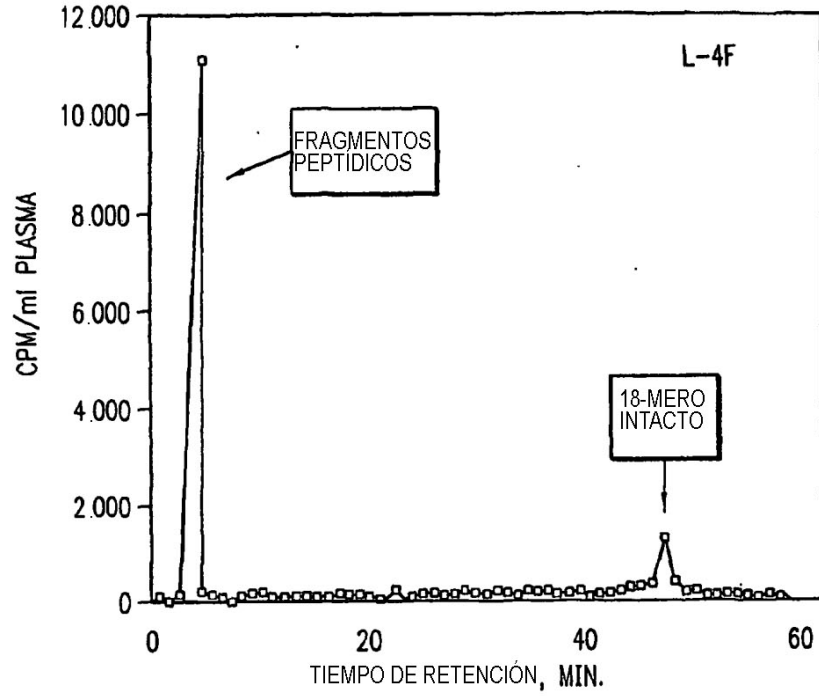


FIG. 3B

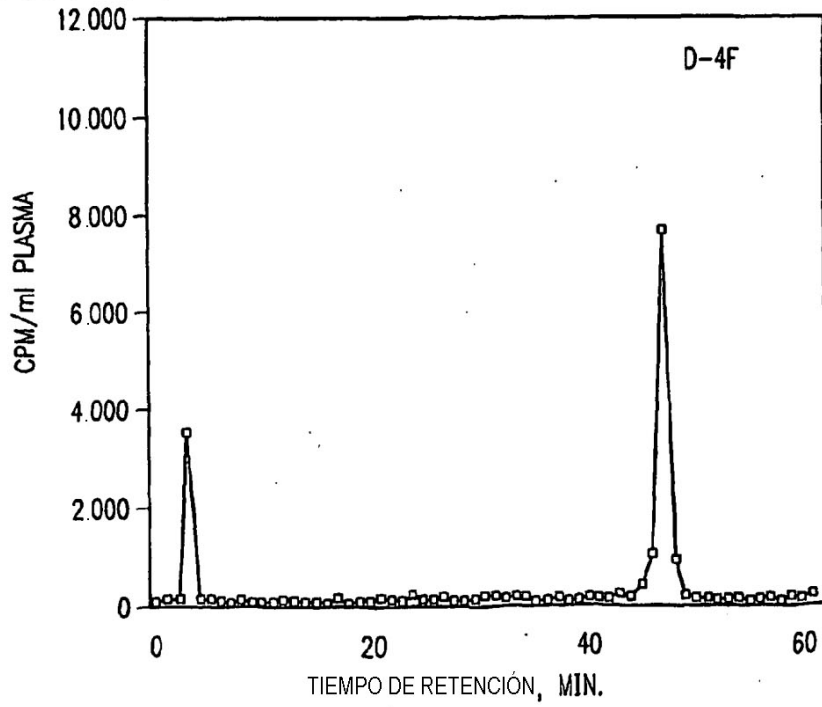




FIG. 4

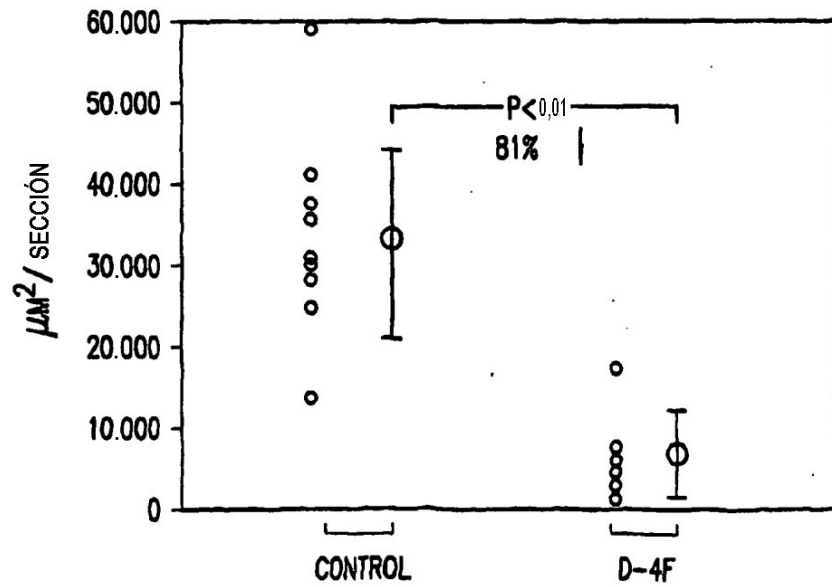
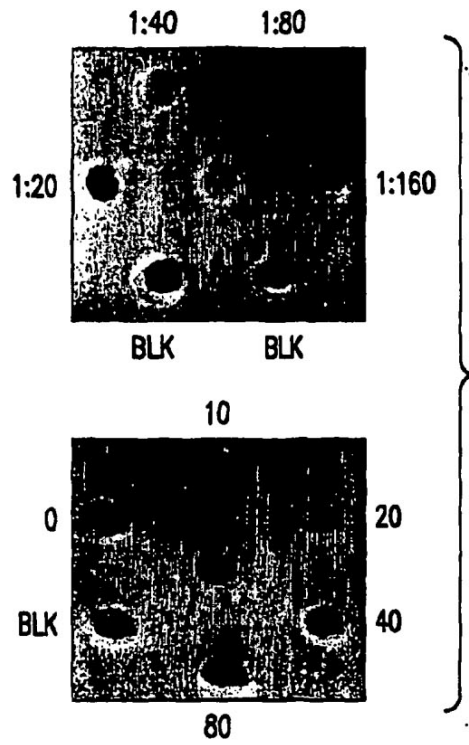
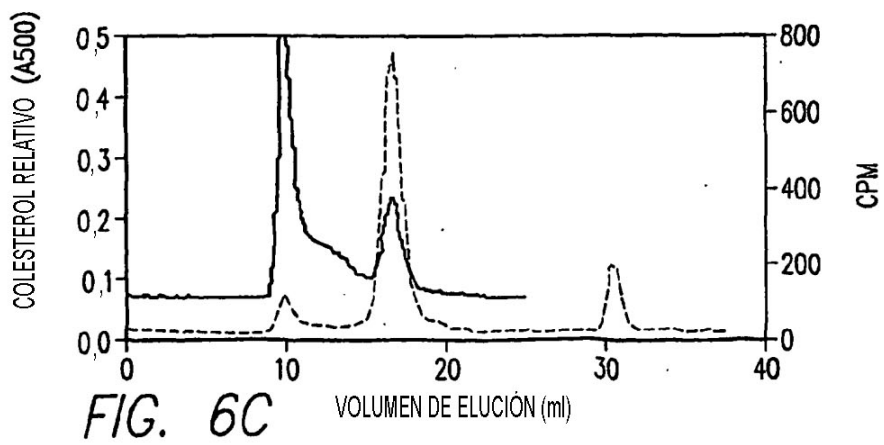
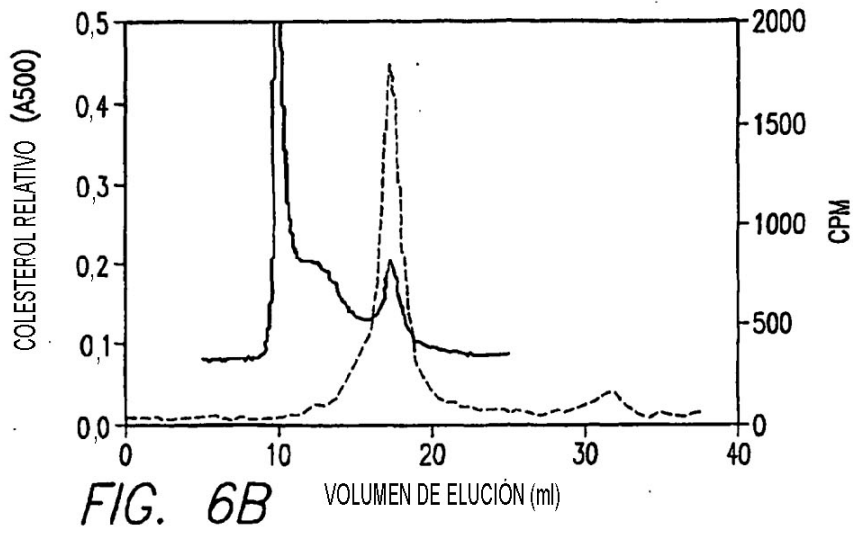
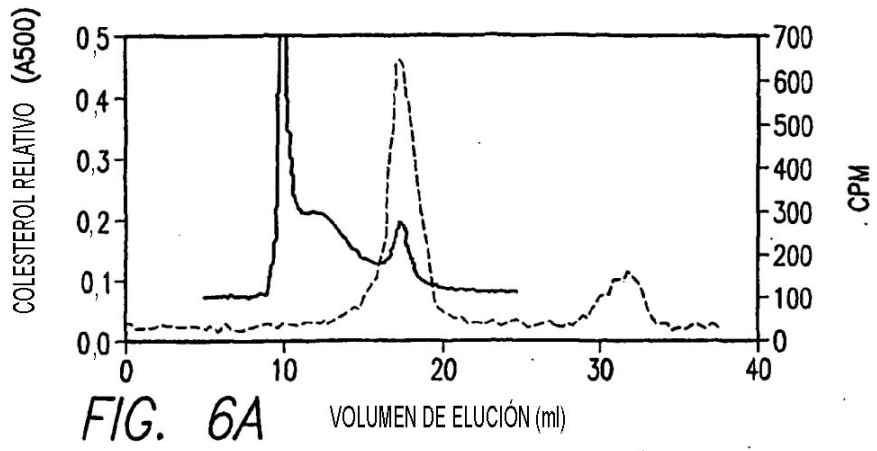


FIG. 5



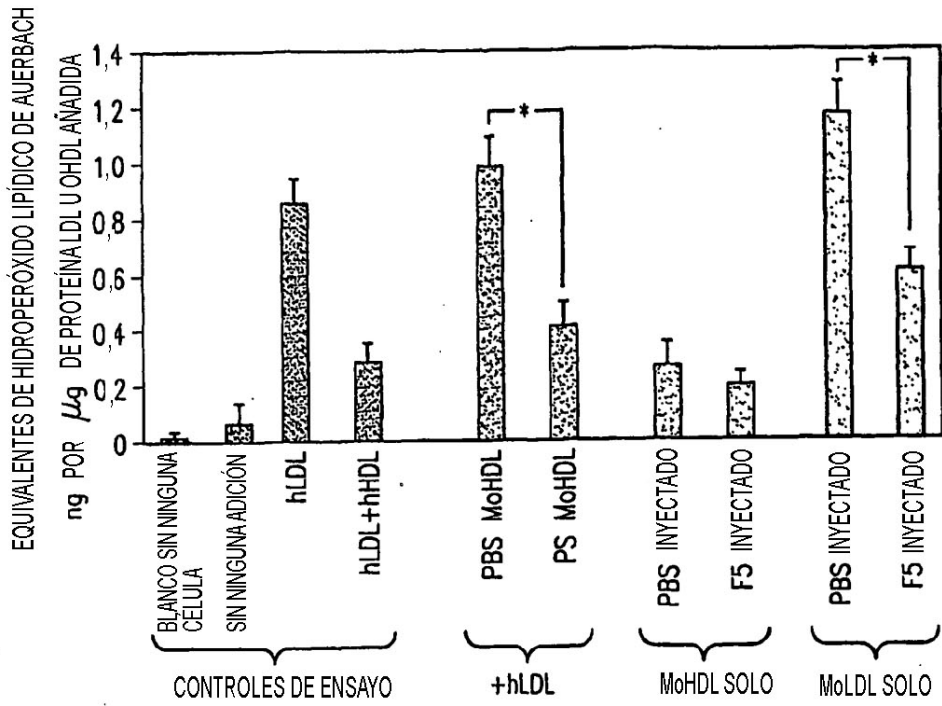


FIG. 7A

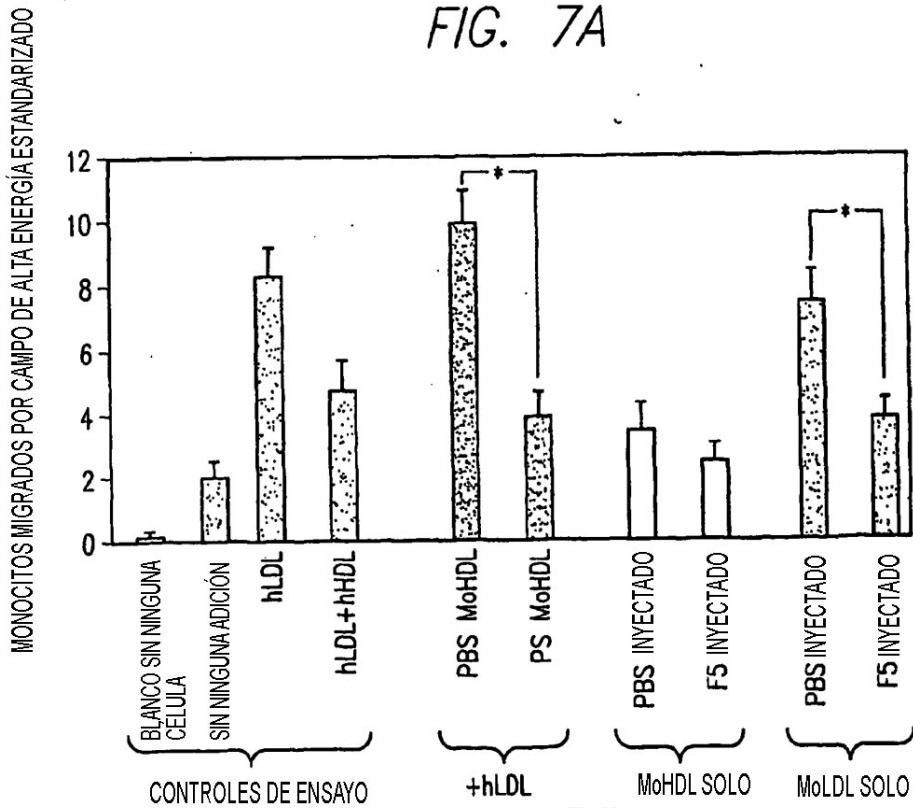


FIG. 7B

FIG. 8

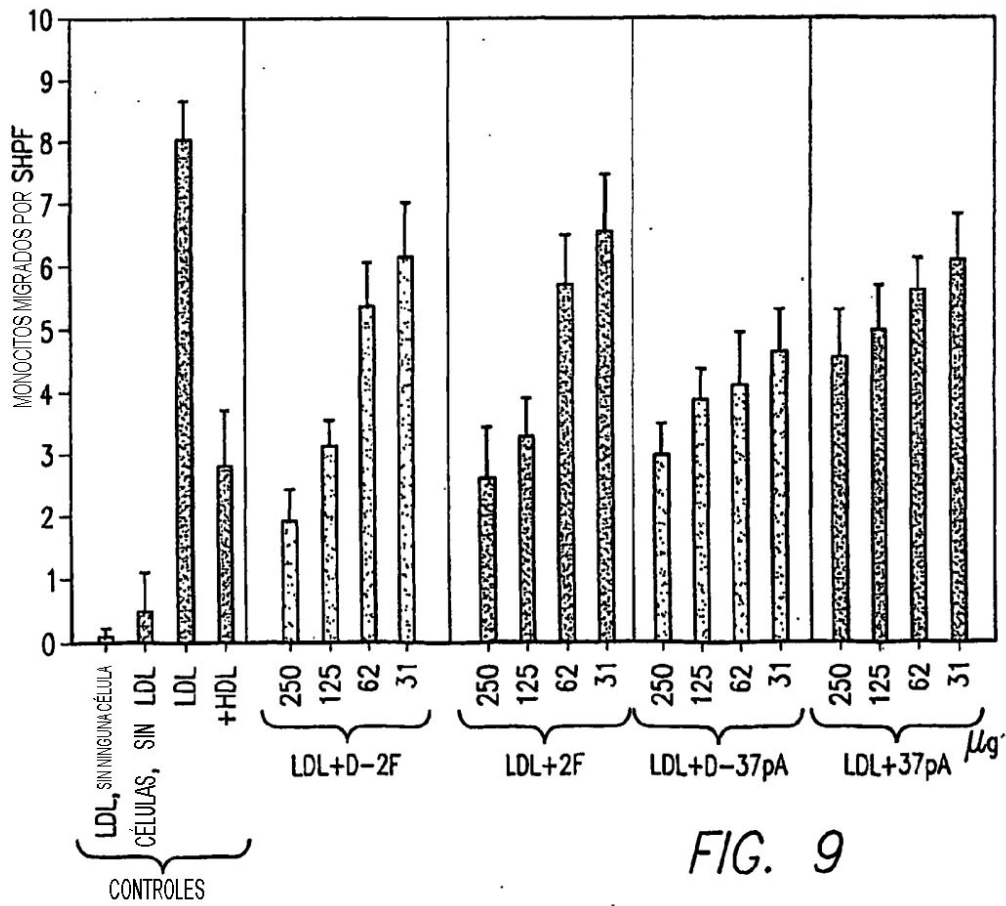
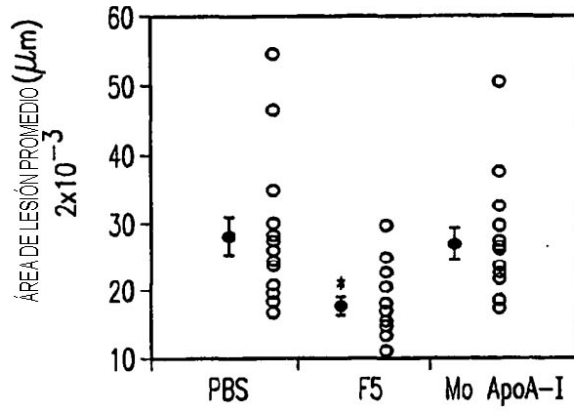


FIG. 9

FIG. 10A

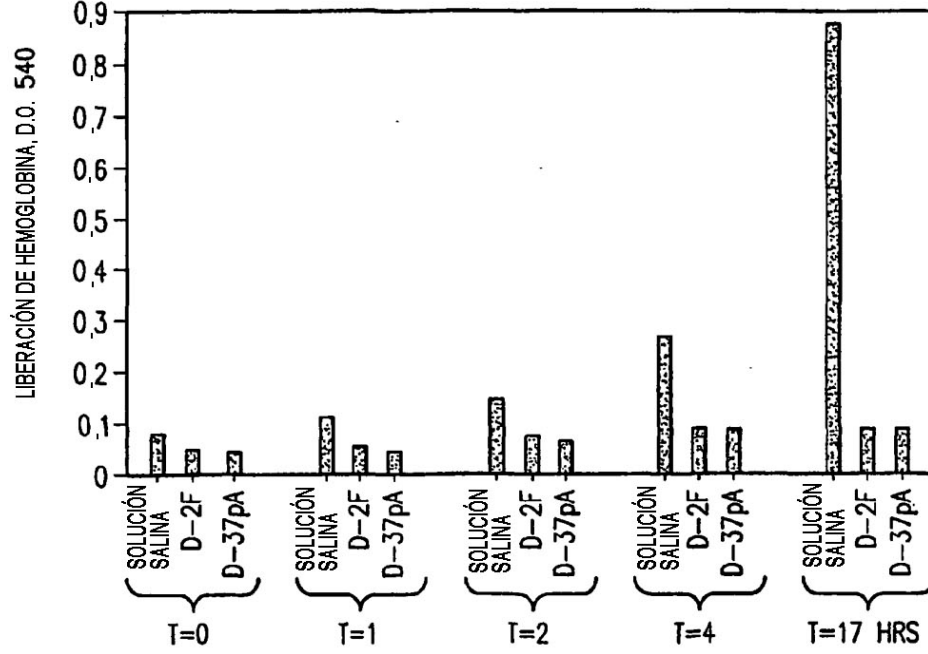
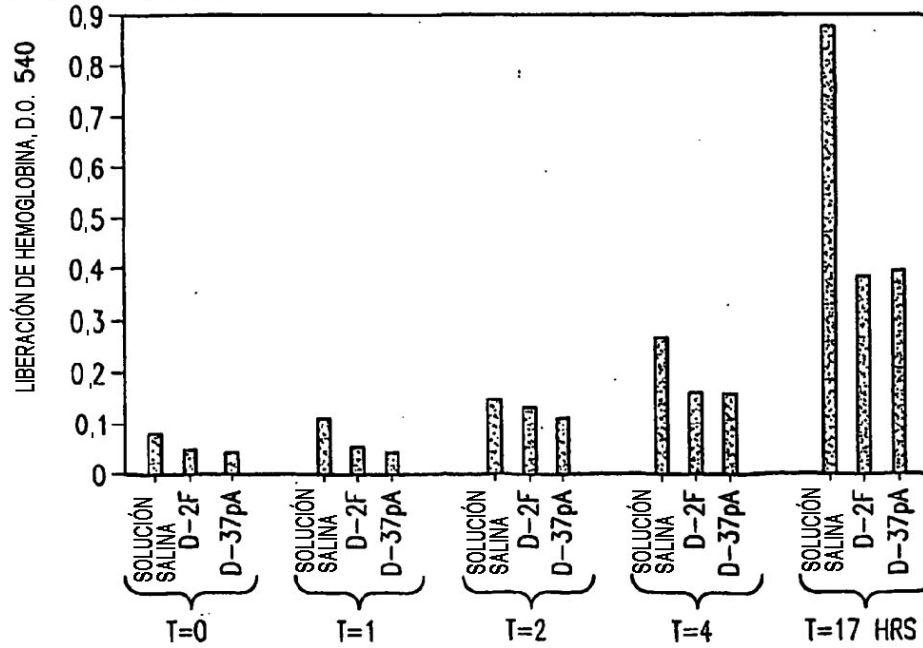


FIG. 10B



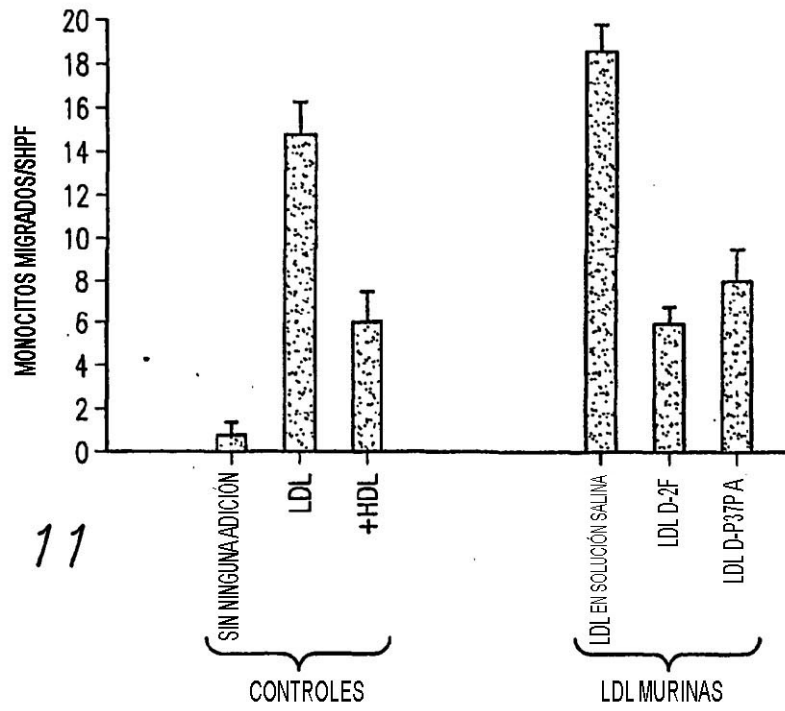


FIG. 11

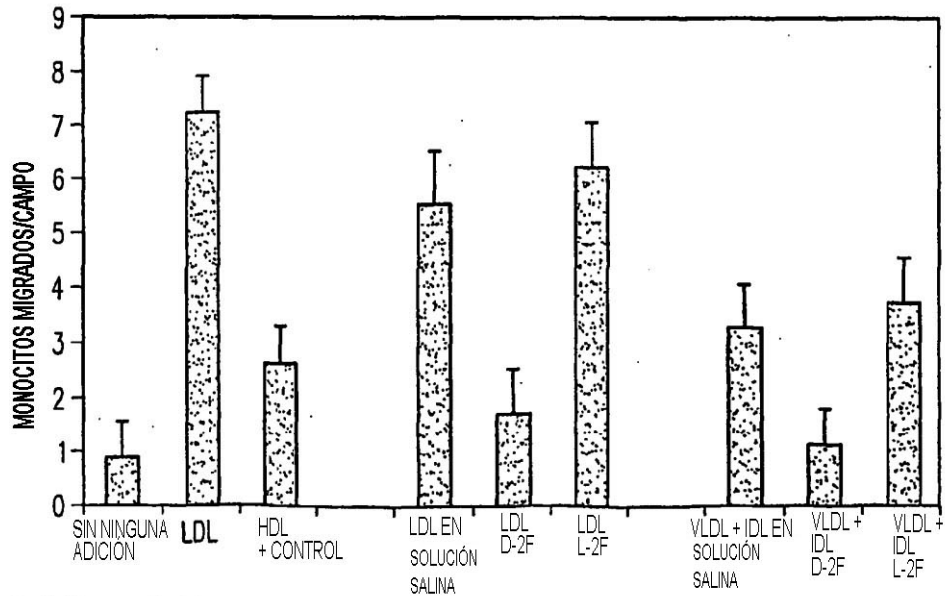
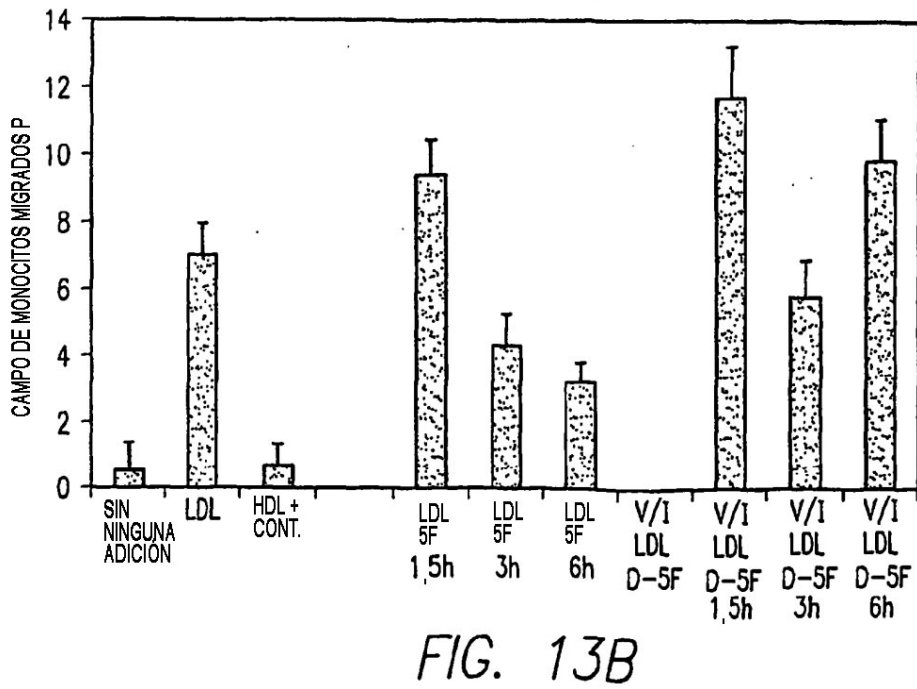
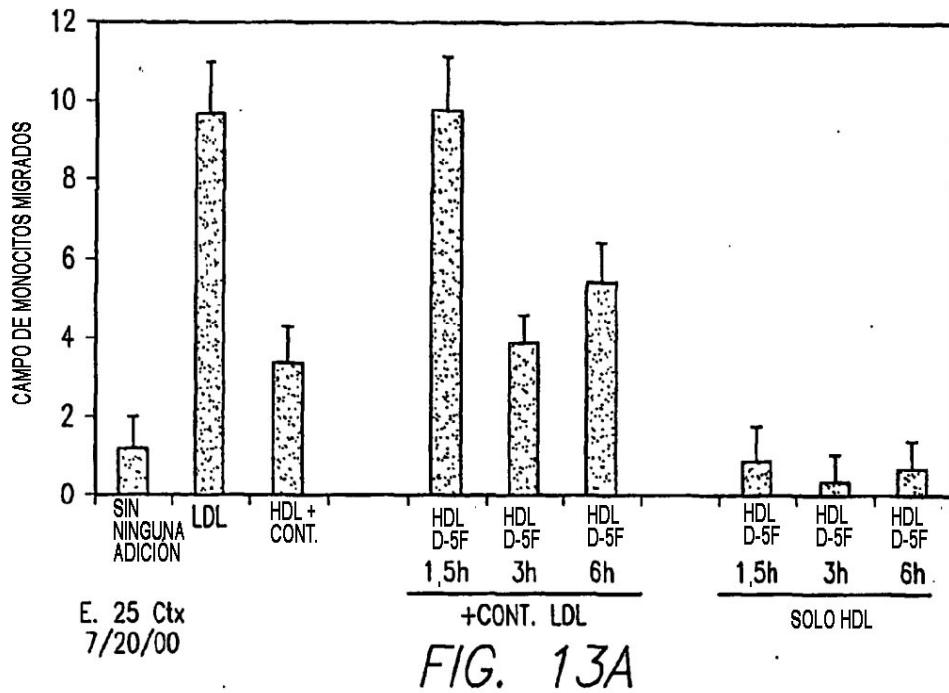


FIG. 12



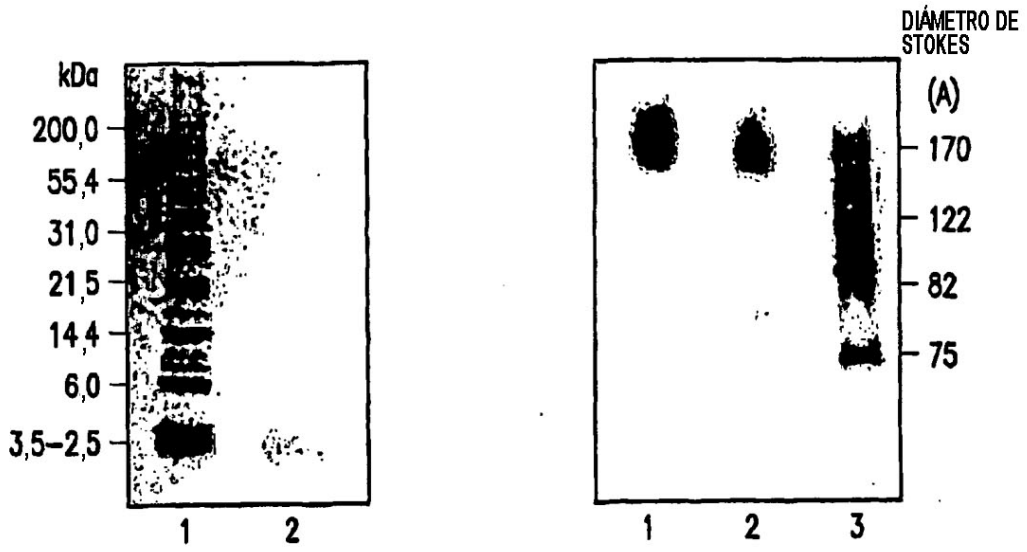


FIG. 14A

FIG. 14B

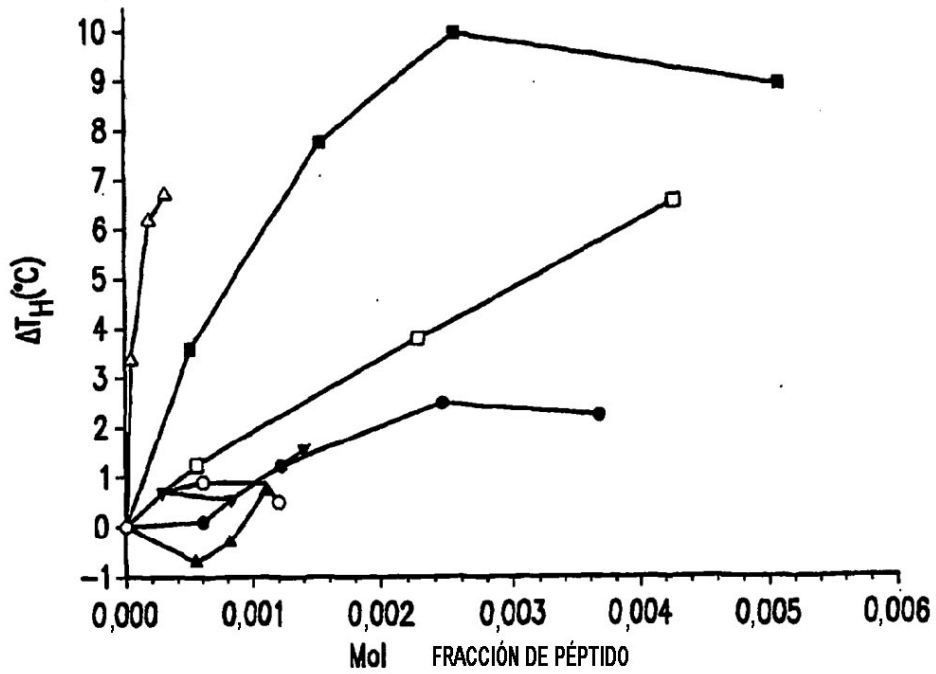


FIG. 15



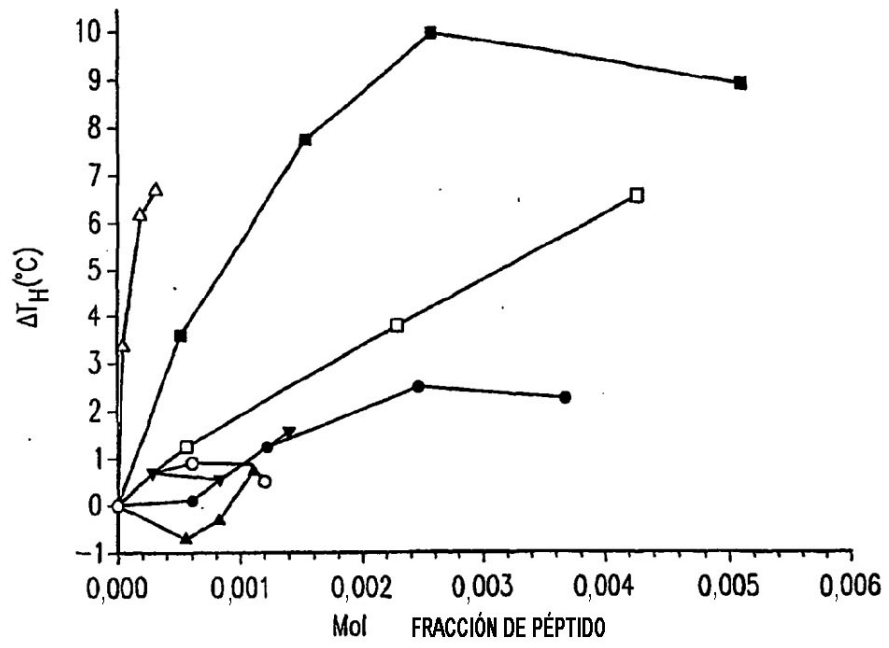


FIG. 16

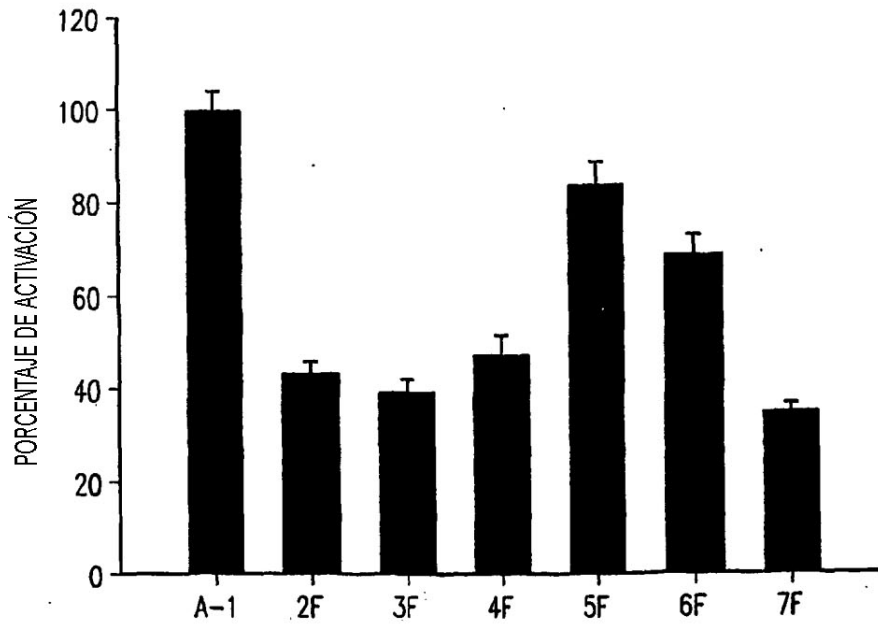


FIG. 17

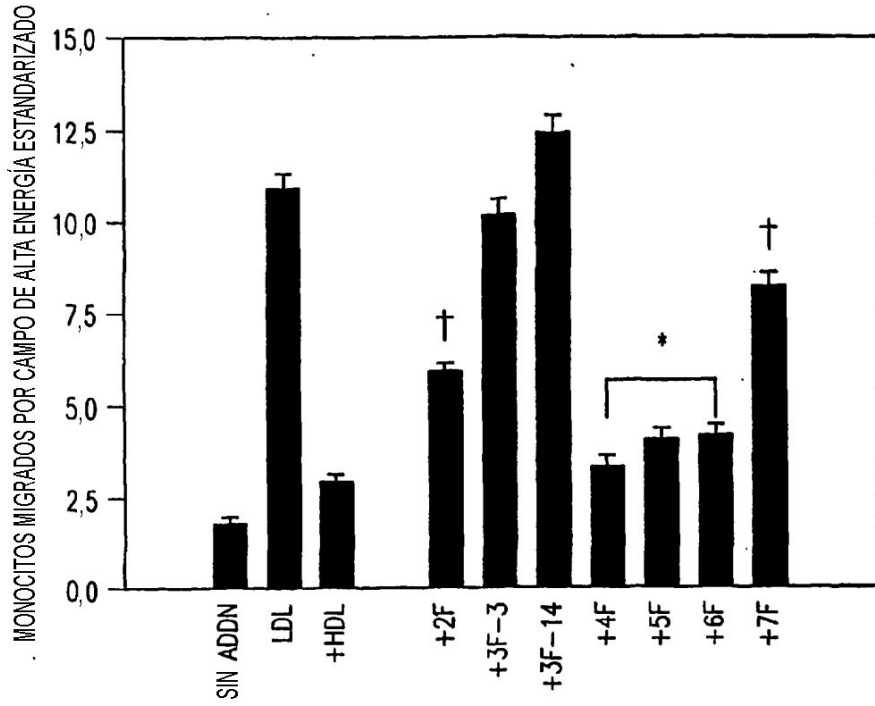


FIG. 18

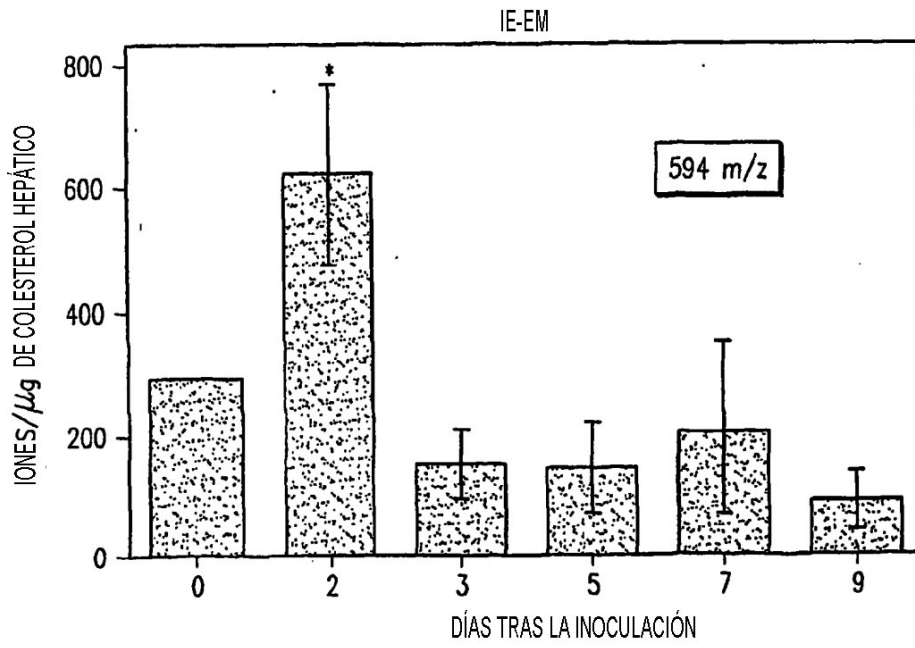


FIG. 19

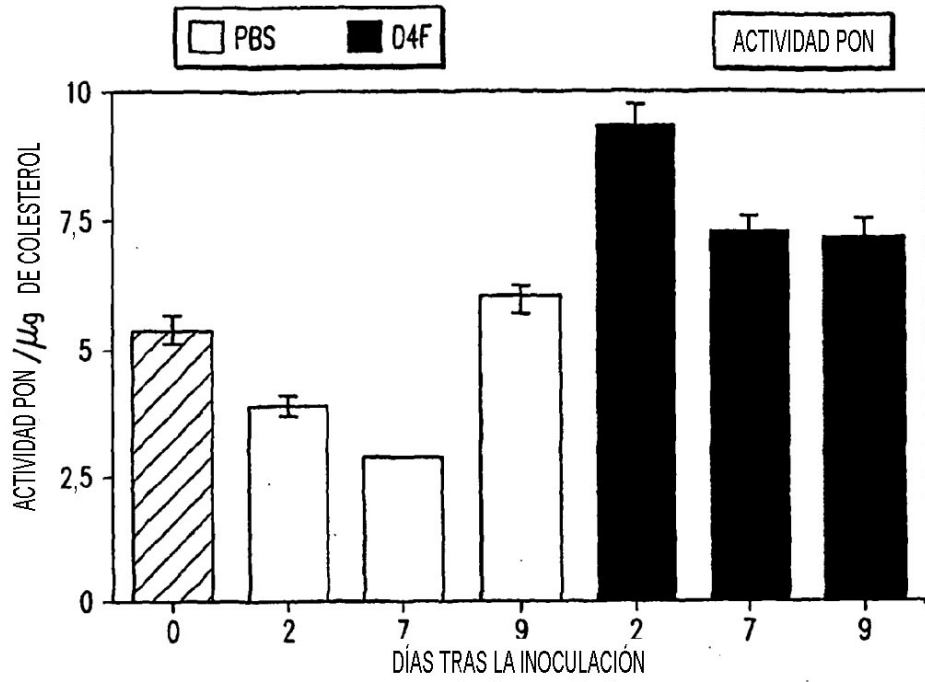


FIG. 20

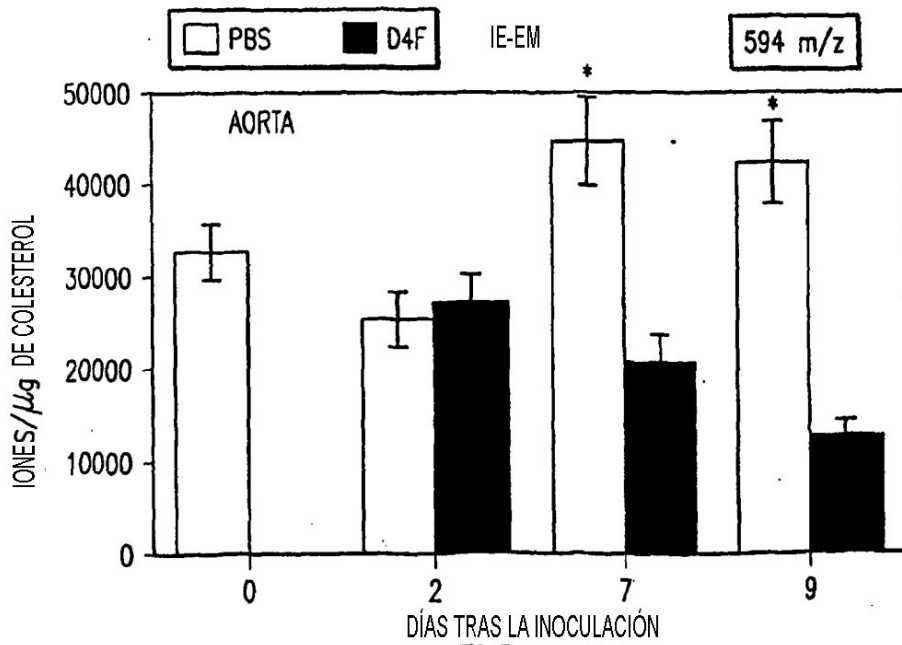


FIG. 21

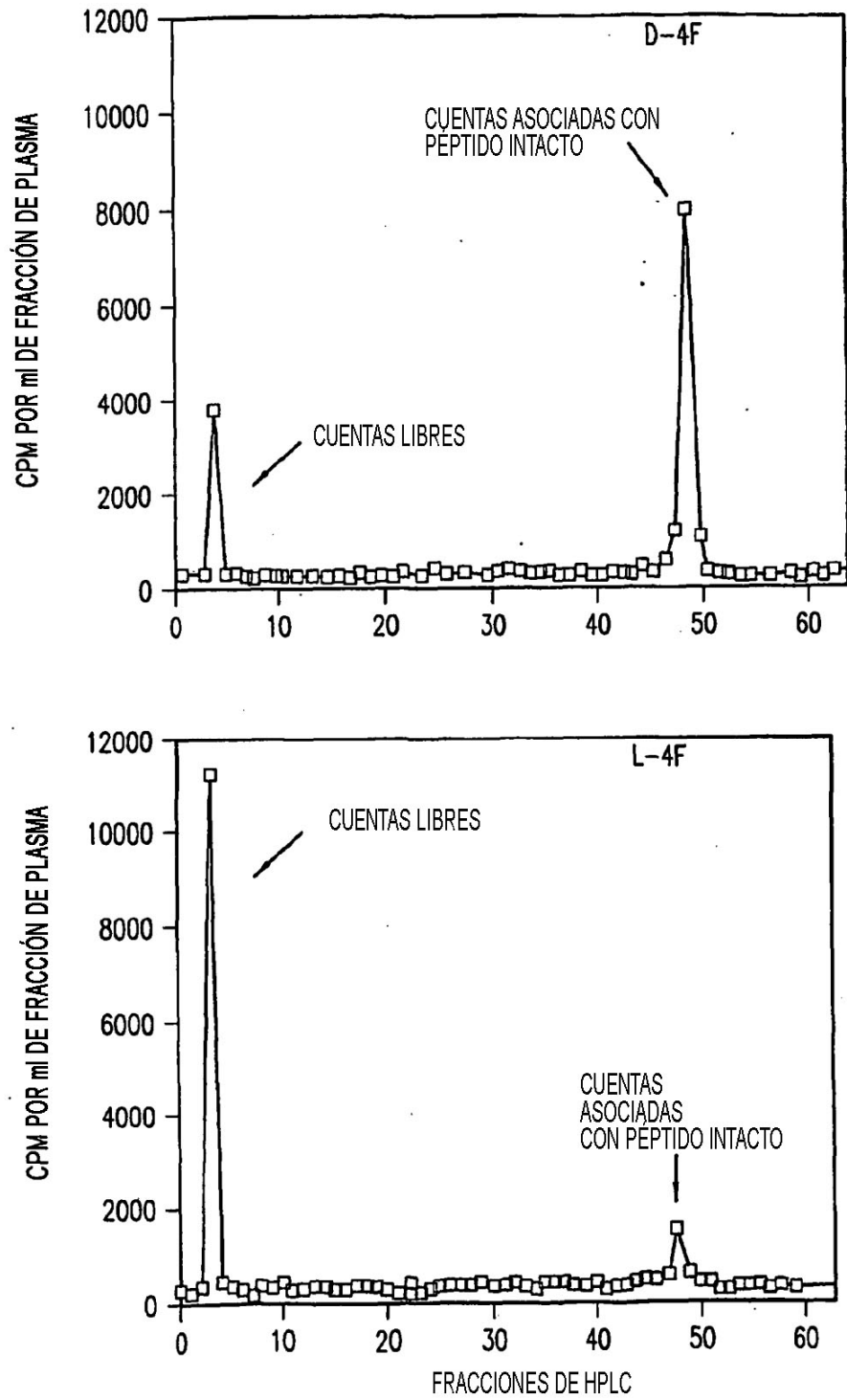


FIG. 22A



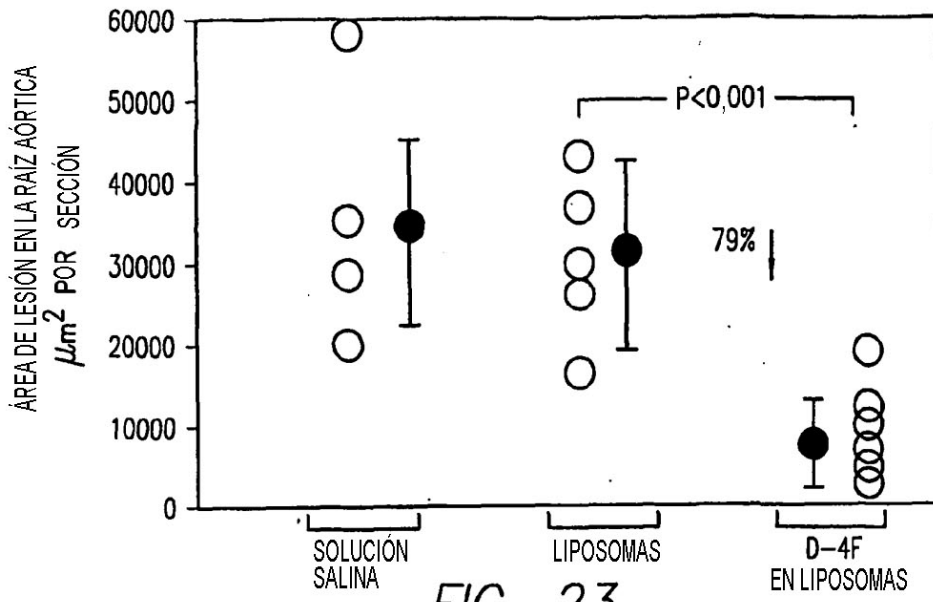


FIG. 23

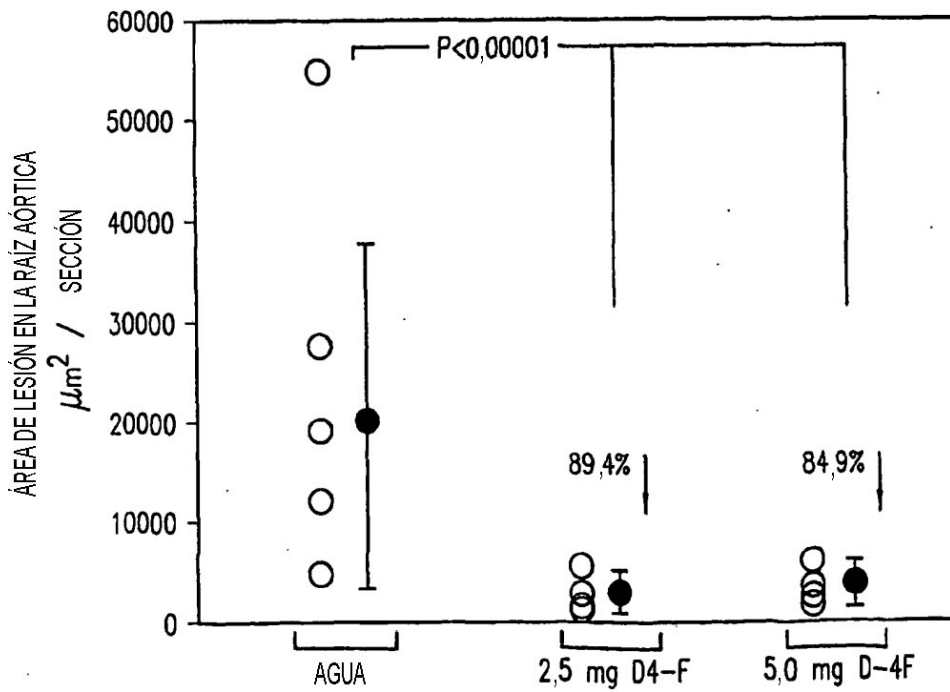


FIG. 24