

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 703**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/08** (2006.01)

**A61K 38/04** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2008 E 08782809 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013 EP 2190451**

54 Título: **Tratamiento de la aterosclerosis**

30 Prioridad:

**10.08.2007 AT 12582007**

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

**24.01.2014**

73 Titular/es:

**AFFIRIS AG (100.0%)  
KARL-FARKAS-GASSE 22  
1030 WIEN, AT**

72 Inventor/es:

**BRUNNER, SYLVIA;  
LÜHRS, PETRA;  
MATTNER, FRANK;  
SCHMIDT, WALTER y  
WITTMANN, BARBARA**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 439 703 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

Tratamiento de la aterosclerosis.

5 La invención se refiere a la prevención y al tratamiento de la aterosclerosis, de las enfermedades con un riesgo aterosclerótico y a las secuelas ateroscleróticas.

10 Las secuelas ateroscleróticas, como la enfermedad de oclusión arterial periférica, la coronaria cardiaca, así como la lesión cerebral apopléjica, se encuentran todavía entre las causas principales de muerte en Europa, Estados Unidos y en gran parte de Asia. El desarrollo de la aterosclerosis se considera como una inflamación progresiva crónica de la pared de los vasos arteriales, que se caracteriza por una interacción compleja de factores de crecimiento, citocinas e interacciones celulares. Según la hipótesis "respuesta a la lesión", la lesión del endotelio constituye el evento inicial de la enfermedad, que conduce a una disfunción endotelial, que propicia una cascada de interacciones celulares que culmina en la formación de las lesiones ateroscleróticas. Como factores de riesgo que promueven dicho daño, se mencionan influencias exógenas y endógenas que se correlacionan de modo estadísticamente significativo con la aterosclerosis. El aumento y la modificación del LDL Lp(a), la hipertensión arterial, la diabetes mellitus y la hiperhomocisteinemia, por ejemplo, se cuentan entre los factores más importantes que dañan el endotelio ya que el endotelio no constituye una barrera rígida, sino una extremadamente dinámica, teniendo lugar durante el curso de la disfunción endotelial diversos cambios moleculares además de un aumento en la permeabilidad para las lipoproteínas, presentando dichos cambios moleculares una influencia decisiva sobre la interacción de monocitos, linfocitos T y células endoteliales. La adhesión de monocitos y linfocitos T tiene lugar en la luz del vaso, por la expresión de moléculas de adhesión endotelial del tipo de las selectinas E, L y P, integrinas, ICMA-1, VCAM-1 y la molécula 1 de adhesión celular endotelial-plaquetaria. La migración subsiguiente de los leucocitos sobre el endotelio, está mediada por MCP-1, interleucina-8, PDGF, M-CSF y osteopontina. Mediante el receptor denominado "de barrido", los macrófagos y monocitos que residen en la íntima pueden tomar las partículas LDL que han penetrado y depositarlas como vacuolas de ésteres de colesterol en el citoplasma. Las células espumosas formadas de esta forma se agrupan principalmente en grupos en la región de la íntima del vaso y forman las lesiones veteadas que se presentan ya en la infancia. Las LDL son lipoproteínas de baja densidad y están formadas por los efectos catabólicos de enzimas lipolíticas a partir de las partículas VLDL ricas en triglicéridos. Además de sus propiedades dañinas sobre las células endoteliales y las células lisas musculares de la lámina media, LDL posee un efecto quimiotáctico sobre los monocitos y puede aumentar la expresión de MCSF y MCP-1 de las células endoteliales mediante la amplificación génica. Contrariamente a LDL, HDL puede tomar ésteres de colesterol de los macrófagos cargados, mediante la apolipoproteína E, bajo la formación de los complejos denominados dic. Mediante la interacción de los receptores SR-B1, estas partículas cargadas de ésteres de colesterol pueden unirse a hepatocitos o a células del córtex adrenal y entregar colesterol para la producción de ácidos biliares y esteroides, respectivamente. Este mecanismo se denomina transporte inverso del colesterol y dilucida la función protectora del HDL. Los macrófagos activados pueden presentar antígenos vía HLA-DR y por tanto, activar los linfocitos CD4 y CD8 que, consecuentemente, son estimulados a secretar citocinas, tales como IFN-gamma y TNF-alfa, y además, contribuir a aumentar la reacción inflamatoria. En el curso posterior de la enfermedad, las células lisas musculares de la lámina media empiezan a crecer en la región de la íntima que ha sido alterada por la inflamación. Por esto, se forma en este estadio la lesión intermedia. Iniciándose en la lesión intermedia, se desarrollará en el tiempo la lesión progresiva y complicada, que se caracterizará morfológicamente por un núcleo necrótico, detritus celulares y un casquete fibrinoso rico en colágeno en el lado de la luz del vaso. Si el número de células y la parte de los lípidos aumenta continuamente, se producen roturas en el endotelio, quedando expuestas las superficies con propiedades trombóticas. Debido a la adhesión y activación de trombocitos en estas roturas, se liberarán gránulos que contienen citoquinas, factores de crecimiento y trombina. Los enzimas proteolíticos de los macrófagos son responsables del adelgazamiento del casquete fibrinoso que, por lo menos, llevará a una ruptura de las placas, con posterior trombosis y estrechamiento de los vasos y una isquemia aguda de los vasos terminales.

Varios factores de riesgo son responsables en la formación de las lesiones ateroscleróticas. La hiperlipoproteinemia, la hipertensión arterial y el abuso de la nicotina tienen un significado particular a este respecto. Una patología que implica un aumento excesivo en el colesterol LDL y total, es la hipercolesterolemia familiar (FH). Pertenece a las enfermedades metabólicas más frecuentes que se heredan monogénicamente. La forma heterocigótica moderada se presenta con una frecuencia de 1:500, y la homocigótica, del 1:1 millones, más raramente, de forma clara. Las causas de la hipercolesterolemia familiar son mutaciones en el gen receptor LDL en el brazo corto del cromosoma 19. Estas mutaciones pueden ser deleciones, inserciones o mutaciones puntuales. El hallazgo característico de las lipoproteínas en la hipercolesterolemia familiar es un aumento en el colesterol LDL y total en las concentraciones la mayor parte normales de VLDL y triglicéridos. A menudo el HDL disminuye. Fenotípicamente, existe una hiperlipoproteinemia de tipo IIa. En la forma heterocigótica, el colesterol total aumenta de 2 a 3 veces, y en la homocigótica, de 5 a 6 veces, comparado con el nivel normal. Clínicamente, la hipercolesterolemia familiar se manifiesta por una temprana esclerosis coronaria. Habitualmente, en los hombres heterocigóticos, los primeros síntomas de una patología cardiaca coronaria (CHD) se presentan entre los 30 y 40 años de edad. En las mujeres, como promedio, 10 años después. El 50% de los hombres afectados mueren debido a las consecuencias de su esclerosis coronaria antes de los 50 años de edad. Además de los niveles masivamente

aumentados de LDL, también una disminución de las concentraciones de HDL son responsables de un rápido progreso de la aterosclerosis. Los cambios ateroscleróticos pueden hacerse manifiestos también en los vasos extracardiacos, tales como la aorta, las arterias carótidas y las periféricas. Con la forma homocigótica de la enfermedad, la esclerosis coronaria se desarrolla ya a edad temprana. El primer infarto miocárdico tiene lugar a menudo antes de los 10 años de edad, y en la mayoría de los casos, las personas afectadas mueren antes de que alcancen los 20 años. El desarrollo de xantomas está en función del nivel sérico del colesterol y de la duración de la enfermedad. Aproximadamente, el 75% de los individuos heterocigóticos que sufren la enfermedad que tienen más de veinte años, muestran xantomas tendinosos. Los individuos homocigóticos tienen xantomas dérmicos y tendinosos en casi el 100%. Pueden también presentarse depósitos lipídicos en los párpados y en la córnea (xantelasmas, Arcus lipoides). Estos, sin embargo, no constituyen un síntoma específico de una hipercolesterolemia, ya que se encuentran también con niveles normales de colesterol. Además, con FH, se presentan frecuentemente artritis aguda y tendosinovites. Las lipoproteínas individuales difieren con respecto a tamaño y densidad, ya que contienen partes voluminosas de forma diferente de lípidos y proteínas, denominadas apoproteínas. La densidad aumenta con porciones proteicas que se incrementan y de lípidos que disminuyen. Debido a sus densidades distintas, pueden separarse en diferentes fracciones mediante ultracentrifugación. Esto constituye la base para la clasificación de las lipoproteínas en sus grupos principales: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia, (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas (a) (Lp(a)). Entre las lipoproteínas con un alto potencial aterogénico se encuentran en primer lugar LDL, Lp(a) y VLDL. LDL posee una densidad de aproximadamente  $d=1.006-1.063$  g/ml. El núcleo está formado por moléculas de colesterol esterificado. Este núcleo altamente hidrófobo está rodeado por una envoltura de fosfolípidos, colesterol no esterificado y una única molécula Apo B-100. Además, la Apoproteína E se encuentra en la superficie de las partículas LDL. La función de LDL consiste en transportar colesterol a los tejidos periféricos donde mediante la intervención de la apoproteína B100 es tomado por las células vía el receptor de LDL. En estados epidemiológicos globales, pudo demostrarse una correlación positiva entre el nivel del colesterol sérico y la presentación de una patología cardíaca coronaria. Los niveles de colesterol LDL superiores a 160 mg/dl constituyen un alto riesgo cardiovascular. Además del nivel del colesterol LDL, también ejerce un papel importante el nivel del colesterol HDL protector del vaso, cuando se evalúa el perfil de riesgo para las enfermedades cardiovasculares. Los niveles inferiores a 35 mg/dl se asocian con un aumento del riesgo. VLDL son lipoproteínas con baja densidad ( $d=0.94-1.006$  g/ml) y una parte alta en triglicéridos. Sustancialmente, VLDL contienen apoproteína C, y pequeñas porciones de apoproteínas B-100 y E. De forma distinta a los quilomicrones, VLDL no consisten en lípidos alimentarios, si no que se sintetizan en el hígado a partir de triglicéridos formados endógenamente y secretados a la circulación. Como con los quilomicrones, los triglicéridos son hidrolizados por la apoproteína C-II, y los ácidos grasos libres son suministrados al músculo y al tejido graso. Los restos de VLDL ricos en colesterol que permanecen, se denominan lipoproteínas de densidad intermedia, a causa de su densidad más alta. La lipoproteína (a) (Lp(a)) posee una densidad de 1,05 a 1,12 g/ml y se parece a LDL en su composición. Además, la apoproteína B-100, su porción proteica, consiste en la apoproteína (a), que es característica de Lp(a). Hasta la fecha, se conoce muy poco acerca de la fisiología y función de Lp(a), ya que la molécula de apoproteína (a) posee una alta homología secuencial con el plasminógeno, se asume que Lp(a), promueve tanto la formación de trombos sobre las placas ateroscleróticas, como posee un efecto aterogénico. Lp(a) se encuentra junto con apoproteína B en las lesiones ateroscleróticas. Los estudios retrospectivos han mostrado una correlación entre el aumento de Lp(a) y CHD. Igualmente, el metaanálisis de numerosos estudios de prospección ha mostrado que Lp(a) constituye un factor de riesgo independiente para que se produzca un CHD. Los niveles de entre 15 y 35 mg/dl se consideran normales, no pudiendo Lp(a) ser influenciado ni por la dieta ni por medicamentos. Por tanto, las medidas terapéuticas están restringidas a reducir ulteriormente los factores de riesgo. En particular, una bajada del colesterol LDL parece disminuir el riesgo cardiovascular de Lp(a). En la patogénesis de la aterosclerosis, se atribuye además, una importancia patofisiológica considerable, a los factores de coagulación. Los hallazgos epidemiológicos sugieren una correlación entre la concentración de fibrinógeno en el plasma y el desarrollo de una enfermedad cardíaca coronaria, y, de forma primaria, un infarto miocárdico. En este contexto, niveles aumentados ( $> 300$  mg/dl) mostraron ser un indicador independiente y un factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares. También, todavía, altas concentraciones del inhibidor tPA-I del activador del plasminógeno tisular, están asociadas con la presencia de CHD. La relación entre la hipertrigliceridemia y el riesgo coronario es diferente en cada caso, dependiendo de la causa de la elevación de los lípidos sanguíneos. A pesar de la discusión de si los triglicéridos tienen que considerarse o no como un factor independiente de riesgo, es indiscutible que juegan un papel importante en la patogénesis de las enfermedades cardíacas coronarias. La incidencia de la enfermedad es la más alta en pacientes que muestran altos niveles de colesterol LDL y de triglicéridos.

La proteína de transferencia del éster de colesterol (CETP) es una glicoproteína plasmática estable que es responsable de la transferencia de lípidos neutros y fosfolípidos entre las lipoproteínas, y que regula por disminución la concentración plasmática de HDL. La inhibición de la actividad de transferencia del lípido CETP ya ha sido sugerida como una aproximación terapéutica para aumentar el nivel plasmático de HDL. Existen razones numerosas que sugieren que la reducción de la actividad de CETP en el plasma conducirá a un aumento en los niveles de HDL. De este modo, CETP disminuye la concentración de HDL mediante la transferencia de ésteres de colesterol desde HDL a LDL y VLDL. En experimentos animales con conejos y hámsteres, la inhibición transitoria de CETP con anticuerpos monoclonales CETP, oligonucleótidos no codificantes o inhibidores de CETP condujeron al aumento en los niveles de HDL. La inhibición duradera de CETP con oligonucleótidos no codificantes, aumentó los niveles de HDL y, por tanto, condujo a una reducción de las lesiones ateroscleróticas en el modelo animal del conejo para la

aterosclerosis.

En la literatura, se describen varios inhibidores de CETP, algunos de los cuales se encuentran en ensayos clínicos (por ejemplo, Anacetrapib (Krishna R., Lancet 370 (9603) (2007): 1907-14) y Torcetrapib (Sikorski, J.A., J. Med. Chem. 49 (1) (2006): 1-22)).

En la patente US nº 5.512.548 y el documento WO 93/011782, se describen polipéptidos y sus análogos que pueden inhibir CETP que cataliza la transferencia de ésteres de colesterol desde HDL a VLDL y LDL, y, por tanto, tienen actividad anti-aterosclerótica si se administran a un paciente. Según estos documentos, tal inhibidor polipéptido inhibidor de CETP se deriva de la apolipoproteína C-I de diversas fuentes, donde fragmentos especialmente N-terminales hasta 36 aminoácidos se han identificado como inhibidores de CETP.

También, en el documento US 5.880.095A, se da a conocer un péptido de unión CETP que es capaz de inhibir la actividad de CETP en un individuo. La proteína inhibitoria de CETP comprende un fragmento N-terminal de apolipoproteína C-III porcina.

En los documentos US 2006/0276400 y WO 96/034888 se dan a conocer péptidos que se derivan de CETP y comprenden epítomos de células T y/o B. Estos péptidos pueden inducir in vivo la formación de anticuerpos CETP específicos.

En los documentos US 2004/0087481 y US 6.410.022 B1, se dan a conocer péptidos que, a causa de la inducción de una respuesta inmune CETP específica, pueden utilizarse para el tratamiento y la prevención de patologías cardiovasculares, tales como, por ejemplo, aterosclerosis. Estos péptidos comprenden un epítomo de células T auxiliaadoras que no se deriva de CETP, y por lo menos, un epítomo de células B que procede de CETP y puede derivarse directamente del último. El epítomo de células T auxiliaadoras se deriva ventajosamente del toxoide tetánico y de una covalentemente a, por lo menos, un epítomo de células B de CETP. Utilizando un epítomo de células T auxiliaadoras que es extraño al organismo, es posible inducir anticuerpos en el organismo de un individuo los cuales se dirigen contra aquella parte del péptido que está formada, por lo menos, de un epítomo célula B-CETP.

En Mao D et al (vacuna 24(2006): 4942-4950), se describe la utilización de un plásmido que comprende una molécula ácido que codifica un epítomo célula B de CETP como vacuna.

En el documento WO 2006/029982 CETP, se describen mimotopos para utilizarse en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de la aterosclerosis.

Muy recientemente, se ha sugerido ya un enfoque vacunal con respecto a CETP. De este modo, por ejemplo, se trataron conejos con una vacuna que contenía aquel péptido de CETP responsable de la transferencia del éster de colesterol como un antígeno. Los conejos inmunizados mostraban una actividad CETP reducida, y niveles alterados de lipoproteínas con un aumento de HDL y una reducción en los valores LDL. Además los animales de ensayo tratados del modelo aterosclerótico mostraron también lesiones ateroscleróticas reducidas en comparación con los animales de control.

Los resultados de un estudio de una fase clínica II se publicaron, cuyo estudio se había llevado a cabo por la compañía americana Avant de biotecnología con la vacuna CETi-1 (BioCentury Extra For Wednesday, Octubre 22, 2003). En este estudio de la fase II, justamente como en el estudio de la fase precedente I, se probó un perfil de seguridad muy bueno, sin ningún efecto secundario capaz de cuestionarse que permitió concluir que no se esperarían, básicamente, efectos secundarios del enfoque de vacunación anti-CETP. Respecto a la eficacia, sin embargo, la vacuna Avant resultó decepcionante, ya que no condujo a obtener un aumento en los niveles de HDL significativamente mejores que los alcanzados mediante un tratamiento placebo.

El problema con la vacuna CETi-1 es que utiliza antígenos endógenos. El sistema inmunitario humano es tolerante respecto a estructuras endógenas, ya que con la mayoría de las moléculas endógenas –distintas que con CETP- es vital que no se formen autoanticuerpos. Así, el objetivo de la vacuna CETi-1 fue romper la tolerancia endógena, el cual, aparentemente, no se ha conseguido en un grado suficiente.

Así, constituye el objetivo de la presente invención proporcionar antígenos para una vacuna anti-CETP que se seleccionan de forma que se consideren como extraños por el sistema inmune, y por tanto, no requieran romper una autotolerancia. Estos antígenos pueden utilizarse para prevenir y/o tratar la aterosclerosis y sus secuelas.

Por tanto, la presente invención se refiere a un compuesto que comprende la secuencia aminoácida FGFP AHVFIDWLQSL S o FGFP AHVYIDWLQSL S o FGFP AHVFIDWLQSLN para utilizarla en la prevención y/o tratamiento de la aterosclerosis, enfermedad oclusiva arterial periférica, enfermedad cardiaca coronaria o daño cerebral apoplético.

La presente invención proporciona mimotopos CETP con este propósito. Estos mimotopos pueden inducir anticuerpos que pueden inhibir la actividad CETP enzimática. Los mimotopos CETP según la presente invención son

preferentemente polipéptidos antigénicos que en su secuencia aminoácida varían desde la secuencia aminoácida de CETP o de fragmentos de CETP. Los antígenos de la invención que inducen anticuerpos anti-CETP pueden ensamblarse con aminoácidos D- o L- o de combinaciones de aminoácidos DL- y, opcionalmente, pueden haberse cambiado mediante modificaciones posteriores, cierres de anillos, o derivatizaciones. Según la invención, sin embargo, puede asimismo utilizarse muy bien péptidos más largos como antígenos que induzcan anticuerpos anti-CETP. Además, los mimotopos de la presente invención pueden también formar parte de un polipéptido y, consecuentemente, incluir en su extremo N- y/o C, por lo menos, otro residuo aminoácido más.

Los mimotopos de la presente invención pueden unirse a anticuerpos que pueden obtenerse mediante la administración de C-FGFPEHLLVDFLQSL (16 aminoácidos C-terminales de la proteína CETP), acoplado a KLH u otros transportadores para mamíferos. Una vez administrado a un mamífero, los mimotopos pueden inducir una respuesta inmunitario correspondiente, de forma que los anticuerpos dirigidos contra CETP se produzcan en dicho mamífero.

Los mimotopos de CETP (es decir, antígenos que inducen anticuerpos anti-CETP) de la presente invención, pueden identificarse y prepararse mediante varios procedimientos, que incluyen bibliotecas fágicas o peptídicas. Pueden producirse e identificarse, por ejemplo, mediante métodos de química combinatoria o de técnicas de escaneo de alto rendimiento para las estructuras de gran variabilidad (Display: A Laboratory Manual by Carlos F. Barbas (Editor), *et al.*; Willats WG Phage display: practicalities and prospects. Plant Mol. Biol. 2002; 50(6):837-54).

Además, según la invención, también pueden utilizarse los antígenos que inducen anticuerpos anti-CETP, basados en ácidos nucleicos ("aptámeros"), y estos, también pueden encontrarse con las bibliotecas más variadas (oligonucleótidos) (por ejemplo, con 2-180 residuos de aminoácidos) (por ejemplo, Burgstaller *et al.*, Curr. Opin. Drug Discov. Dev. 5 (5) (2002), 690-700; Famulok *et al.*, Acc. Chem. Res. 33 (2000), 591-599; Mayer *et al.*, PNAS 98 (2001), 4961-4965, etc.). En antígenos que inducen anticuerpos anti-CETP que se basan en ácidos nucleicos, la estructura del ácido nucleico puede proporcionarse, por ejemplo, por los compuestos naturales fósforo-di-éster, o también por los fósforotivatos o combinaciones o variaciones químicas (por ejemplo, como PNA), donde como bases, según la invención, pueden utilizarse primariamente U, T, A, C, G, H y mC. Los residuos 2' de los nucleótidos que pueden utilizarse según la presente invención, son preferentemente H, OH, F, Cl, NH<sub>2</sub>, O-metil, O-etil, O-propil o O-butil, donde los ácidos nucleicos pueden también modificarse de forma distinta, es decir, por ejemplo, con grupos protectores, pues ellos se utilizan habitualmente en la síntesis de oligonucleótidos. De este modo, los antígenos que inducen anticuerpos anti-CETP que se basan en aptámeros constituyen asimismo antígenos que inducen anticuerpos anti-CETP preferidos, dentro del alcance de la presente invención.

Según la presente invención, el término "mimotopo" se refiere a una molécula que presenta una conformación que tiene una topología equivalente al epítipo del cual es una imitación. El mimotopo se une a la misma región de unión antigénica de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un antígeno deseado. El mimotopo provocará una respuesta inmunológica en un huésped que es reactivo para el antígeno del cual es un imitador. El mimotopo puede actuar también como un competidor para el epítipo del cual es un imitador en ensayos de inhibición *in vitro* (por ejemplo, ensayos ELISA de inhibición), que implica al epítipo y a un anticuerpo que se une a dicho epítipo. Sin embargo, un mimotopo de la presente invención puede no necesariamente provenir o competir con la unión del epítipo del cual es un imitador, en un ensayo *in vitro* de inhibición, aunque puede inducir una respuesta inmune específica cuando se administra a un mamífero.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "epítipo" se refiere a una región inmunogénica de un antígeno que es reconocida por una molécula del anticuerpo en particular. En general, un antígeno poseerá uno o más epítipos capaz cada uno de unirse a un anticuerpo que reconoce al epítipo particular.

Las abreviaturas para los residuos aminoácidos que se dan a conocer en la presente invención siguen las recomendaciones de la IUPAC:

Aminoácido	Código de 3 letras	Código de 1 letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Ácido glutámico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M

Fenilamina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	The	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Los mimotopos de la presente invención pueden obtenerse sintéticamente mediante procedimientos de síntesis química que son bien conocidos en la técnica, bien como un péptido aislado o como parte de otro péptido o polipéptido. Alternativamente el mimotopo péptido puede producirse en un microorganismo que produce el mimotopo péptido que es entonces aislado, y si se desea, ulteriormente purificado. El mimotopo péptido puede producirse en microorganismos tales como bacterias, levaduras o hongos, en células eucariotas tales como en células de un mamífero o un insecto, o en un vector vírico recombinante como el adenovirus, poxvirus, herpesvirus, Simliki forest virus, baculovirus, bacteriophage, sindbis virus or sendai virus. Las bacterias apropiadas para producir el mimotopo péptido incluyen *E. coli*, *B. Subtilis* cualquier otra bacteria que pueda expresar péptidos tales como el péptido mimotopo. Los tipos apropiados de levaduras para expresar el mimotopo péptido incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida*, *Pichia pastoris* o cualquier otra levadura capaz de expresar péptidos. En la técnica, se conocen métodos correspondientes. También son bien conocidos en la técnica procedimientos para aislar y purificar péptidos obtenidos de forma recombinante, e incluyen, por ejemplo, filtración en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, etc.

Para facilitar al aislamiento del mimotopo péptido, puede llevarse a cabo un polipéptido de fusión, en el que el mimotopo péptido se fusiona translacionalmente (se une covalentemente) a un polipéptido heterólogo que permite el aislamiento mediante cromatografía de afinidad. Típicos polipéptidos heterólogos son His-Tag (por ejemplo, His<sub>6</sub>; 6 residuos de histidina), GST-Tag (Glutarion-S-transferasa) etc. El polipéptido de fusión no sólo facilita la purificación de los mimotopos, sino que puede prevenir también que el polipéptido mimotopo puede degradarse durante la purificación. Si se desea eliminar el polipéptido heterólogo después de la purificación, el polipéptido de fusión puede incluir un sitio de fragmentación en la unión entre el mimotopo péptido y el polipéptido heterólogo. El sitio de fragmentación está formado por una secuencia aminoácida que es fragmentada con un enzima específico para la secuencia aminoácida en el sitio (por ejemplo, proteasas).

Los mimotopos de la presente invención pueden también modificarse en o cerca de su extremo N- y/o C-, de forma que en dichas posiciones, se una allí un residuo de cisteína. En una forma de realización preferida, los residuos de cisteína posicionadas terminalmente (localizados en el extremo N- y C- del péptido), se utilizan para ciclar los péptidos mediante un enlace disulfuro.

Los mimotopos de la presente invención pueden utilizarse también en diversos ensayos y equipos, en particular en ensayos inmunológicos y equipos. Por tanto, se prefiere particularmente que el mimotopo sea parte de otro péptido o polipéptido, particularmente un enzima que se utilice como un informador en ensayos inmunológicos. Dichos enzimas informativos incluyen, por ejemplo, alcalina-fosfatasa o peroxidasa de rábano.

Las patologías que pueden prevenirse o tratarse incluyen, entre otras, la enfermedad oclusiva arterial periférica, la enfermedad cardíaca coronaria, y el ictus cerebral aprotético (véase por ejemplo, Steinberg D. J. *Lipid Res.* (2005) 46: 179-190; Steinberg D *et al.*, *J. Lipid Res* (2006) 47: 1339-1351).

Según una forma de realización preferida de la presente invención, el compuesto se une a un transportador farmacéuticamente aceptable, preferentemente, KLH (hemocianina de lapa, toxoide tetánico, proteína de unión a la albúmina, albúmina sérica bovina, un dendrímero, (MAP; *Biol. Chem.* 358:581), engarces peptídicos (o regiones flanqueantes), así como las sustancias adyuvantes que se describen en Singh et al., *Nat. Biotech.* 17 (1999), 1075-1081 (en particular aquellas en la tabla 1 de aquel documento y O'Hagan et al., *Nature Reviews, Drug Discovery* 2 (9) (2003), 727-735, (en particular los compuestos endógenos inmunopotenciadores y los sistemas de suministro descritos ahí), o sus mezclas. La química de conjugación (por ejemplo, mediante compuestos heterobifuncionales tales como GMBS y por supuesto, también otros tal como se describe en "Bioconjugate Techniques", Greg T. Hermanson), pueden seleccionarse, en este contexto, a partir de reacciones conocidas por el experto materia. Además, la composición vacunal puede formularse con un adyuvante, preferentemente una composición baja en aluminio soluble, en particular, hidróxido de aluminio. Por supuesto, pueden utilizarse también adyuvantes como fosfato aluminico MF59, fosfato cálcico, citocinas (por ejemplo, IL-2, IL-12, GM-CSF), saponinas (por ejemplo, QS21), derivados MDP, oligos CpG, LPS, MPL, polifosfacenos, emulsiones (por ejemplo, Freund's, SAF), liposomas, virosomas, iscoms, coqueatos, micropartículas PLG, partículas de poloxámero, partículas de tipo vírico, enterotoxina termolábil (LT), toxina colérica (CT), toxinas mutantes (por ejemplo, LTK63 y LTR72), micropartículas y/o liposomas polimerizados.

El compuesto de la presente invención se une preferentemente al transportador o adyuvante mediante un engarce, que se selecciona a partir del grupo formado por NHS-poly (óxido de etileno) (PEO) (por ejemplo, NHS-PEO<sub>4</sub>-

maleimida).

Una vacuna que incluye este compuesto (minotopo) y el transportador farmacéuticamente aceptable, puede administrarse mediante cualquier medio apropiado de aplicación por ejemplo, intradérmico, intravenoso, intraperitoneal, intramuscular, intranasal, oral, subcutáneo, etc., y en cualquier dispositivo apropiado de suministro (O'Hagan et al., Nature Reviews, Drug Discovery 2 (9), (2003), 727-735). El compuesto de la presente invención se formula preferentemente para administración intravenosa, subcutánea, intradérmica o intramuscular (véase, por ejemplo, "Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations". Sarfaraz Niazi, CRC Press Inc, 2004).

Típicamente, la vacuna contiene el compuesto según la invención en una cantidad de entre 0,1 ng a 10 mg, preferentemente 10 ng a 1 mg, en particular 100 ng a 100 µg, o, alternativamente por ejemplo, 100 fmol a 10 µmol, preferentemente 10 µmol a 1 µmol, en particular 100 pmol a 100 nmol. Típicamente, la vacuna puede contener también sustancias auxiliares, por ejemplo, tampones, estabilizadores, etc.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un péptido formado, por lo menos, de una secuencia aminoácida seleccionada a partir del grupo formado por FGFP AHVFIDWLQSL S, FGFP AHVYIDWLQSL S y FGFP AHVFIDWLQSL N. Los péptidos de la presente invención volvieron a ser miotopos para CETP, y por tanto, éstos pudieron unirse a anticuerpos que se unían al fragmento CETP C-FGFPEHLLVDFLQSL S (16 aminoácidos C-terminales de la proteína CETP).

Otro aspecto, todavía, de la presente invención, se refiere a una formulación farmacéutica que comprende, por lo menos, un péptido según la presente invención.

Los péptidos de la presente invención pueden formularse en una formulación farmacéutica que puede administrarse a un individuo. Estas formulaciones pueden utilizarse, por ejemplo para prevenir y/o tratar la aterosclerosis, enfermedad oclusiva arterial periférica, enfermedad cardíaca coronaria o lesión cerebral apopléjica.

Los péptidos en la formulación pueden combinarse a partir del conjunto de péptidos que se dan a conocer en la presente memoria. Además, también se pueden proporcionar formulaciones farmacéuticas, que comprenden uno o varios de los péptidos de la presente invención, y que pueden administrarse separada o conjuntamente a un individuo que lo necesite.

Los péptidos de la presente invención pueden mezclarse en una única formulación farmacéutica, o en una combinación de dos o tres. La formulación resultante puede administrarse al mismo tiempo o en distintos momentos. Según una forma de realización preferida de la presente invención, el péptido que se encuentra en la formulación, se une a un vehículo farmacéuticamente aceptable preferentemente KLH (hemocianina de lapa).

La presente invención se ilustra a continuación mediante las figuras y los ejemplos siguientes no limitativos.

La figura 1 muestra el resultado de una competición representativa ELISA, después de escanear una biblioteca Ph.D. 7 fágica de exposición con el anticuerpo monoclonal "Paula".

Las figuras 2a y 2b muestran los resultados de 2 competiciones típicas de ELISA, después de escanear una biblioteca Ph.D. 12 fágica de exposición con el anticuerpo monoclonal "Paula".

La figura 3a y 3b muestran los resultados de 2 tipos ELISAs representativos competitivos, después de escanear una biblioteca Ph.D. 7 fágica expuesta con el anticuerpo monoclonal Frida.

La figura 4a muestra los resultados de ELISA representativos, después de escanear una biblioteca Ph.D 12 fágica de exposición con el anticuerpo monoclonal Frida.

La figura 4b muestra la unión del anticuerpo monoclonal "Frida" a las placas ELISA revestidas con mimotopo-BSA.

Las figuras 5a y 5b muestran los resultados de una competición ELISA representativa después del escaneo de una biblioteca de exposición fágica Ph.D 12 con anticuerpos monoclonales Frida.

La figura 6 muestra los resultados de una competición ELISA de dos mimotopos, después de escanear una biblioteca Ph.D 12 de exposición fágica con el anticuerpo monoclonal "Frida"

Las figuras 7a a 7d muestran el título de anticuerpos (IgG anti-ratón) de experimentos *in vivo*, por los que los siguientes conjugados mimotopo-BSA se inyectaron en ratones.

Fr12/3/26/65 ext4 C-FGFPYHVQVDVLQSL S	p4286
Fr12/3/55 ext2 C-FGFPSHLIIDRAQSL S	p4294
Fr12/3/55 ext2 W en vez de R C-FGFPSHLIIDWAQSL S	p4324
Fr12/3/55 en vez de RA C-FGFPSHLIIDWLQSL S	p4325

Fr12/3/84 ext 2 C-FGFAHVSIDWLQSL	p4298
Fr12/3/40 ext4 C-FGFQHLTTDRAQSL	p4302
Fr12/2/6 ext6 C-FGFPTHYYADFSQSL	p4278
Fr12/2/11 ext7 C-FGFPGHLIWDLSLHSL	p4282
Fr12/3/1/19/88 ext 4 C-FGFPHYHHLVDQLHSL	p4284
Fr12/3/68 ext5 C-FGFPSHHLQDSLQSL	p4289
Fr12/3/83 ext5 C-FGFPLHFRSDRIQSL	p4292
Fr12/3/63 ext4 C-FGFPHLYADMSQSL	p4296
Fr12/3/47 ext4 C-FGFPAHLSDLRQSL	p4300
Fr12/3/35 ext4 C-FGFPFHFAQDSWQSL	p4304

Las figuras 8a y 8b muestran los resultados de dos ELISA de competición, representativos, después de escanear la biblioteca Ph.D 7C7 de exposición fágica con el anticuerpo monoclonal Frida.

5 La figura 9 muestra un ensayo ELISA *in vitro* para detectar la unión entre “Frida” y los mimotopos cíclicos.

Las figuras 10a y 10b muestran los resultados de un ensayo ELISA de inhibición con FGFP SHLIIDWLQSL, FGFAHVFIDWLQSL y FGFAHVYIDWLQSL.

10 La figura 10a (péptido de revestimiento de 1 µM. Detección algG1.

Frida pept nº			2,5 ng mAb Frida	
			2 µ péptido	20 µg péptido
	Sólo tampón		1,05	0,96
p4073	Epítipo original	C-FGFPEHLLVDFLQSL	0,44	0,1
p1358	Péptido sin importancia	Péptido sin importancia	1,08	0,91
p4361	FGFAHVFIDWLQSL	Fr12/3/84 ext2 VSI→VFI	0,82	0,16
p4362	FGFAHVYIDWLQSL	Fr12/3/84 ext2 VSI→VYI	0,75	0,15

Figura 10b (1 µM de revestimiento péptido. Detección algG1)

Frida pept nº			2,5 ng mAb Frida	
			2 µ péptido	20 µg péptido
	Sólo tampón		0,84	0,75
p4073	Epítipo original	C-FGFPEHLLVDFLQSL	0,64	0,15
p1358	Péptido sin importancia	Péptido sin importancia	0,88	0,77
p4325	FGFP SHLIIDWLQSL	Fr12/3/55 ext2 RA→WL	0,42	0,1

15 La figura 11 muestra la inducción *in vivo* de anticuerpos dirigidos a CETP por mimotopos de la invención que se administran a los ratones. Los ratones Balb/c/30 µg Péptidos, 2 inyecciones a intervalos de 2 semanas S3= 2 semanas después de la tercera inyección. Alumbre como adyuvante. Los títulos contra el epítipo original (p4073) inducidos por inyección de mimotopos. Revestimiento de pocillos: 50 µl de 1 µM p4073-BSA o 1 µg/ml de KLH activado. Detección: algG:

Grupo	Péptido-BSA Inyectado	Epítipo BSA original	péptido-BSA irrelevante
Grupo 1	KLH	KLH	2.040
Grupo 2	Epítipo original	p4073-KLH	8.600
Grupo 3	C-FGFQHLTTDWLQSL	p4369-KLH	14.000
Grupo 4	C-FGFPSHLIIDWAQSL	p4324-KLH	12.570
Grupo 5	C-FGFPSHLIIDWLQSL	p4325-KLH	2.930
Grupo 6	C-FGFPSHLIIDWSQSL	p4366-KLH	4.700
Grupo 7	C-FATPSHLIIDWLQSL	p4345-KLH	8.380
Grupo 8	C-FAFPAHVSIDWLQALA	p4328-KLH	10.100
Grupo 9	C-PGFPAHVSIDWLQSL	p4340-KLH	18.100
Grupo 10	C-WGFPAHVSIDWLQSL	p4341-KLH	10.350
Grupo 11	C-FSFP AHVSIDWLQSL	p4342-KLH	4.620
Grupo 12	C-FYFPAHVSIDWLQSL	p4343-KLH	5.580
Grupo 13	C-FDFPAHVSIDWLQSL	p4344-KLH	12.200
Grupo 14	C-FGFPAHVSIDWLQLL	p4347-KLH	12.000
Grupo 15	C-FGFPAHVSIDWLQYLS	p4351-KLH	2.950



Grupo 16	C-FGFPAHVSIDWLQSSIS	p4352-KLH	19.680	12.070	10
Grupo 17	C-FGFPAHVSIDWLQSLT	p4353-KLH	11.200	8.650	10
Grupo 18	C-FGFPAHVSIDWLQSSLS	p4358-KLH	16.500	12.940	10
Grupo 19	C-FGFPAHVSIDWLQSSLS	p4359-KLH	8.540	5.340	10
Grupo 20	C-FGFPAHVIFIDWLQSSLS	p4361-KLH	17.940	9.530	10

Las figuras 12a y 12b muestran la inducción *in vivo* de anticuerpos específicos para CETP, administrando mimotopos de la invención. Títulos para p4073 y su correlación con títulos para CETP de grupos seleccionados (que muestran títulos altos contra p4073): gr. 4, gr. 9, gr. 10, gr. 14, gr. 16-20/gr. 1 (KLH), gr. 2 (epitopo original) como controles. Revestimiento: GST-CETP recombinante o CETP purificado de ratón, respectivamente:

5

figura 12a

			GST-CETP Recombinante	CETP de conejo
Grupo 1	KLH	KLH/Alum	0,35	0,19
Grupo 2	Epitopo original	p4073-KLH/Alum	1,49	1,25
Grupo 3	C-FGFPAHVSIDWLQSSLS	p4369-KLH/Alum	0,45	0,21
Grupo 4	C-FGFPAHVSIDWLQSSLS	p4324-KLH/Alum	0,58	0,28
Grupo 9	C-FGFPAHVSIDWLQSSLS	p4340-KLH/Alum	0,49	0,21
Grupo 10	C-FGFPAHVSIDWLQSSLS	p4341-KLH/Alum	0,39	0,18
Grupo 14	C-FGFPAHVSIDWLQSSLS	p4347-KLH/Alum	0,35	0,2
Grupo 16	C-FGFPAHVSIDWLQSSIS	p4352-KLH/Alum	0,48	0,28
Grupo 17	C-FGFPAHVSIDWLQSLT	p4353-KLH/Alum	0,57	0,39
Grupo 18	C-FGFPAHVSIDWLQSSLS	p4358-KLH/Alum	0,68	0,58
Grupo 19	C-FGFPAHVSIDWLQSSLS	p4359-KLH/Alum	0,79	0,54
Grupo 20	C-FGFPAHVIFIDWLQSSLS	p4361-KLH/Alum	1,64	1,51

10

figura 12b

			GST-CETP Recombinante	CETP de conejo
Grupo 1	KLH	KLH/Alum	0,18	0,47
Grupo 2	Epitopo original	p4073-KLH/Alum	1,26	1,42
Grupo 5	C-FGFPAHVSIDWLQSSLS	p4325-KLH/Alum	0,59	0,85
Grupo 6	C-FGFPAHVSIDWLQSSLS	p4366-KLH/Alum	0,4	0,65
Grupo 7	C-FGFPAHVSIDWLQSSLS	p4345-KLH/Alum	0,39	0,46
Grupo 8	C-FGFPAHVSIDWLQSSLS	p4328-KLH/Alum	0,45	0,43
Grupo 11	C-FGFPAHVSIDWLQSSLS	p4342-KLH/Alum	0,38	0,41
Grupo 12	C-FGFPAHVSIDWLQSSLS	p4343-KLH/Alum	0,61	1,05
Grupo 13	C-FGFPAHVSIDWLQSSLS	p4344-KLH/Alum	0,35	0,43
Grupo 15	C-FGFPAHVSIDWLQSSLS	p4351-KLH/Alum	0,54	0,59

La figura 13 muestra la inducción *in vivo* de anticuerpos dirigidos a CETP por mimotopos de la invención que se administran a ratones.

15

Los sueros de cada grupo (5 ratones Balb/c cada uno) se combinaron, se diluyeron 1:100 y se ensayaron sobre placas ELISA revestidas con GST-CETP recombinante o CETP de conejo, respectivamente. La detección de anticuerpos unidos fue con algG.

			GST-CETP Recombinante	CETP de conejo
Grupo 1	KLH	KLH/Alum	0,23	0,17
Grupo 2	Epitopo original	p4073-KLH/Alum	1,08	0,46
Grupo 3	C-FGFPAHVSIDWLQSSLS	p4335-KLH/Alum	0,26	0,14
Grupo 4	C-FGFPAHVSIDWLQSSLS	p4348-KLH/Alum	0,33	0,16
Grupo 5	C-FGFPAHVSIDWLQSSLS	p4360-KLH/Alum	0,4	0,23
Grupo 6	C-FGFPAHVSIDWLQSSLS	p4362-KLH/Alum	0,86	0,94
Grupo 7	C-FGFPAHVSIDWLQSSLS	p4359-KLH/Alum	0,29	0,23
Grupo 8	C-FGFPAHVSIDWLQSSLS	p4337-KLH/Alum	0,24	0,14

20

La figura 14 muestra un ensayo de actividad de CETP, donde 0,6 µl de suero humano (con actividad CETP endógena), se mezcla con suero de ratones de tipo salvaje (que no presentan actividad CETP), vacunados con KLH/Alum (grupo de control negativo), p4703-KLH/Alum (epitopo CETP original), o p4361 (o p4362 o p4325)

mimotopo, respectivamente. Pudo demostrarse que la adición de 1,2 µl y 0,6 µl de suero de ratones vacunados con p4361-KLH/Alum, inhibe completamente la actividad CETP, y la adición de 0,2 µl de suero reduce significativamente dicha actividad, al contrario que la adición de suero de ratones vacunados con el control KLH/Alum, sólo o con el epítipo original (p4073-KLH/Alum).

5 La figura 15 muestra que la adición de p4325-KLH/Alum al suero humano inhibe significativamente la actividad CETP.

10 La figura 16 muestra que la adición de p4361-KLH/Alum al suero humano inhibe significativamente la actividad CETP.

La figura 17 muestra que la adición de p4362-KLH/Alum al suero humano inhibe significativamente la actividad CETP.

15 La figura 18a muestra un ELISA de inhibición con mimotopos (Revestimiento con 1 µM del péptido 4073, detección α IgG1).

Frída	Pépt N°		2,5 ng mAb Frída	
			Bajo	Alto
Sólo tampón	Sólo tampón	Sólo tampón	1,084	1,079
4% DMSO	4% DMSO	4%DMSO	1,180	1,201
p4073	C-FGFPEHLLVDFLQSLs, péptido de control positivo	p4073	0,537	0,094
p1208	Péptido de control positivo C-FGFPEHLLVDFLQSLs	p1208	0,712	0,093
p1358	Péptido de control negativo	p1358	1,158	1,050
p4474	C-PAHVYIDWLQSLs	Fr12/3/84 ext2 VSI∅VFI SLS∅SLN	1,452	0,179
p4475	C-FGFPAHFSIDWLQSLs	Fr12/3/84 ext2 VSI∅FSI	2,211	1,429
p4476	C-FGFPAHVSDWLQSLs	Fr12/3/84 ext2 VSI∅VSF	2,000	1,417
p4477	C-FGFPEHVFIDWLQSLs	Fr12/3/84 ext2 VSI∅VFI PAH∅PEH	0,808	0,116
p4478	C-FKPAHVFDWLQSLs	Fr12/3/84 ext1 VSI∅VFI	2,231	1,206
p4479	C-GFKPAHVFDWLQSLs	Fr12/3/84 ext1 VSI∅VFI más G Sobre el extremo N	2,165	1,591
p4480	C-DFGFPAHVFDWLQSLs	Fr12/3/84 ext2 VSI∅VFI más D Sobre el extremo N = 4361 D	0,521	0,103
p4481	C-FGFQHLFTDWLQSLs	Fr12/3/40 ext4 RA∅WL LTT∅LFT = p4369 con intercambio T∅F	0,551	0,156

20 La figura 18b muestra un ELISA de inhibición con mimotopos (Revestimiento de 1 µM del péptido 4073, detección α IgG1).

p1208	Péptido de control positivo	p1208	0,264	0,079
p1358	Péptido de control Negativo	p1358	1,902	1,661
p4629	C-PAHVYIDWLQSLs	Extremo C- de p4362; p4362 menos 3 aa sobre el extremo N	0,313	0,118
p4630	C-FGFPAHVYIDWLQ	Extremo N de p4362 (menos 3 aa sobre extremo C)	2,131	2,115
p4631	C-FGFPAHVFDWLQ	Extremo N de p4362 (menos 3 aa sobre Extremo C)	2,111	2,147
p4642	C-DFGFPSHLIIDWLQSLs	Fr12/3/55 ext2 RA→WL más D; p4325 más D sobre el Extremo N	0,171	0,082
P4818	C-DFGFPAHVFDWLQSLN	Fr12/3/84 ext2 VSI→VFI SLS → SLN más D; = 4361 N hacia atrás más D hacia delante	0,332	0,091
p4819	C-PSHLIIDWLQ	= 4325 menos 3AA en los extremos N y C	2,226	2,158
p4820	C-PAHVFDWLQ	= 4361 menos 3AA en los extremos N y C	2,310	2,374

p4989	C-DFGFPAHVTDWLQSLN	Fr12/3/84 ext2 VSI→VTI; = p4361 F reemplazado por T, más D en el extremo N y N en vez de S en el extremo C	0,932	0,274
p4990	C-DFGFPAHVLDWLQSLN	Fr12/3/84 ext2 VSI→VLI; =p4361 F reemplazado por T, más D en el extremo N y N en vez de S en el extremo C	0,263	0,073
p5067	FGFPAHVYIDWLQSLS-C	p4362 C en el extremo C	0,563	0,217
p5068	FGFPAHVFDWLQSLN-C	p4474 C en el extremo C	0,757	0,271

La figura 18c muestra un ELISA de inhibición con un cribado de mimotopos PhD12 Frida de intercambio-Ala para la caracterización del mimotopo /mAb Frida (Revestimiento 1 µM 4073. Detección dtgG1).

Frida	Pépt N°		2,5 ng mAb Frida	
			Bajo	Alto
	Sólo tampón	Sólo tampón	0,964	0,964
	4% DMSO	4%DMSO	0,973	0,923
	Péptido de control Positivo	p4073	0,554	0,088
	p1208	p1208	0,942	0,101
	Péptido de control negativo	p1358	0,986	0,93
p4432	C-FGFPSHIIIDWLQSLS	Fr12/3/55 ext2exch2 L->I	0,635	0,096
p4433	C-FGFPSHLIIEWLQSLS	Fr12/3/55 ext2exch2 D->E	1,114	0,672
p4434	C-AAFPAHLLADAAQALA	Intercambio Ala para caracterización del mimotopo	1,74	1,461
p4435	C-AAFPAHAAAADFLQALA	Intercambio Ala para caracterización del mimotopo	1,281	1,969
p4436	C-AAFAAHLLADFLQAAA	Intercambio Ala para caracterización del mimotopo	1,632	1,691
p4437	C-AAAPAHLLVDAAQAAA	Intercambio Ala para caracterización del mimotopo	1,84	1,674

5 La figura 19a muestra un péptido ELISA, inmunización con C-DFGFPAHVYIDWLQSLS (p4628-KLH/Alum), título para el epítipo original.

10 La figura 19b muestra un péptido ELISA, la inmunización con C-FGFPAHVFDWLQSLN (p4474-KLH/Alum), título para el epítipo original.

La figura 19c muestra un péptido ELISA, la inmunización con C-FGFPAHVFDWLQSLN (p4474-KLH/Alum), título para el mimotopo inyectado.

15 La figura 19d muestra una antiproteína ELISA. A los ratones se les inyectó 3 veces con 30 µg de los mimotopos indicados acoplados a KLH con alumbre como adyuvante. Los sueros de cada grupo (integrado por 5 ratones), se juntaron, se diluyeron 1:100 y se ensayaron sobre placas ELISA revestidas con CETP purificado de conejo.

20 La figura 19e muestra una antiproteína ELISA donde a los ratones se les inyectó 3 veces con 30 µg de los mimotopos indicados conjugados a KLH, con alumbre como adyuvante. Los sueros murinos (de un ratón único), se diluyeron 1:100 y se ensayaron sobre las placas ELISA revestidas con CETP purificado de conejo.

### Ejemplos

25 Existe una intensa relación inversa entre la concentración plasmática de colesterol en las lipoproteínas de alta densidad (HDLs) y el desarrollo de la enfermedad cardiaca coronaria (CHD). Así, el riesgo de (CHD) es más alto cuando HDLs disminuye. Aunque el 33% de los pacientes con CHD tienen niveles plasmáticos bajos de HDLs, no existe habitualmente una terapia efectiva para aumentar la concentración plasmática de HDLs. La dieta y el ejercicio moderado son inofensivos, las estatinas consiguen sólo un bajo 5 a 7% de aumento en HDL y la máxima posee efectos secundarios y perfiles de conformidad que limitan su utilización.

30 La inhibición de la actividad de CETP se ha sugerido como una aproximación terapéutica para aumentar los niveles plasmáticos de HDL. CETP es una glicoproteína plasmática que facilita la transferencia de lípidos neutros y fosfolípidos entre lipoproteínas, regulando la concentración del HDL plasmático. La inhibición de la actividad CETP se espera que aumente las concentraciones plasmáticas de HDL por varias razones, CETP disminuye las concentraciones de HDL trasladando los ésteres de colesterol desde HDL a VLDLs y LDLs. La inhibición transitoria de CETP en conejos y hámsteres mediante los anticuerpos monoclonales, pequeñas moléculas (Sikorski, J.A., J. Med. Chem. 49 (1) (2006): 1-22), u oligonucleótidos no codificantes, provoca el aumento de HDL. La inhibición sostenida de CETP con nucleótidos no codificantes, aumenta el HDL plasmático y redujo las lesiones ateroscleróticas en un modelo aterosclerótico en el conejo. Los ratones y ratas CETP trasgénicos muestran una disminución del HDL plasmático. Los individuos con actividad reducida de CETP muestran un HDL plasmático

elevado.

Recientemente, se ha sometido a consideración una vacuna. Los conejos se inmunizaron con un péptido derivado del CETP humano que contenía una región del CETP crítica para la función de transferencia de lípidos neutros. Los conejos vacunados presentaban una actividad CETP reducida y un perfil lipoproteico alterado con una concentración más baja de LDL y más alta de HDL. Además, los ratones vacunados con CETP mostraron tener lesiones ateroscleróticas más pequeñas que los animales de control.

El problema del enfoque de la vacuna anti-CETP anteriormente mencionado es que su formulación comprende un autapéptido y por tanto debe destruir la tolerancia natural contra los antiantígenos. La invención describe un mimotopo CETP que puede utilizarse para la vacunación: el mimotopo inducirá la producción de anticuerpos contra CETP. El mimotopo CETP no posee una autosecuencia y por tanto, no necesita destruir la tolerancia. Así, la inducción de una respuesta del anticuerpo anti-CETP, resulta mayormente facilitada. El mimotopo se identifica con un anticuerpo monoclonal (mAb) y bibliotecas peptídicas (comercialmente disponibles). Se utiliza un anticuerpo monoclonal anti-CETP, que neutraliza la actividad CETP. Este mAb detecta una secuencia en el interior del extremo C, 26 aminoácidos de CETP necesarios para la actividad de transferencia de lípidos neutrales.

**Ejemplo 1: Generación de anticuerpos monoclonales para utilizarse para el escaneo de bibliotecas que muestren fagos.**

A.) 2 anticuerpos derivados de "Fusión F":

Ratones Balb/c se inmunizaron con el epítipo CETP original C-FGFPEHLLVDFLQSL (16 aminoácidos del extremo C de la proteína CETP), conjugados a KLH y alumbre como adyuvante.

2 clones hibridoma (ambos IgG1) se purificaron y utilizaron para escaneo: F5AF9G4 ("Paula") y F6F11D1 ("Félix").

Estos 2 anticuerpos monoclonales reconocen el epítipo inyectado tan bien como la proteína CETP en ELISA. También puede utilizarse en la transferencia Western para detectar la proteína CETP (proteína recombinante que se expresa en las bacterias tanto como la proteína aislada del suero de conejos). Ambos anticuerpos no inhiben la actividad enzimática de CETP (ensayada con el equipo Roar de Ensayo de la Actividad de CETP, véase, por ejemplo, US 5.585.235; US 5.618.683; US 5.770.355).

B.) 2 anticuerpos derivados de "Fusión I":

Ratones Balb/c se inmunizaron con el epítipo original CETP C-FGFPEHLLVDFLQSL (16 aminoácidos en el extremo C de la proteína CETP), acoplados a KLH y alumbre como adyuvante.

Se purificaron 2 clones hibridínicos (ambos IgG1), utilizándose para escaneo: I2G6H5 ("Frida") y I2G6H7 ("James").

Estos 2 anticuerpos monoclonales reconocen el epítipo inyectado tanto como la proteína CETP en ELISA. También pueden utilizarse en la transferencia Western para detectar la proteína CETP (proteína recombinante que se expresa en bacterias, tanto como la proteína aislada del suero del conejo). Contrariamente a los anticuerpos derivados de "Fusión F" (ver A.), ambos anticuerpos "Frida" y "James", inhiben la actividad enzimática CETP (ensayada con el equipo Roar de Ensayo de la actividad CETP).

**Ejemplo 2: Exhibición fágica ELISA de inhibición *in vitro* y ensayo *in vivo* de mimotopos**

Las Bibliotecas de exhibición fágica utilizadas en el ejemplo fueron:

Ph.D. 7: New England BioLabs E8102L (biblioteca lineal de 7 unidades metaméricas).

Ph.D. C7C: New England BioLabs E8121L (biblioteca de 7 unidades metaméricas, péptidos ciclizados).

Ph.D. 12: New England BioLabs E8111L (biblioteca lineal de 12 unidades metaméricas).

La exhibición fágica se llevó a cabo según el protocolo del fabricante ([www.neb.com](http://www.neb.com)).

Después de 2 o 3 episodios subsiguientes de planificación, se tomaron clones fágicos únicos, sometiéndose los sobrenadantes fágicos a ELISA sobre placas revestidas con el anticuerpo que se utilizó para el procedimiento de planificación. Los clones fágicos que fueron positivos en este ELISA, (señal intensa para la diana, pero sin señal para un control inespecífico), se secuenciaron. A partir de las secuencias del ADN se dedujeron las secuencias peptídicas. Estos péptidos se sintetizaron y caracterizaron en el ELISA de inhibición.

1. Ensayo de inhibición *in vitro* (ELISA)

Distintas cantidades de péptidos (2 y 20 µg, tal como se indica en las figuras respectivas), derivados de la exhibición fágica, se incubaron con el anticuerpo monoclonal que se utilizó para el procedimiento de escaneo. Los péptidos que disminuían la subsiguiente unión del anticuerpo al epítipo original de CETP (16 aminoácidos en el extremo C de la proteína CETP), que revistieron las placas ELISA, se consideraron como inhibidores (Resultados que se aprecian i. a. Figuras 19a a 19c)

2. Ensayo *in vivo* de mimotopos

Unos péptidos inhibidores, así como algunos no inhibidores, se conjugaron a KLH y se inyectaron a ratones (tipo de ratones salvajes o CETP-transgénicos, subcutáneamente en el flanco o intradérmicamente en las orejas) o en conejos (subcutáneamente en los flancos) junto con un adyuvante apropiado (hidróxido de aluminio y Gerbu 100 para ratones e indróxido de aluminio o CFA/IFA para conejos).

Los títulos para los péptidos inyectados, así como para el epítipo CETP original, se determinaron. Además, para los sueros seleccionados también se midió la respuesta inmune a la proteína CETP (resultados, ver de figura 7a a 7d y 19a a 19e).

3. Resultados

3.1. Escaneo con 2 anticuerpos derivados de "Fusión F": "Paula" y "Félix".

3.1.1. Biblioteca de exhibición fágica Ph.D. 7

3.1.1.1. Escaneo con el anticuerpo monoclonal "Paula"

Se identificaron 17 secuencias en este escaneo.

P2_8	SYHATFL
P2_9	TMAFPLN
P2_11	HYHGAFL
P2_12	EHHDIFL
P2_15	SSLELFL
P2_16	TGLSVFL
P3_2	WMPSLFY
P3_6. 14. 28	SMPWWFF
P3_9	TMPLLFW
P3_13	DTWPGLE
P3_16	SMPPIFY
P3_17	MPLWWWD
P3_18	SMPNLFY
P3_19	RMPPIFY
P3_21	NPFEVFL
P3_25	TLPNWFW
P3_26	SMPLTFY

El resultado de un ELISA de competición, representativo se muestra en la figura 1.

3.1.1.2. Escaneo con el anticuerpo monoclonal "Félix"

Se identificaron 6 secuencias que inhiben la unión del anticuerpo monoclonal "Félix" en experimentos *in vitro* de competición:

F2-9	C SFLDTLT
F3-6	C NFLKTLS
F3-18	C DFLRTL
F3-23	C AFLDTLV
F3-34	C TFLSSLA
F3-38	C GFLDSLIM

Se identificaron 12 secuencias que no inhiben la unión del anticuerpo monoclonal "Félix" en experimentos *in vitro* de competición:

F2-2+5	SPHPHFL
F2-6	NFMSIGL
F2-16/F3-30	SQFLASL
F2-29	SNFLKTL

## ES 2 439 703 T3

	F3-1-	TGFLATL
	F3-11-	WSWPGLN
	F3-17-	IAWPGLD
5	F3-32-	SKFMDDL
	F3-41-	SDFLRAL
	F3-44-	SMPMVFY
	F3-49-	YEWVGLM
	F3-64-	KGFLDHL

10 Todos los mimotopos que inhiben la unión del anticuerpo monoclonal "Félix" *in vitro*, se acoplaron a KLHy se inyectaron subcutáneamente (en el flanco; s.c.), o intradérmicamente (i.d.) en ratones de tipo salvaje (los ratones no tienen la proteína CETP), ratones CETP-tg, o conejos, respectivamente, e indujeron la respuesta inmune al péptido inyectado con todos los adyuvantes que se ensayaron (alumbre y CFA (Adyuvante completo de Freund's); Gerbu).

15 Para todos los mimotopos que inhiben *in vitro*, mencionados anteriormente, pudieron detectarse en ratones y conejos anticuerpos que reaccionaban al epítipo CETP original.

20 Para 5 de los 6 mimotopos (ver a continuación y en la tabla 1), los anticuerpos que reaccionaban con CETP humano purificado, y el CETP humano expresado de modo recombinante, pudieron detectarse en los ELISAs de los sueros de conejos:

	F2-9	C SFLDTLT
	F3-6	C NFLKTLS
	F3-18	C DFLRRTL
25	F3-34	C TFLSSLA
	F3-38	C GFLDSLML

30 Las inyecciones subcutáneas en el costado se llevaron a cabo en las semanas 1, 3 y 7, con 30 µg de péptido-KLH por ratón. Se llevaron a cabo inyecciones intradérmicas en las orejas en las semanas 1, 3 y 6 con 10 µg de péptido-KLH por ratón. Los sueros se tomaron 2 semanas después de la tercera inyección. La formulación de la vacuna con alumbre (siempre 1 mg por ratón): hasta 250 µl, se inyectó en un costado. La formulación con 1 ml por ratón (500 µl en cada lado), se realizó en 1x PBS como tampón.

35 La formulación vacunal con el Adyuvante Gerbu 100 (Gerbu Cat. Nr. #3100; siempre 50 µl adyuvante por ratón): 200 µl, 100 µl se inyectaron en cada lado incluyendo como tampón 1x HEPES.

Tabla 1: Resultados de la determinación del título:

Adyuvante			KLH	Mimotopo inyectado	P4073 (FG-FPEHLLVD-FLQSL)	P irrelevante
Alumbre s.c. (30 µg péptido)	KLH		1:20.000	n.a.	1:400	Sin título
	p4073-KLH	C-FGFPE-HLLVDFLQSL	1:70.000	n.a.	1:20.000	Sin título
	p4223-KLH	F2-9; C-SFLDTLT	1:15.000	1:15.000	1:6.400	Sin título
	p4181-KLH	F3-6-C-NFLKTLS	1:8.000	1:6.400	1:800	Sin título
	p4184-KLH	F3-18 C-DFLRTL	1:5.000	1:10.000	1:3.000	1:2.500
	p4187	F3-34 C-TFLSSLA	1:3.200	1:9.000	1:4.000	Sin título
	p4188-KLH	F3-38 C-GFLDSLML	1:10.000	1:9.000	1:5.000	Sin título
	p4227-KLH	P12-19; C-SANPRDFLETFL	1:12.800	1:10.000	1:5.000	Sin título
	p4228-KLH	P12-21; C-RMFPESFLDTLW	1:10.000	1:4.000	1:1.000	1:400
KLH/Gerbu Subcutáneos (péptido 30 µg)	KLH		1:70.000	n.a.	1:6.000	1:800
	p4073-KLH	C-FGFPEHLLVDFLQSL	1:25.000	n.a.	1:15.000	1:200
	p4223-KLH	F2-9; C-SFLDTLT	1:40.000	1:25.000	1:50.000	1:1.000
	p4181-KLH	F3-6; C-NFLKTLS	1:20.000	1:20.000	1:8.000	1:400
	p4184-KLH	F3-18; C-DFLRTL	1:27.000	1:35.000	1:15.000	1:6.000
	p4187-KLH	F3-34; C-TFLSSLA	1:20.000	1:20.000	1:15.000	Sin título

	p4188-KLH	F3-38; C-GFLDSLML	1:40.000	1:35.000	1:35.000	1:400
	p4227-KLH	P12-19; C-SANPRDFLETLF	1:20.000	1:30.000	1:3.000	1:400
	p4228-KLH	P12-21; C-RMFPEFLDTLW	1:27.000	1:8.000	1:5.000	Sin título
	p4073-KLH	C-FGFPEHLLV-DFLQSL	1:10.000		1:10.000	Sin título
KLH/Alum Intradérmico (péptido 10 µg)	KLH		1:12.800	n.a.	Sin título	Sin título
	p4073-KLH	C-FGFPEHLLV-DFLQSL	1:10.000	n.a.	1:3.200	Sin título
	p4223-KLH	F2-9; C-SFLDTLT		1:6.400	1:3.200	
	p4181-KLH	F3-6; C-NFLKTL	1:10.000	1:1.500	1:600	Sin título
	p4184-KLH	F3-18; C-DFLRTL	1:15.000	1:5.000	1:1.500	Sin título
	p4187-KLH	F3-34; C-TFLSSLA	1:50.000	1:6.400	1:3.200	1:500
	p4188-KLH	F3-38; C-GFLDSLML	1:12.000	1:5.000	1:2.000	Sin título
	p4227-KLH	P12-19; C-SANPRDFLETLF	1:6.400	1:6.400	Sin título	Sin título
	p4228-KLH	P12-21; C-RMFPEFLDTLW	1:20.000	1:2.000	1:1.600	Sin título
	p4298-KLH	Fr12/3/84 Ext2; c-FG FPAHVSIQWLQSS	1:25.000	1:3.200	1:1.600	Sin título

3.1.2. Biblioteca Ph.D. 12

3.1.2.1. Escaneado con el anticuerpo monoclonal "Paula".

5 Fuera de las 20 secuencias aminoácidas derivadas de este escaneado, 3 inhibían en los experimentos de inhibición *in vitro*:

10 P12-19 SANPRDFLETLF  
P12-21 RMFPEFLDTLW  
P12-37 TIYDSFLDSLAS

Los péptidos no inhibidores eran:

15 P12-5/44/46/49 HQSDDKMPWWFF  
P12-9 KPYLLKDFLEAL  
P12-24/43- AMGPYDALDLFL  
P12-25 TWNPIESFLESL  
P12-28+42 YVWQDPSFTTFF  
20 P12-30 QYQTPLTFLEAL  
P12-35- RHISPATFLEAL  
P12-39- HTDSFLSTFYGD  
P12-42- YVWQDPSFTTFF  
P12-45- ADSTFTSFLQTL  
25 P12-50- GPVSIYADTDFL  
P12-51- DSNDTLTLAAFL  
P12-52- NGSPALSHMLFL  
P12-53- TDYDPMWVFFGY  
P12-56- IFPLDSQWQTFW  
30 P12-58- NESMPDLFYQPS  
P12-61- DWGDKYFSSFVN

Los resultados de 2 composiciones ELISAs típicas se muestran en las figuras 2a y 2b.

35 Los 3 mimotopos se acoplaron a KLH y se inyectaron en ratones de tipo salvaje (los ratones no presentaban la proteína CETP), ratones CETP-tg, o conejos, respectivamente, e indujeron respuesta inmunitaria a los péptidos

inyectados con todos los adyuvantes que se ensayaban (alumbre y CFA, Gerbu).

Los mimotopos P12-19; C-SANPRDFLETLF y P12-21; C-RMFPESFLDTLW indujeron una respuesta inmunitaria al epítoto CETP original en ratones blancos y en conejos.

5 En oposición, el mimotopo p12-37 C-TIYDSFLDSLAS no indujo una respuesta del anticuerpo al epítoto original.

3.2. Escaneado con 2 anticuerpos a partir de "Fusión I", "Frida" y "James".

10 3.2.1. Biblioteca Ph.D. 7 de exhibición fágica

3.2.1.1. Escaneado con anticuerpos monoclonales "Frida" y "James".

15 En estos escaneados se identifican dos secuencias peptídicas distintas, teniendo idénticas secuencias 11 de los 12 clones que se secuenciaron. Estos péptidos no son inhibidores en experimentos de competición *in vitro*.

Fr7-2-2	
Fr7-2B-65	
Fr7-3-7	
Fr7-3-13	
Fr7-3-26	
Fr7-3-32	
Ja7-2-22	
Ja7-3-28	
Ja7-3-41	
Ja7-3-52	
Ja7-3-56	VSAYNNV

Ja7-3-89	WPLHLWQ
----------	---------

20 Los resultados de 2 ELISAs representativos de competición con mAb "Frida" se muestran en las figuras 3a y 3b. Idéntico patrón se vio en mAb "James".

35 3.2.2. Biblioteca Ph.D. 12 de exhibición fágica

3.2.2.1. Escaneo con anticuerpo monoclonal "Frida".

Fr12/2/6	TPTHYYADFSQL
Fr12/2/11	LPGHLIWDSLHY
Fr12/2/27	LPQTHPLHLLD

Fr12/3/1	
Fr12/3/19	
Fr12/3/88	IPYHHLVDQLHH

Fr12/3/26	
Fr12/3/65	YPYHVQVDVLQN

Fr12/3/68	IPSHHLQDSLQL
Fr12/3/12	EYAHHTSLDLRQ
Fr12/3/83	EPLHFRSDRIQA
Fr12/3/55	ATPSHLIIDRAQ
Fr12/3/63	APKHLYADMSQA
Fr12/3/84	FKPAHVSIWDLQ
Fr12/3/47	MPAHLSRDLRQS
Fr12/3/80	NPKHYSIDRHQA
Fr12/3/40	SPQHLLTTDRAQA
Fr12/3/35	TPFHFAQDSWQW

60 Ninguna de las 15 secuencias aminoácidas identificadas en este escaneo inhibían en experimentos de competición *in vitro*. Sin embargo, el análisis de las secuencias reveló una homología bastante alta con la secuencia proteica original para muchos de los mimotopos. Por otra parte, se pudo mostrar la unión de algunos péptidos de anticuerpos monoclonales "Frida" a las placas ELISA revestidas con mimotopo-BSA (ver las figuras 4a y 4b).

65 Esto muestra que la unión del anticuerpo monoclonal a los mimotopos inmovilizados no permite necesariamente predecir la inhibición en la competición ELISA *in vitro*.



Los experimentos de inhibición *in vitro* con variaciones de la secuencia original FGFPEHLLVDFLQSLS (16 aminoácidos del extremo c de la proteína CETP) mostraron que la extracción de más de 2 aminoácidos del extremo N o de más de 1 del extremo C, abole la inhibición (para los anticuerpos monoclonales “Frida” y “James”, “Paula” y “Félix” reconocen una parte distinta de la secuencia original).

Además, la eliminación simultánea de 2 aminoácidos del extremo N y de 1 aminoácido del extremo C da lugar también a un péptido que ya no inhibe *in vitro*.

10 C-FGFPEHLLVDFLQSLS secuencia “original” (péptido derivado de CETP)/que inhibe *in vitro*

C-GFPEHLLVDFLQSLS secuencia N-1/que inhibe *in vitro*

15 C-FPEHLLVDFLQSLS secuencia N-2/que inhibe *in vitro*

C-PEHLLVDFLQSLS secuencia N-3/que inhibe ligeramente *in vitro*

C-FGFPEHLLVDFLQSL secuencia C-1/que inhibe *in vitro*

20 C-FGFPEHLLVDFLQS secuencia C-2/que no inhibe *in vitro*

C-FPEHLLVDFLQSL secuencia N-2 y C-1/que no inhibe *in vitro!*

FGFPEHLLVDFLQSLS “original”

25	Fr12/2/6	TPTHYYADFSQL
	Fr12/2/11	LPGHLIWDSLHY
	Fr12/2/27	LPQTHPLHLED
30	Fr12/3/1	IPYHHLVDQLHH
	Fr12/3/19	IPYHHLVDQLHH
	Fr12/3/88	IPYHHLVDQLHH
35	Fr12/3/26	YPYHVQVDVLQN
	Fr12/3/65	YPYHVQVDVLQN
	Fr12/3/68	IPSHHLQDSLQL
	Fr12/3/12	EYAHHTSLDLRQ
	Fr12/3/83	EPLHFRSDRIQA
	Fr12/3/55	ATPSHLIIDRAQ
40	Fr12/3/63	APKHLYADMSQA
	Fr12/3/84	FKPAHVSIDWLQ
	Fr12/3/47	MPAHLSRDLRQS
	Fr12/3/80	NPKHYSIDRHQA
	Fr12/3/40	SPQHLLTTDRAQA
45	Fr12/3/35	TPFHFAQDSWQW

Consecuentemente, utilizando la secuencia original CETP como matriz, las secuencias peptídicas obtenidas en este procedimiento de exhibición Fágica, se alargaron en el extremo N y/o el extremo C, para comprobar si la inhibición *in vitro* es posible con péptidos más largos.

50 3.2.2.2. Mimotopos Frida Pd.D.12 y sus variaciones

	Fr12/2/6	TPTHYYADFSQL
55	Fr12/2/6 ext1	TPTHYYADFSQLLS
	Fr12/2/6 ext2	TPTHYYADFSQSLS
	Fr12/2/6 ext3	GTPHYYADFSQLL
	Fr12/2/6 ext4	GTPHYYADFSQSL
	Fr12/2/6 ext5	FGTPHYYADFSQSLS
	Fr12/2/6 ext6	FGFPHYYADFSQSLS
60	Fr12/2/11	LPGHLIWDSLHY
	Fr12/2/11 ext1	LPGHLIWDSLHYL
	Fr12/2/11 ext2	LPGHLIWDSLHYLS
	Fr12/2/11 ext3	LPGHLIWDSLHSL
65	Fr12/2/11 ext4	LPGHLIWDSLHSLS
	Fr12/2/11 ext5	GLPGHLIWDSLHYL

	Fr12/2/11 ext5	GLPGHLIWDSLHSL
	Fr12/2/11 ext6	FGLPGHLIWDSLHLSL
	Fr12/2/11 ext7	FGFPGHLIWDSLHLSL
5	Fr12/2/27	LPQTHPLHLLLED
	Fr12/3/1/19/88 ext1	IPYHHLVDQLHLS
	Fr12/3/1/19/88 ext2	IPYHHLVDQLHLSL
	Fr12/3/1/19/88 ext3	FGIPYHHLVDQLHHLS
10	Fr12/3/1/19/88 ext4	FGFPYHHLVDQLHLSL
	Fr12/3/26/65 ext1	YPYHVQVDVLQNL
	Fr12/3/26/65 ext2	YPYHVQVDVLQSL
	Fr12/3/26/65 ext3	FGYPYHVQVDVLQNL
15	Fr12/3/26/65 ext4	FGFPYHVQVDVLQSL
	Fr12/3/68 ext1	IPSHHLQDSLQLL
	Fr12/3/68 ext2	IPSHHLQDSLQSL
	Fr12/3/68 ext3	GIPSHHLQDSLQLL
20	Fr12/3/68 ext4	FGIPSHHLQDSLQLL
	Fr12/3/68 ext5	FGFPSHHLQDSLQSL
	Fr12/3/83 ext1	EPLHFRSDRIQALS
	Fr12/3/83 ext2	EPLHFRSDRIQSL
	Fr12/3/83 ext3	GEPLHFRSDRIQAL
	Fr12/3/83 ext4	FGEPLHFRSDRIQALS
25	Fr12/3/83 ext5	FGFPLHFRSDRIQSL
	Fr12/3/55 ext1	ATPSHLIIDRAQSL
	Fr12/3/55 ext2	FGFPSHLIIDRAQSL
	Fr12/3/55 ext 2 R->W	FGFPSHLIIDWAQSL
30	Fr12/3/55 ext2RA->WL	FGFPSHLIIDWLQSL
	Fr12/3/63 ext1	APKHLYADMSQALS
	Fr12/3/63 ext2	APKHLYADMSQSL
	Fr12/3/63 ext3	GAPKHLYADMSQAL
35	Fr12/3/63 ext4	FGFPKHLYADMSQSL
	Fr12/3/84 ext1	FKPAHVSIDWLQSL
40	Fr12/3/84 ext2	FGFPAHVSIDWLQSL
	Fr12/3/47 ext1	MPAHLSRDLRQSL
	Fr12/3/47 ext2	MPAHLSIDLRQSL
	Fr12/3/47 ext3	GMPAHLSRDLRQSL
45	Fr12/3/47 ext4	FGFPAHLSRDLRQSL
	Fr12/3/40 ext1	SPQHLLTTDRAQALS
	Fr12/3/40 ext2	SPQHLLTTDRAQSL
	Fr12/3/40 ext3	GSPQHLLTTDRAQAL
	Fr12/3/40 ext4	FGFPQHLLTTDRAQSL
50	Fr12/3/35 ext1	TPFHFAQDSWQWLS
	Fr12/3/35 ext2	TPFHFAQDSWQSL
	Fr12/3/35 ext3	GTPFHFAQDSWQWL
55	Fr12/3/35 ext4	FGFPFHFAQDSWQSL

Los ejemplos representativos de ELISA inhibición se muestran en la figura 5a y 5b. Los péptidos alargados Fr12/3/84 ext2 y Fr12/3/55 ext3 mostraron una inhibición significativa:

60	C-FGFPSHLIIDRAQSL	Fr12/3/55 ext3
	C-FGFPAHVSIDWLQSL	Fr12/3/84 ext2

Tres péptidos adicionales también eran inhibidores en este ensayo:

65	C-FGFPYHVQVDVLQSL	Fr12/3/26/65 ext4
----	-------------------	-------------------

## ES 2 439 703 T3

C-FKPAHVSI~~D~~WLQSL~~S~~ Fr12/3/84 ext1

C-FGFPQHLLT~~D~~R~~A~~QSL~~S~~ Fr12/3/40 ext4

- 5 Después del análisis de la secuencia que comparaba el equipo original y todos los mimotopos derivados de los escaneados de la Muestra Fágica, se crearon otros dos péptidos.

Para el mimotopo Fr12/3/55 ext3 C-FGFPSHLI~~D~~R~~A~~QSL~~S~~ (que inhibe en ELISA, ver anteriormente), se ensayaron los intercambios aminoácidos en la ELISA de inhibición:

10

Inhibiendo intensamente:

C-FGFPAHVSI~~D~~WLQSL~~S~~ Fr12/3/84 ext2

- 15 Inhibiendo ligeramente:

C-FGFPSHLI~~D~~E~~A~~QSL~~S~~ Fr12/3/55 ext3

Péptidos con secuencias alteradas (inhibiendo, ver figura 6):

20

C-FGFPSHLI~~D~~W~~A~~QSL~~S~~ Fr12/3/55 ext2, en vez de R

C-FGFPSHLI~~D~~W~~L~~QSL~~S~~ Fr12/3/55 ext2 WL en vez de RA

- 25 Otros mimotopos preferidos se caracterizaron por el siguiente ejemplo expuesto.

Exp. Nr. CETP-42	C42-1		KLH/Alum	
	C42-2		p4073-KLH/Alum	C-FGFPEHLLVDFLQSL <del>S</del>
	C42-3	p4073 LLV -> LFV	p4468-KLH/Alum	C-FGFPEHLFVDFLQSL <del>S</del>
	C42-4	Fr12/3/84 ext2 VSI -> VFI	p4361-KLH/Alum	C-FGFPAHVFE <del>D</del> WLQSL <del>S</del>
	C42-5	Fr12/3/84 ext2 VSI -> VHI	p4469-KLH/Alum	C-FGFPAHVH <del>I</del> DWLQSL <del>S</del>
	C42-6	Fr12/3/84 ext2 VSI -> VPI	p4470-KLH/Alum	C-FGFPAHV <del>P</del> IDWLQSL <del>S</del>
	C42-7	Fr12/3/84 ext2 VSI -> VWI	p4471-KLH/Alum	C-FGFPAHW <del>W</del> IDWLQSL <del>S</del>
	C42-8	Fr12/3/55 ext2 R->W LII-> LFI	p4472 KLH/Alum	C-FGFPSHLFIDWAQSL <del>S</del>
	C42-9	Fr12/3/84 ext2 VSI <del>l</del> ->VFI FGF->PGF SLS ->LIT	p4473-KLH/Alum	C- <u>PGFPAHVFI</u> DWLQSL <del>I</del> <u>LIT</u>
	C42-10	Fr12/3/84 ext2 VSI->VYI	p4362 KLH/Alum	C-FGFPAHVY <del>I</del> DWLQSL <del>S</del>
Exp. Nr. CETP-45	C45-1		KLH/Alum	
	C45-2		p1358-KLH/Alum	Péptido de control negativo
	C45-3		p4073-KLH/Alum	C-FGFPEHLLVDFLQSL <del>S</del>
	C45-4	Fr12/3/84 ext2 VSI->VFI SLS->SLN	p4474-KLH/Alum	C-FGFPAHVFI <del>D</del> W <del>L</del> QSL <del>N</del>
	C45-5	Fr12/3/84 ext2 VSI->FSI	p4475-KLH/Alum	C-FGFPAHF <del>S</del> SI <del>D</del> WLQSL <del>S</del>
	C45-6	Fr12/3/84 ext2 VSI ->VSF	p4476-KLH/Alum	C-FGFPAHV <del>S</del> F <del>D</del> WLQSL <del>S</del>
	C45-7	Fr12/3/84 ext2 VSI->VFI PAH->PEH	p4477-KLH/Alum	C-FGFPEHVFI <del>D</del> W <del>L</del> QSL <del>S</del>
	C-45-8	Fr12/3/19/88 ext4	p4284-KLH/Alum	C-FGFPYHHLVDQLHSL <del>S</del>
	C45-9	Fr12/3/84 ext1 VSI-VFI más G sobre	p4479-KLH/Alum	C-

		el extremo N		GFKPAHV <u>F</u> IDWLQSLs
	C45-10	Fr12/3/84 ext2 VSI->VFI más D sobre el extremo N; =4361 plus D	p4480-KLH/Alum	C- <u>D</u> FGFPAHV <u>F</u> IDWLQSLs
	C45-11	Fr12/3/40 ext4 RA->WL LTT->LFT = p4369 con intercambio TÖF	p4481-KLH/Alum	C- <u>F</u> GFPQH <u>L</u> F <u>T</u> D <u>W</u> L <u>Q</u> S <u>L</u> s
	C45-12	Fr12/3/55 ext2 RA->WL (véase C-31 y C-33; actividad inhibitoria sérica)	p4325-KLH/Alum	C-FGFP <u>S</u> H <u>L</u> I <u>I</u> D <u>W</u> L <u>Q</u> S <u>L</u> s
	C45-13	Fr12/3/84 ext2 FGF->FYF(véase C-33: reconocimiento proteína/actividad no inhibitoria)	p4343-klh/Alum	C- <u>F</u> Y <u>F</u> PAHV <u>S</u> IDWLQSLs
	C45-14	Secuencia de conejo	p4125-KLH/Alum	C- <u>F</u> GFP <u>K</u> H <u>L</u> L <u>V</u> D <u>F</u> L <u>Q</u> S <u>L</u> s

3.2.2.3. Ensayo *in vivo* de mimotopos

5 Unos ratones hembras Balb/c, 4 animales por grupo, se inmunizaron subcutáneamente con 30 µg de péptido acoplado a KLH. A los grupos de control se le administró KLH o C-FGFPEHLLVDFLQSLs. Se utilizó alumbre como adyuvante. Los péptidos administrados fueron todos capaces de unirse a "Frida" e inducir una respuesta inmunitaria para CETP, aunque alguno de estos péptidos no inhibieron la unión de CETP a "Frida" *in vitro* (en un ensayo de inhibición *in vitro*). El ensayo ELISA *in vitro* para determinar el título de anticuerpos se llevó a cabo con sueros que se habían unido después de dos vacunaciones en un intervalo de 2 semanas (S2; véase figura 7a a 7d). Las paredes de la placa ELISA se revistieron con KLH (control positivo), mimotopo-BSA conjugado, C-FGFPEHLLVDFLQSLs y un conjugado péptido-BSA irrelevante (control negativo). La detección se realizó con IgG anti-ratón.

15 3.2.3. Biblioteca Ph.D.7C7 de muestra del fajo

3.2.3.1. Escaneo con anticuerpos monoclonales "Frida" y "James"

20	Fr2-1	ACSFAYLYRC
	Fr2-5	
	Fr2-6	
	Fr2-18	
	Fr2-19	
25	Fr2-28	
	Ja2-5	
	Ja2-20	
	Ja2-23	
	Ja2-24	
30	Ja2-30	ACFMGDKWVC
	Fr2-7	
	Fr2-9	ACVLYPKAIC
35	Fr2-11	
	Ja2-19	ACYMGQQFVC
	Fr2-16	ACL TAYLHWC
40	Fr2-20	ACTLFPVAYC
	Fr-25	ACWLFPYAHC
	Fr2-26	ACKSINMWLC
45	Fr2-27	ACQTINRWLC

Debido a la naturaleza cíclica de estos péptidos-mimotopos, su síntesis es más complicada que la síntesis de péptidos lineales, siete de 9 secuencias cíclicas se seleccionaron para el análisis *in vitro* en la ELISA inhibición (ver las figuras 8a y 8b). Ninguna de estas secuencias inhibió la unión del anticuerpo monoclonal que se utilizó para el escaneo de la exhibición fágica al epítipo CETP original. Además, cuando estos péptidos se acoplaron a BSA y se revistieron sobre la palca ELISA, no fueron detectados por el anticuerpo monoclonal (ver la figura 9). Esto fue al revés que los datos con mimotopos derivados de las bibliotecas Ph.D. 7 o Ph.D. 12, en las que los anticuerpos monoclonales se unieron a la mayor parte de los mimotopos identificados cuando estos péptidos se unieron a BSA y

revistieron las placas ELISA.

**Ejemplo 3. Ensayo de actividad CETP**

- 5 El ensayo de actividad CETP se realizó con ensayos comercialmente disponibles (por ejemplo Ensayo de actividad ROAR CETP) y que se describieron, por ejemplo en las patentes US nº 5.585.235, US nº 5.618.683 y US nº 5.770.355. El ensayo se lleva a cabo según las recomendaciones del fabricante.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Compuesto que comprende la secuencia aminoácida FGFAHVFIDWLQSLS o FGFAHVYIDWLQSLS o FGFAHVFIDWLQSLN para su utilización en la prevención y/o el tratamiento de la aterosclerosis, enfermedad oclusiva arterial periférica, enfermedad cardíaca coronaria o lesión cerebral apopléjica.
- 10 2. Compuesto para la utilización según la reivindicación 1, caracterizado porque el compuesto se acopla a un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferentemente KLH (hemocianina de lapa californiana).
- 15 3. Compuesto para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque el compuesto se formula para la administración intradérmica, subcutánea o intramuscular.
4. Compuesto para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el compuesto se formula con un adyuvante, preferentemente hidróxido aluminico.
- 20 5. Péptido que consiste en por lo menos una secuencia aminoácida seleccionada de entre el grupo constituido por FGFAHVFIDWLQSLS, FGFAHVYIDWLQSLS y FGFAHVFIDWLQSLN.
6. Formulación farmacéutica que comprende por lo menos un péptido según la reivindicación 5.
7. Formulación según la reivindicación 6, caracterizada porque el péptido se acopla a un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferentemente KLH (hemocianina de lapa californiana).



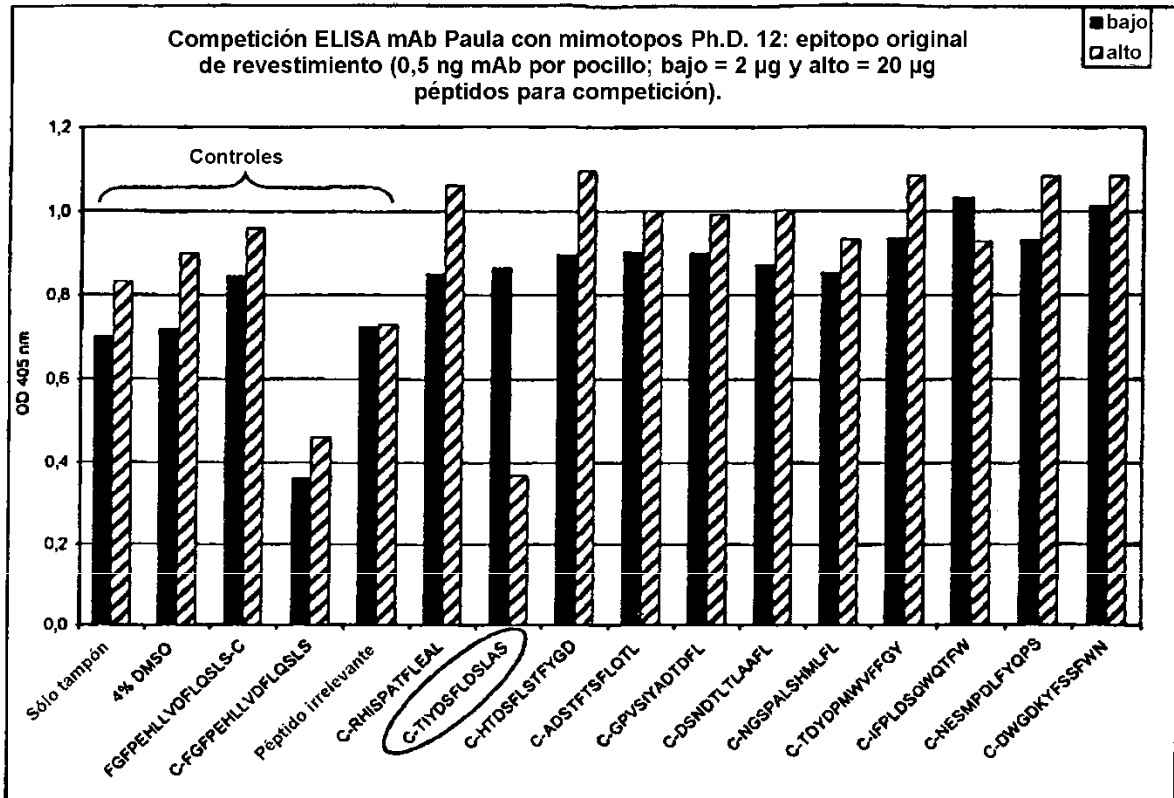


Fig. 2a

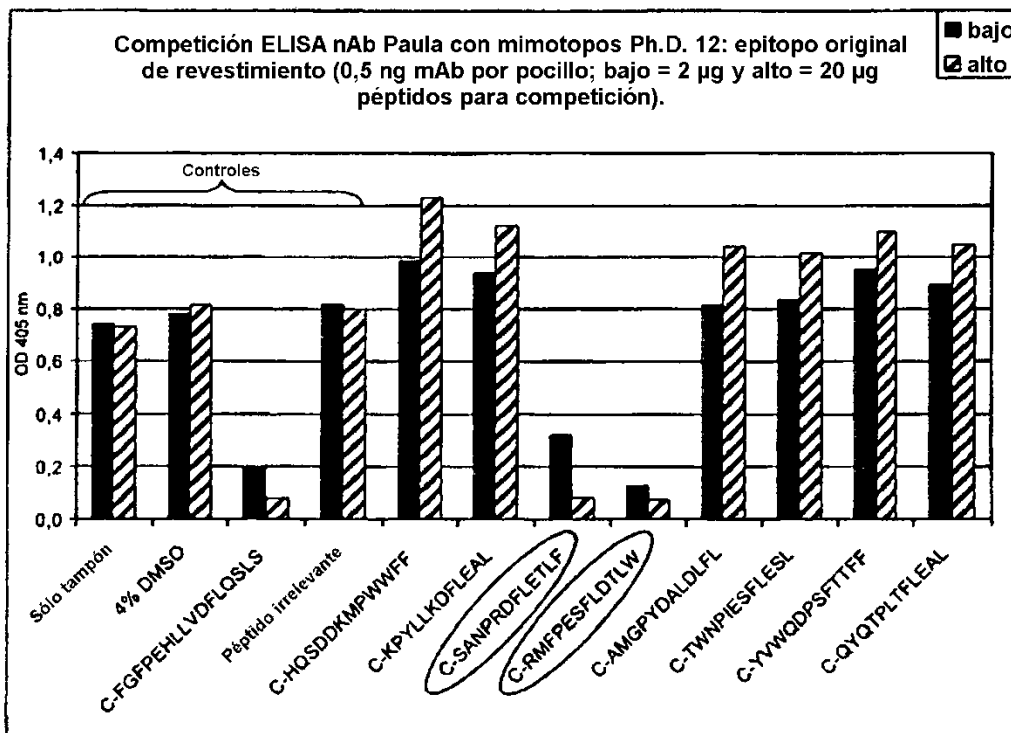


Fig. 2b



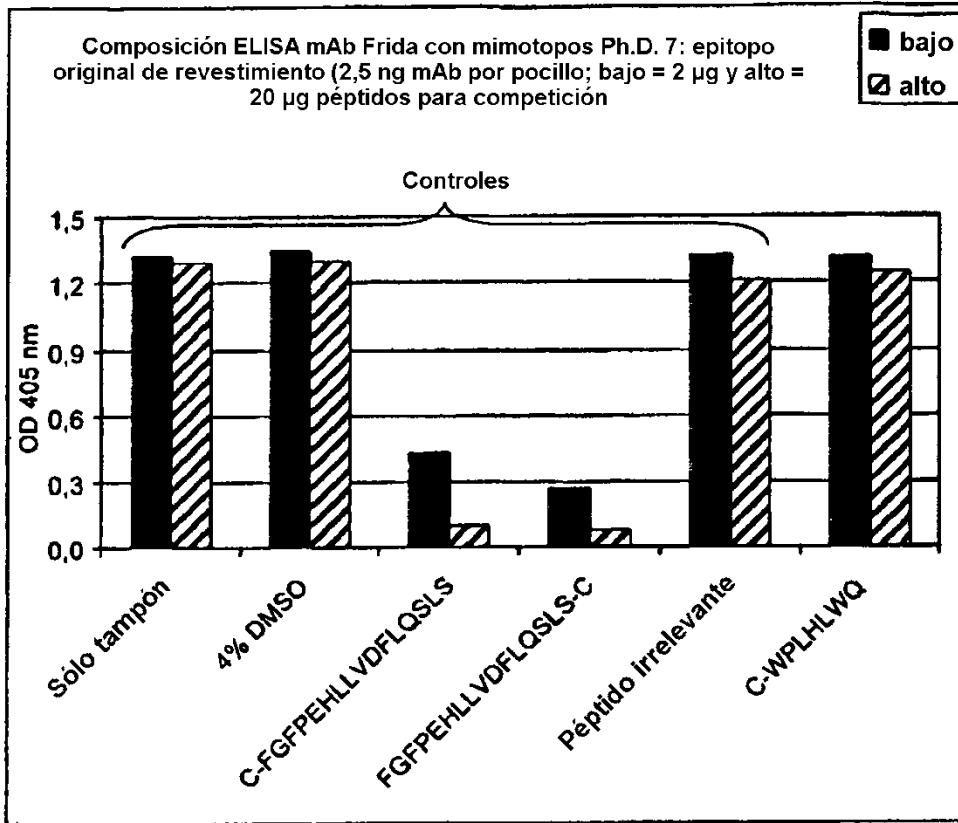


Fig. 3a

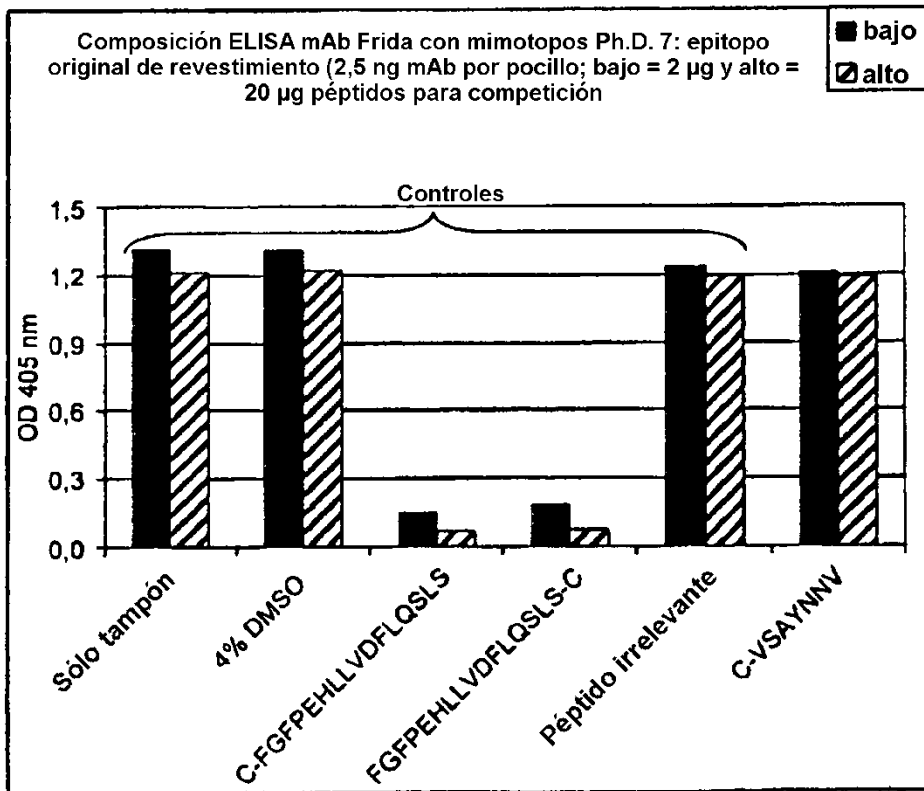


Fig. 3b

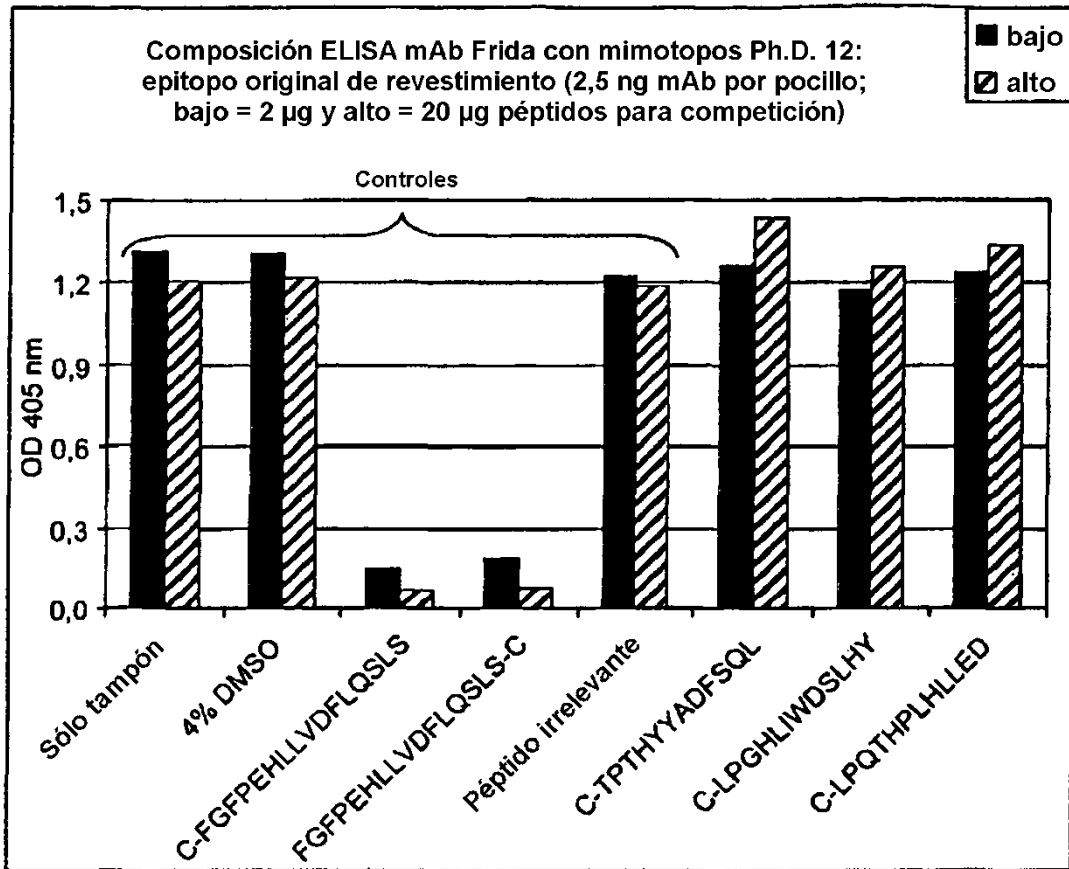


Fig. 4a

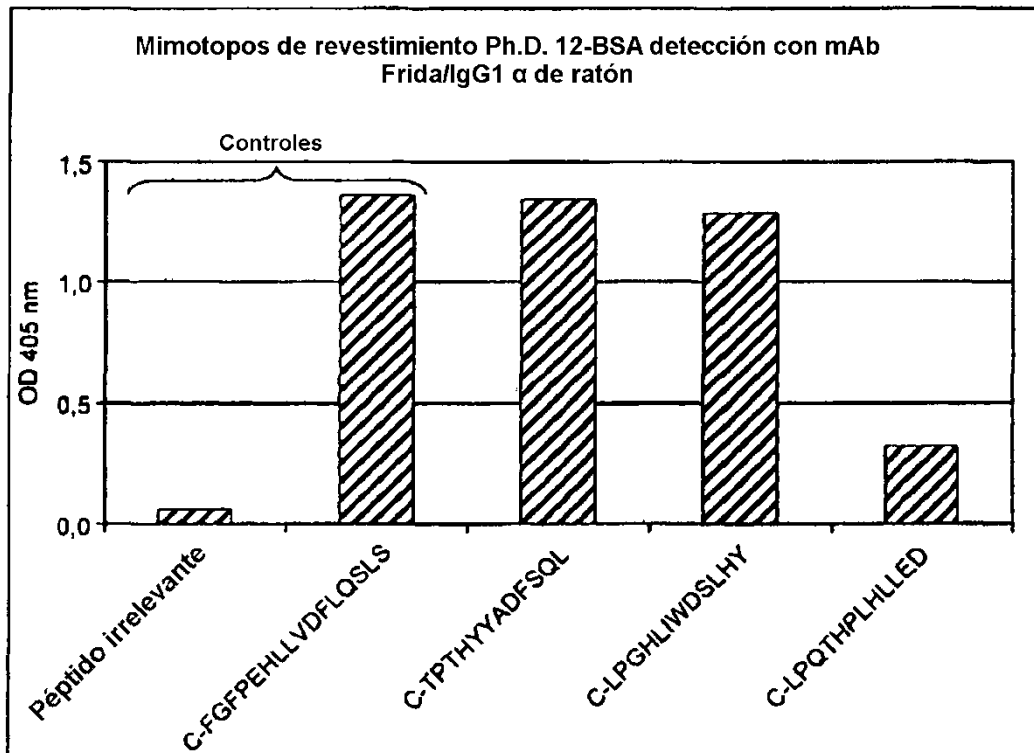


Fig. 4b





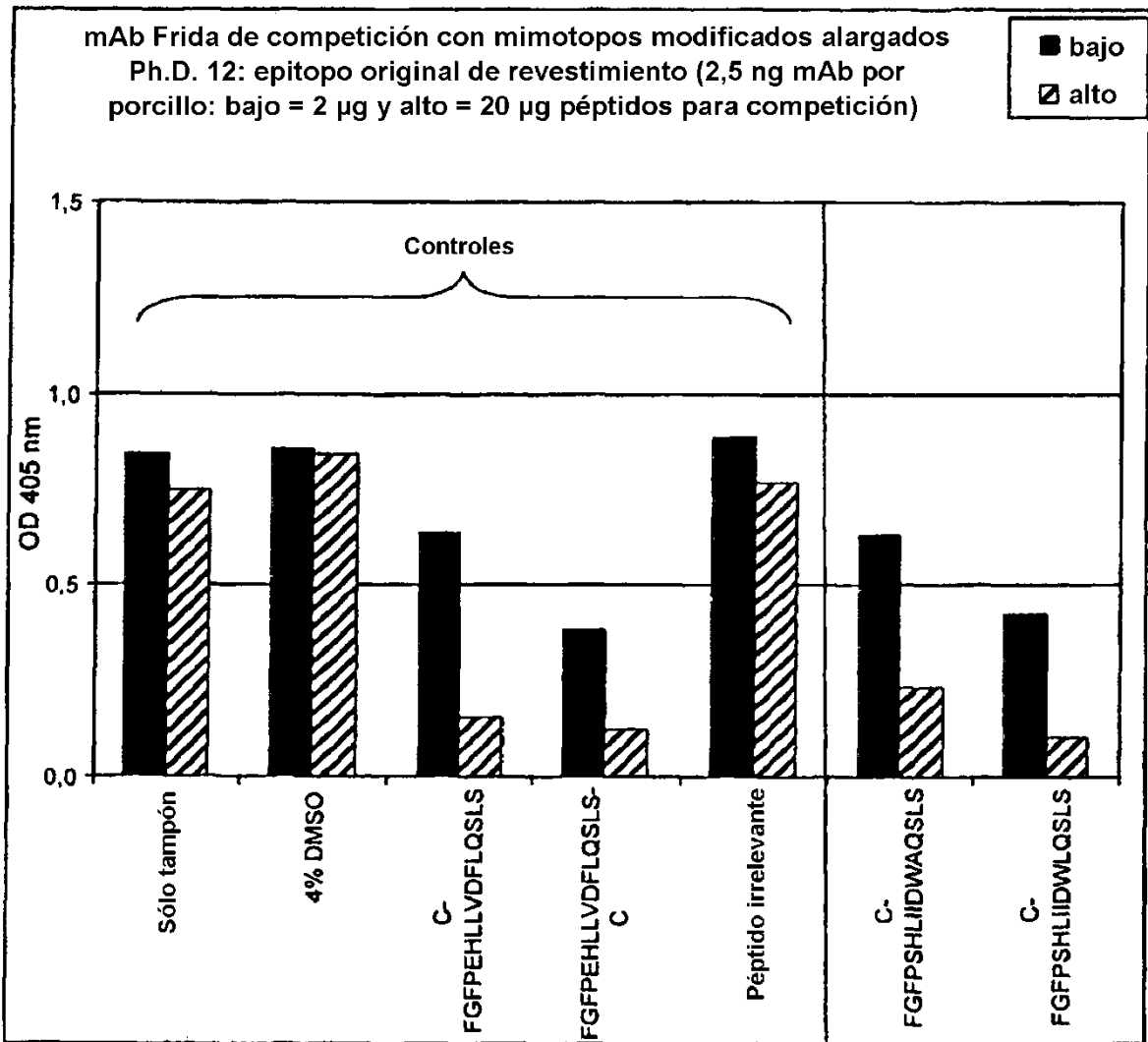


Fig. 6

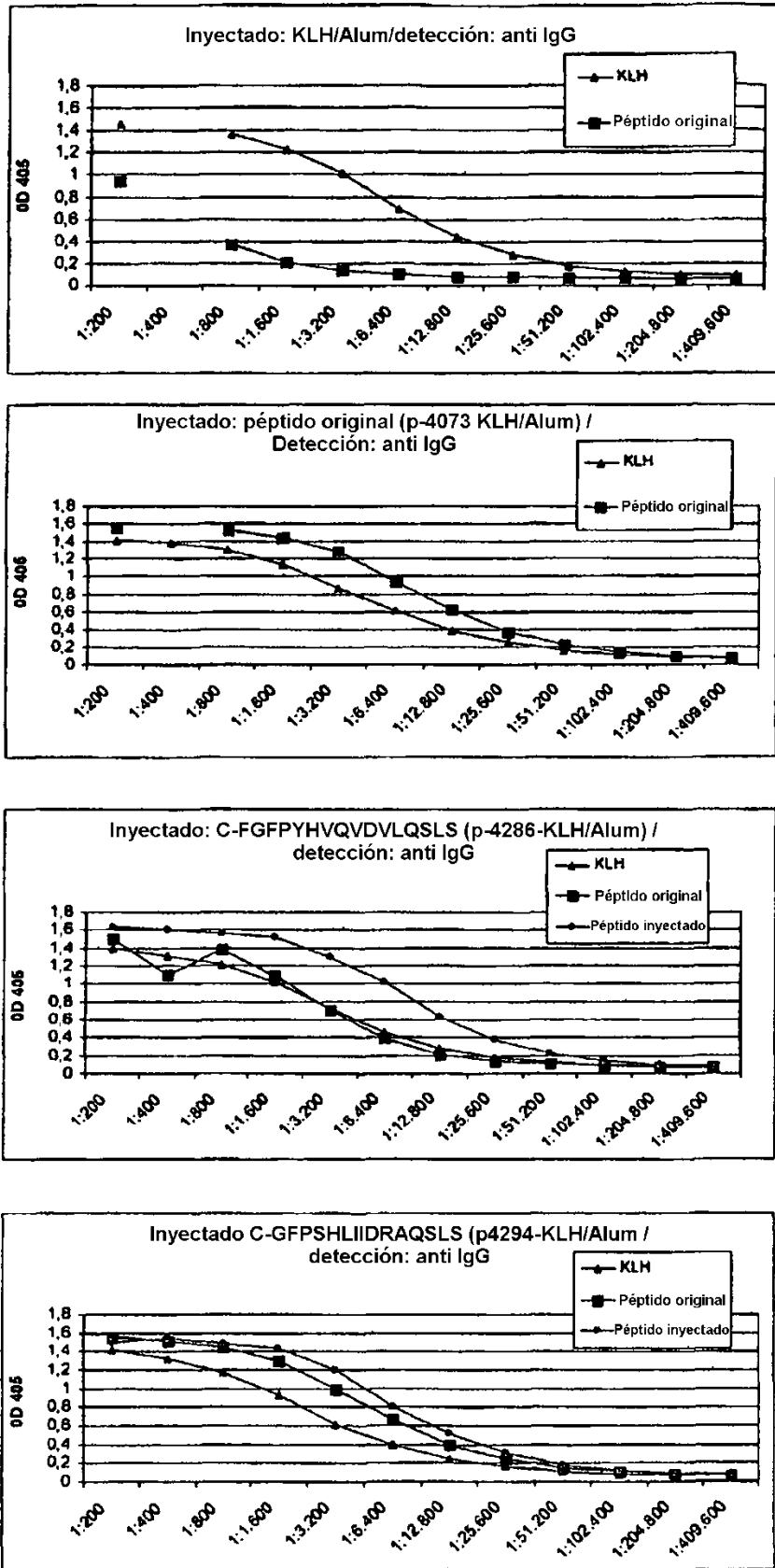


Fig. 7a

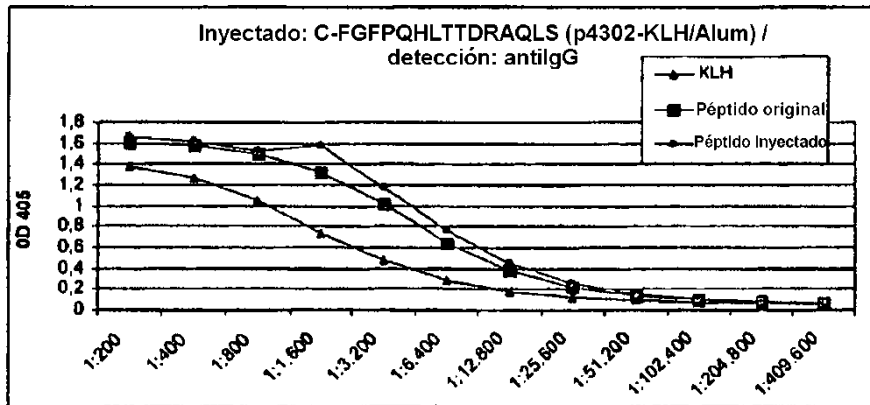
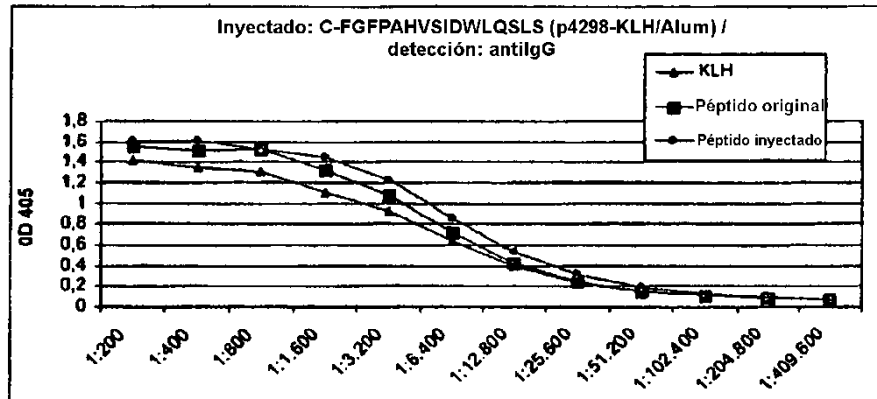
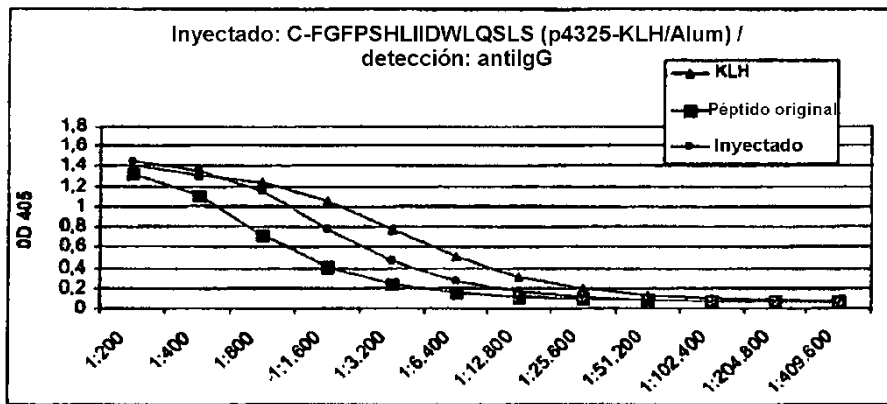
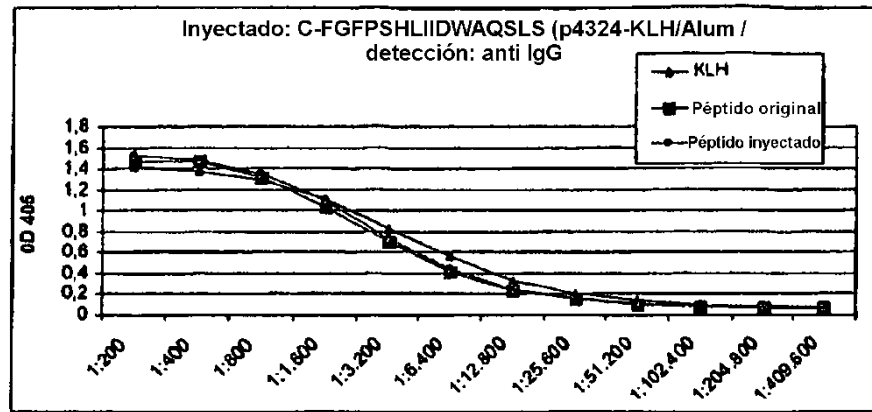


Fig. 7b

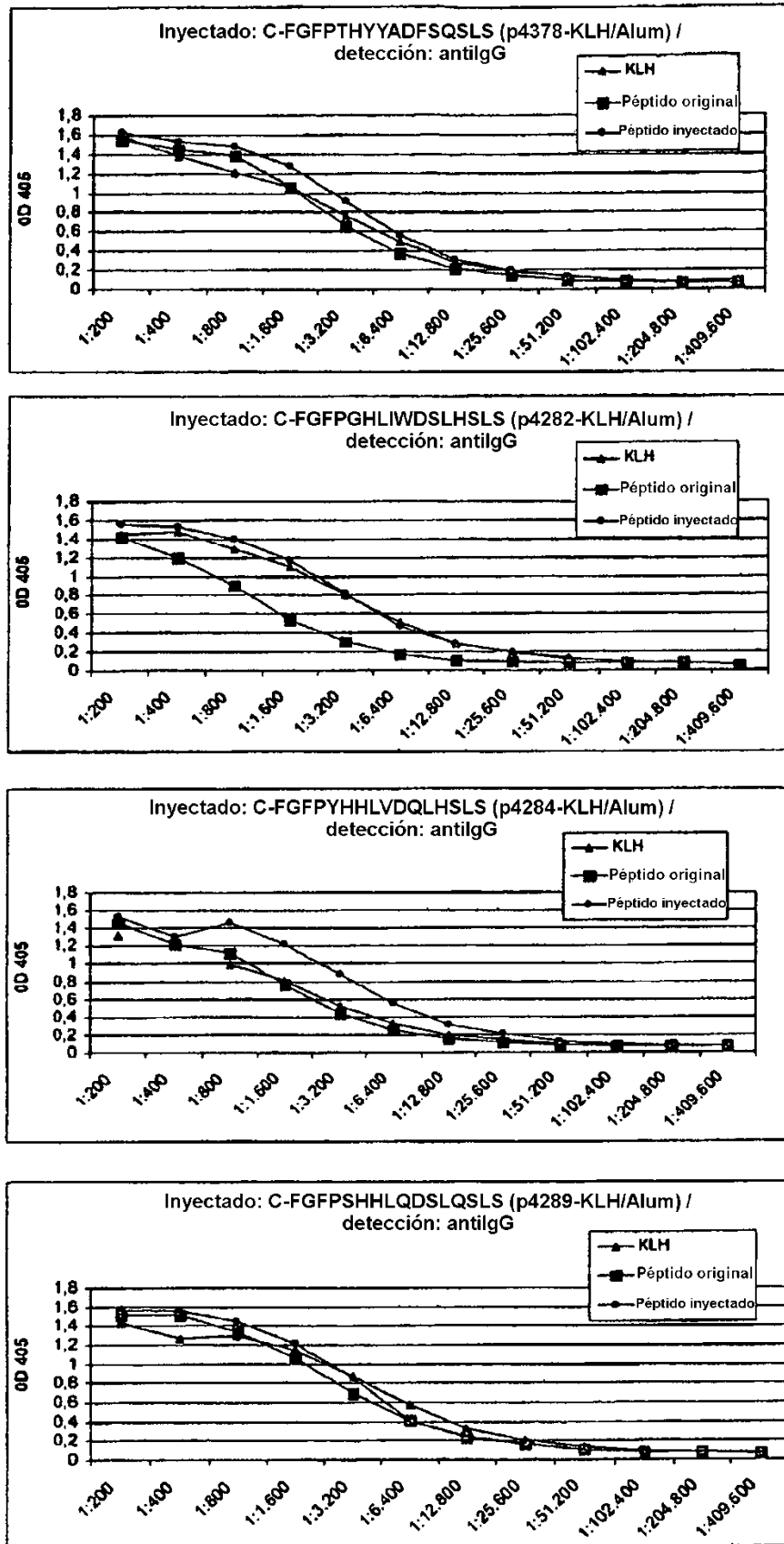


Fig. 7c



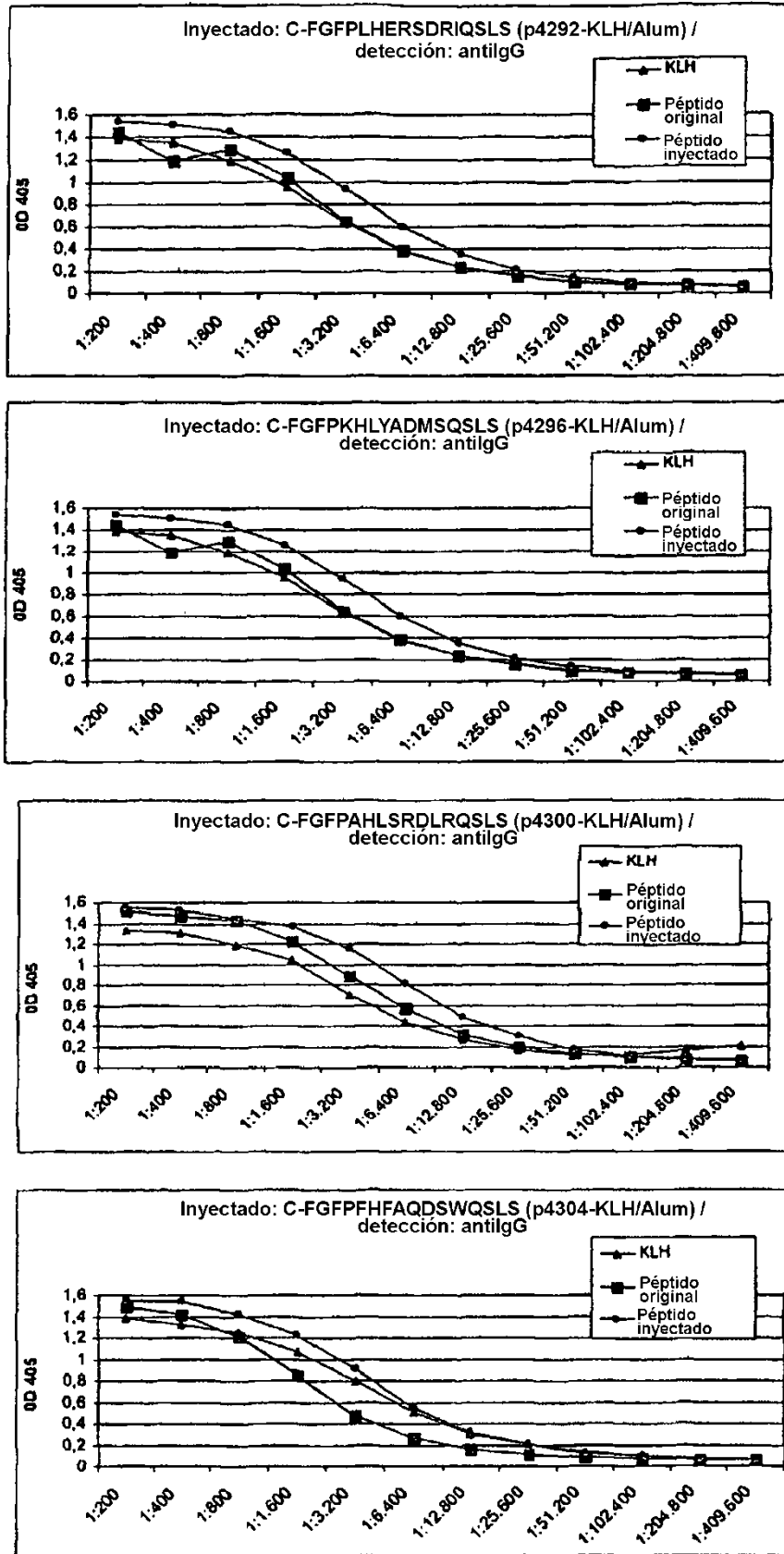


Fig. 7d

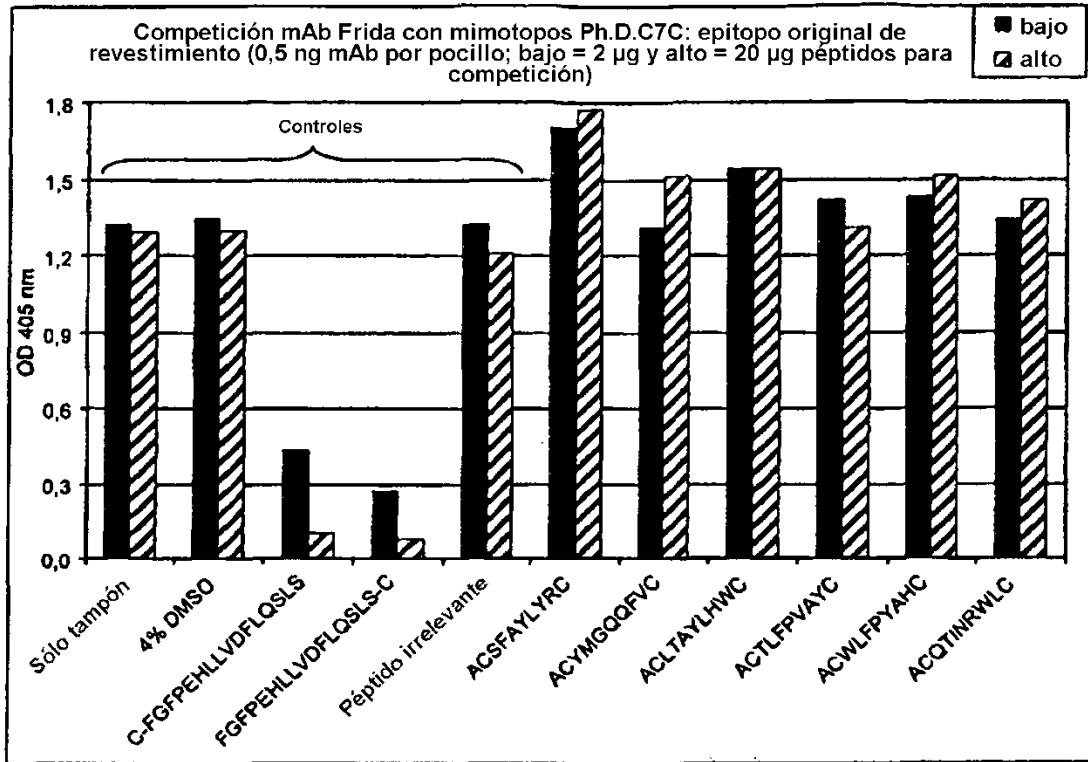


Fig. 8a

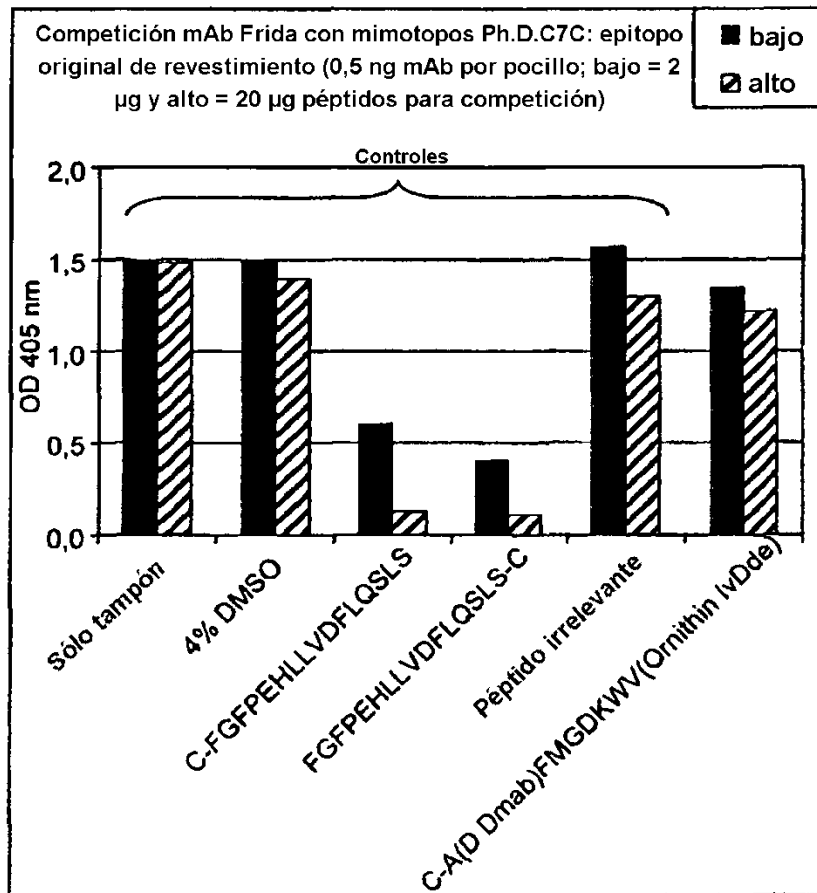


Fig. 8b

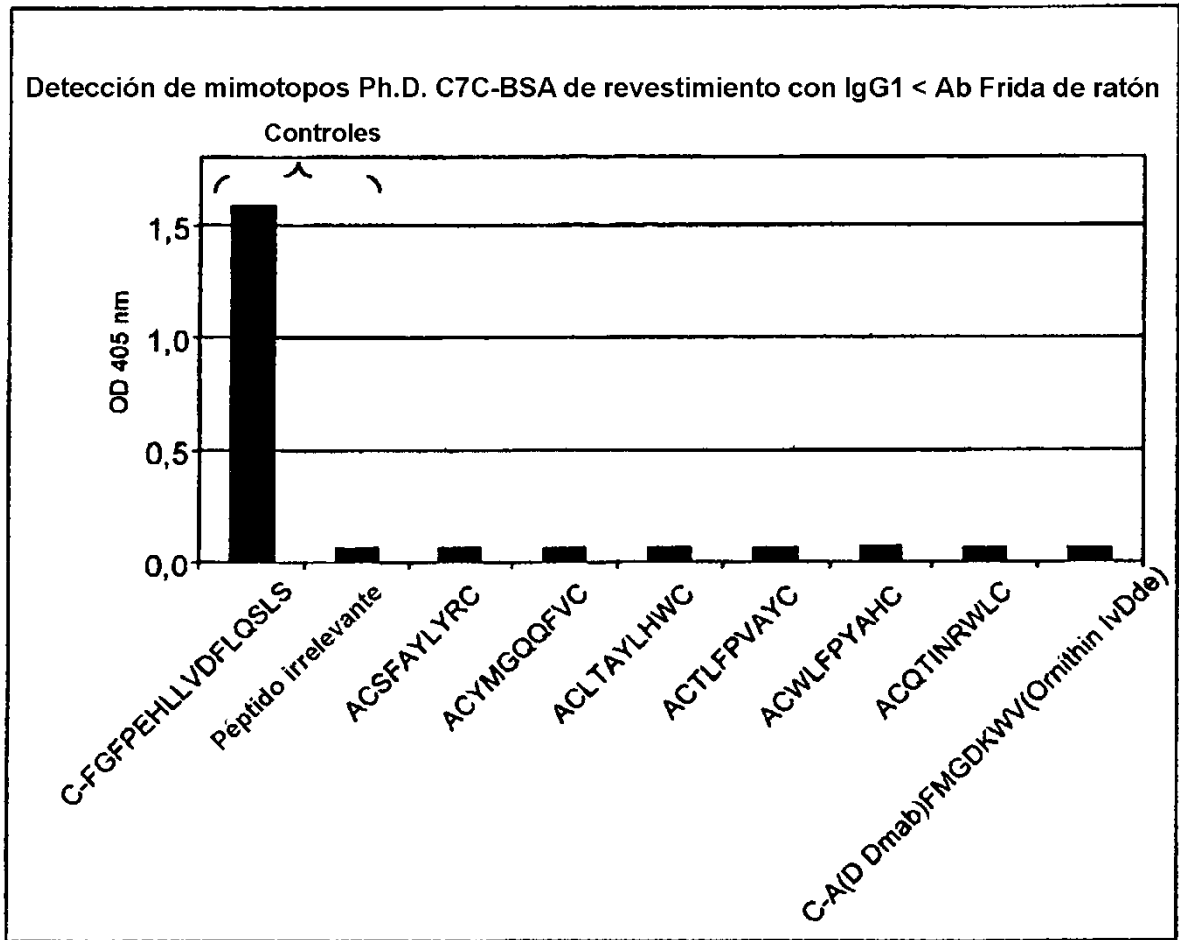


Fig. 9

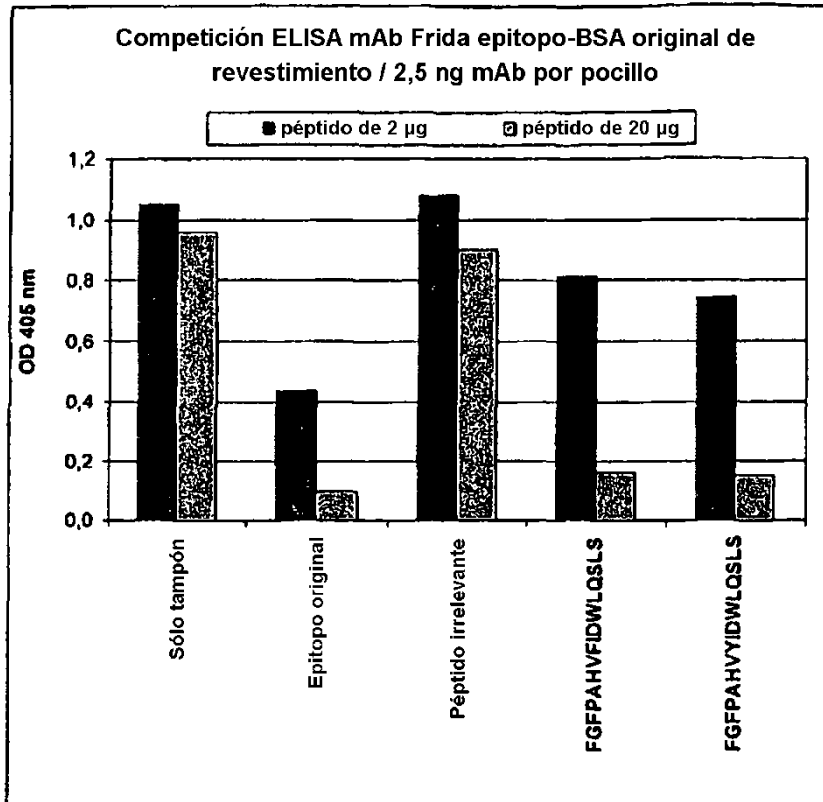


Fig. 10a

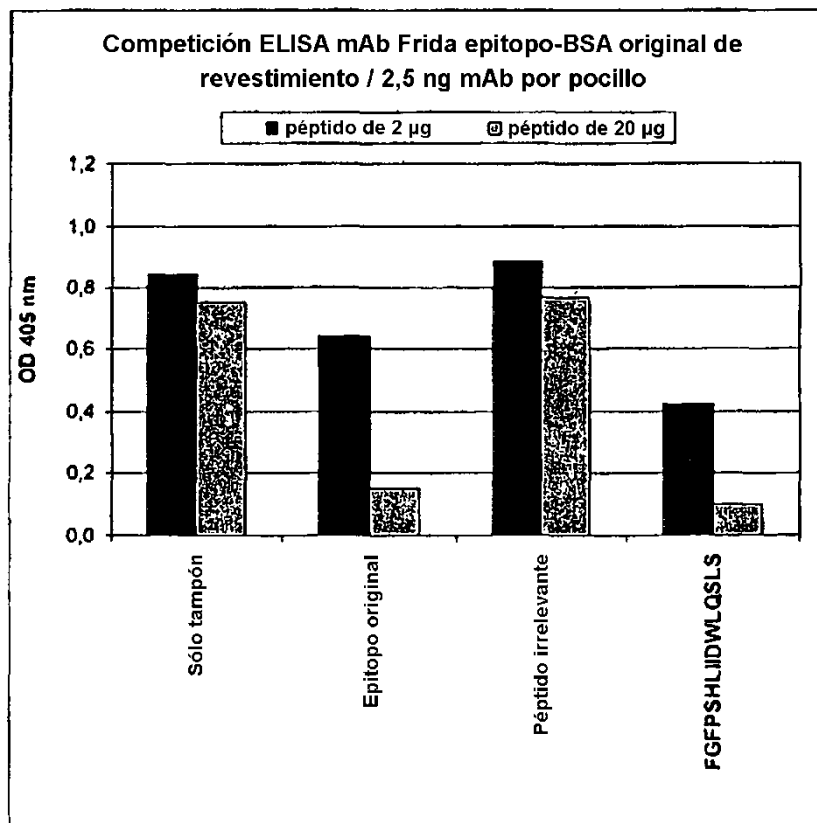


Fig. 10b





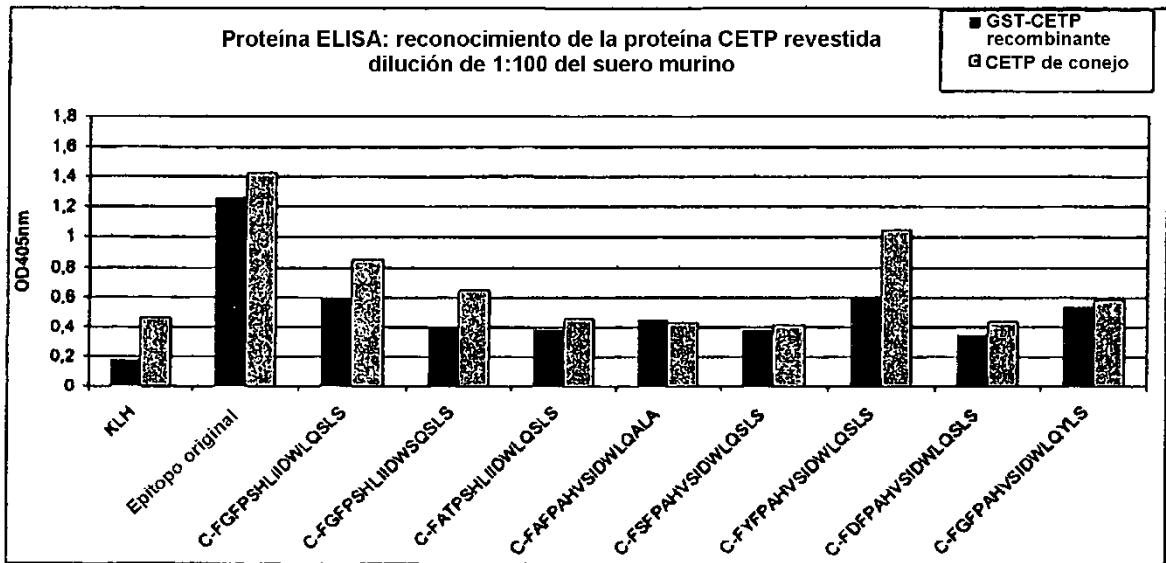


Fig. 12b

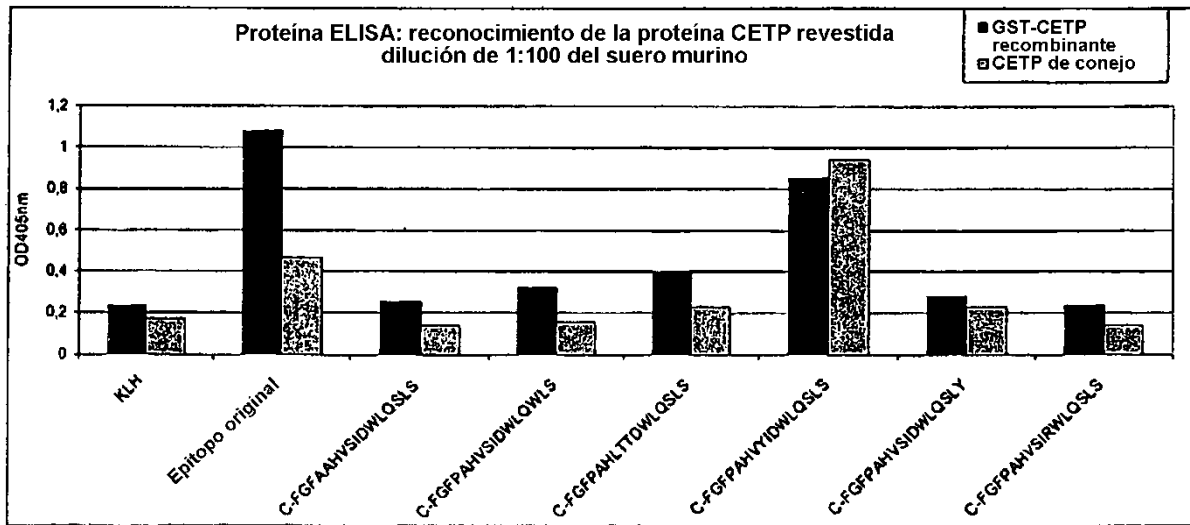


Fig. 13

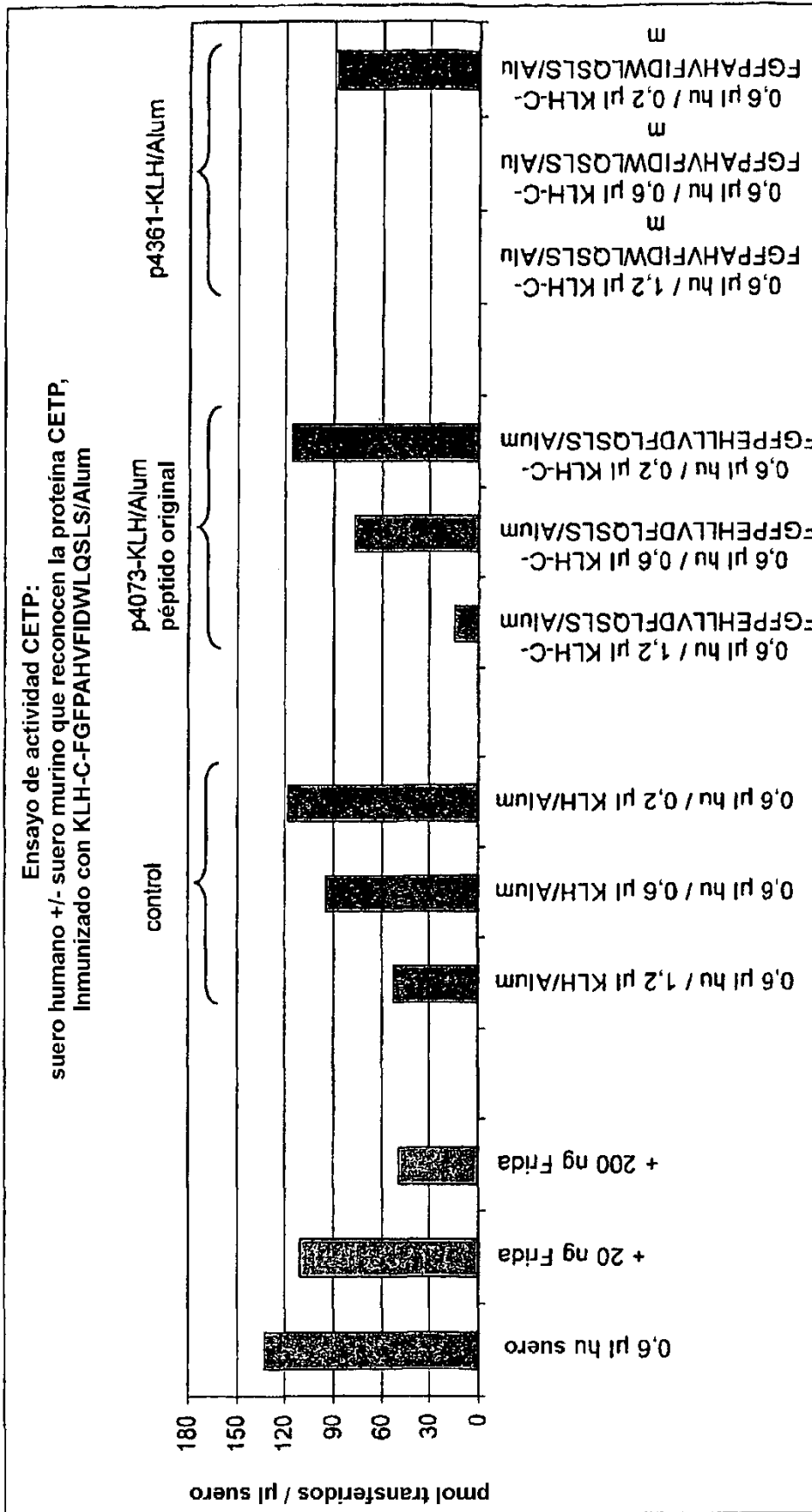


Fig. 14



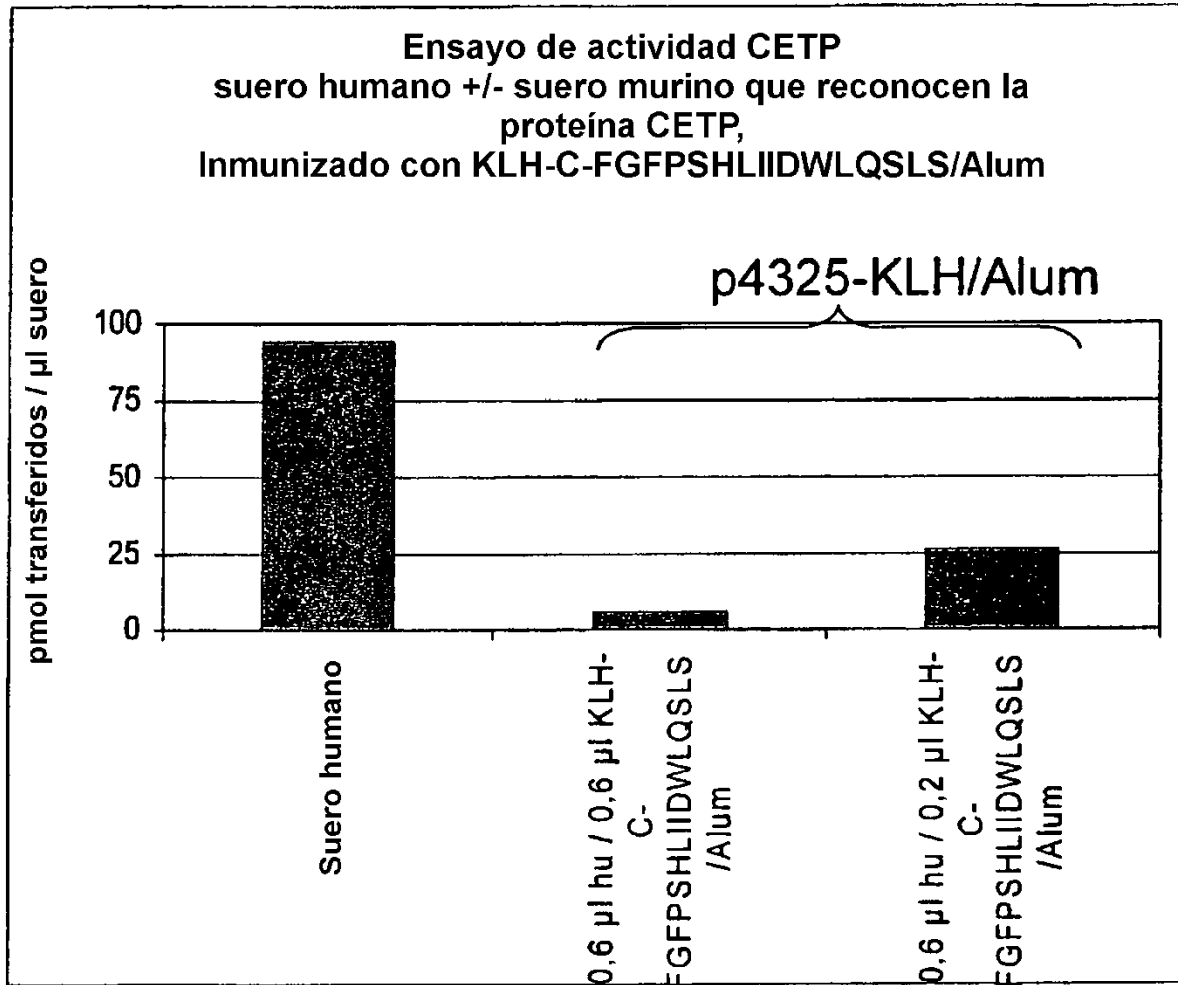


Fig. 15

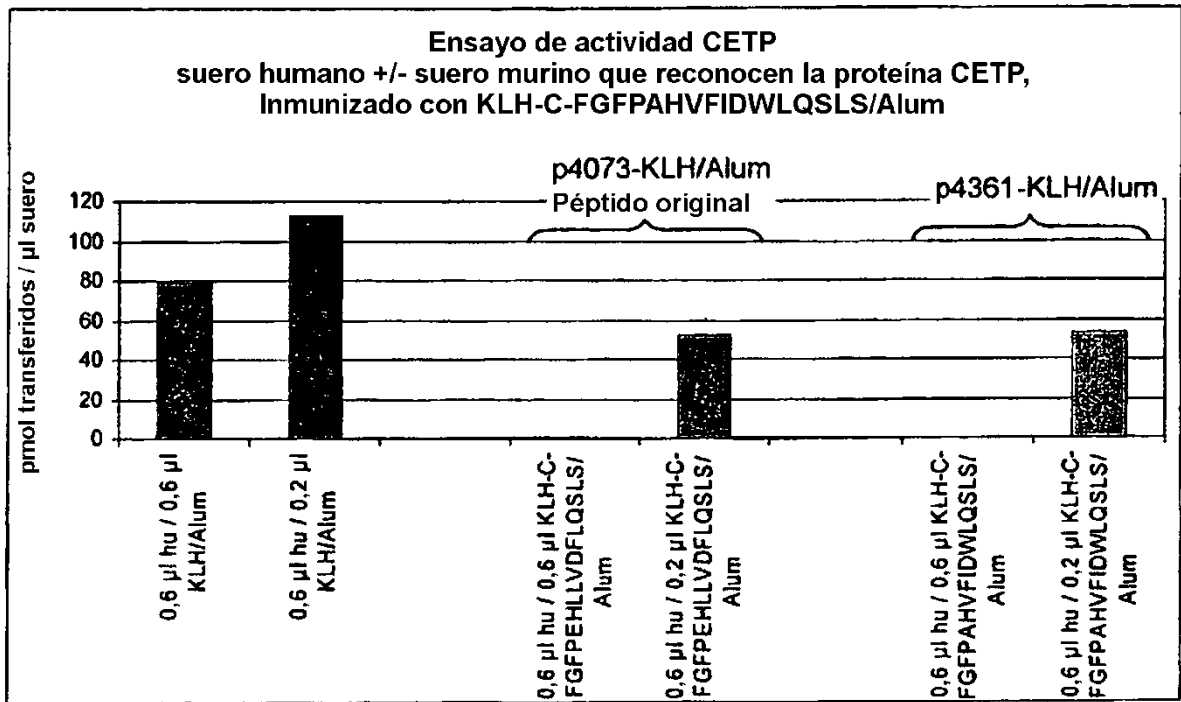


Fig. 16

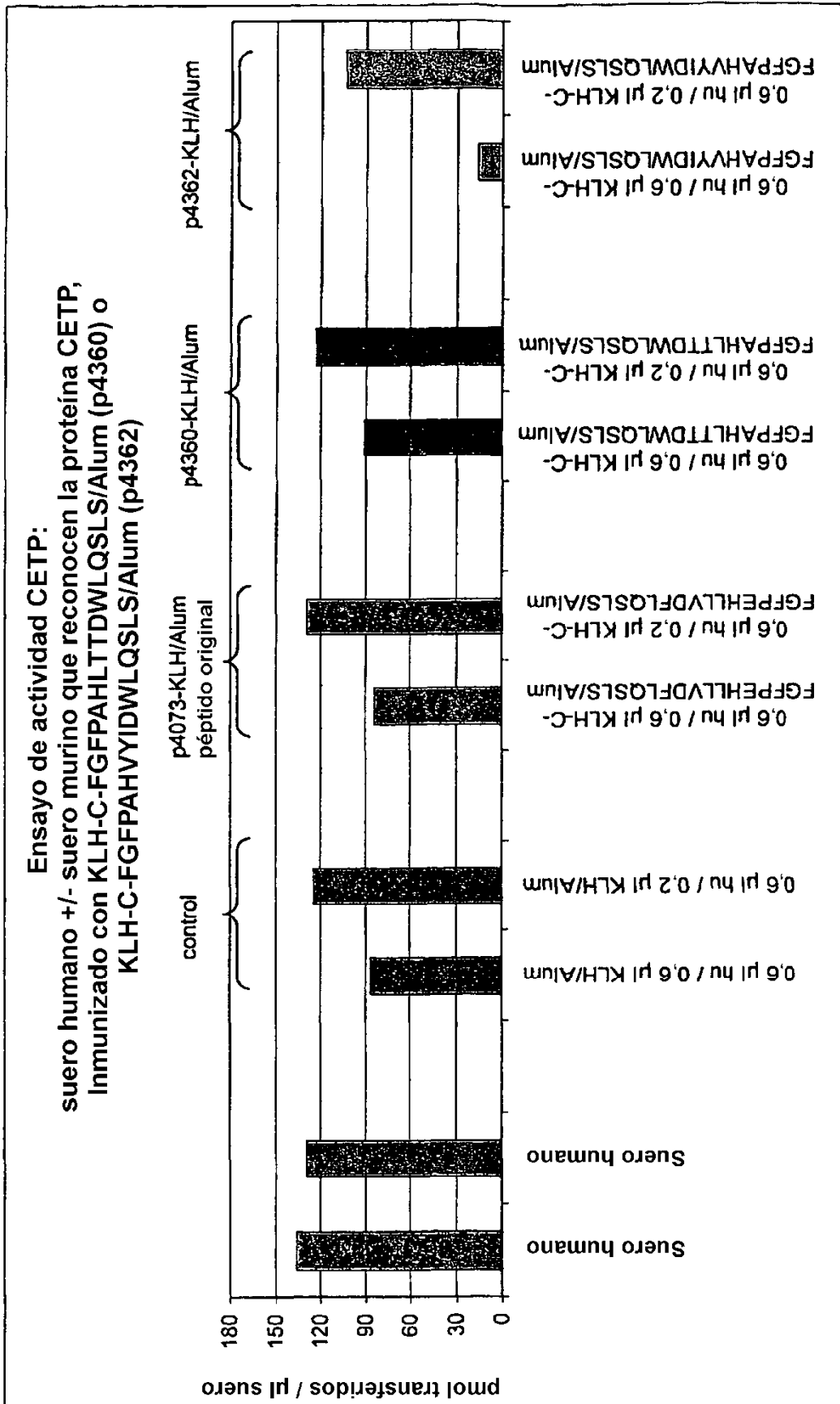


Fig. 17

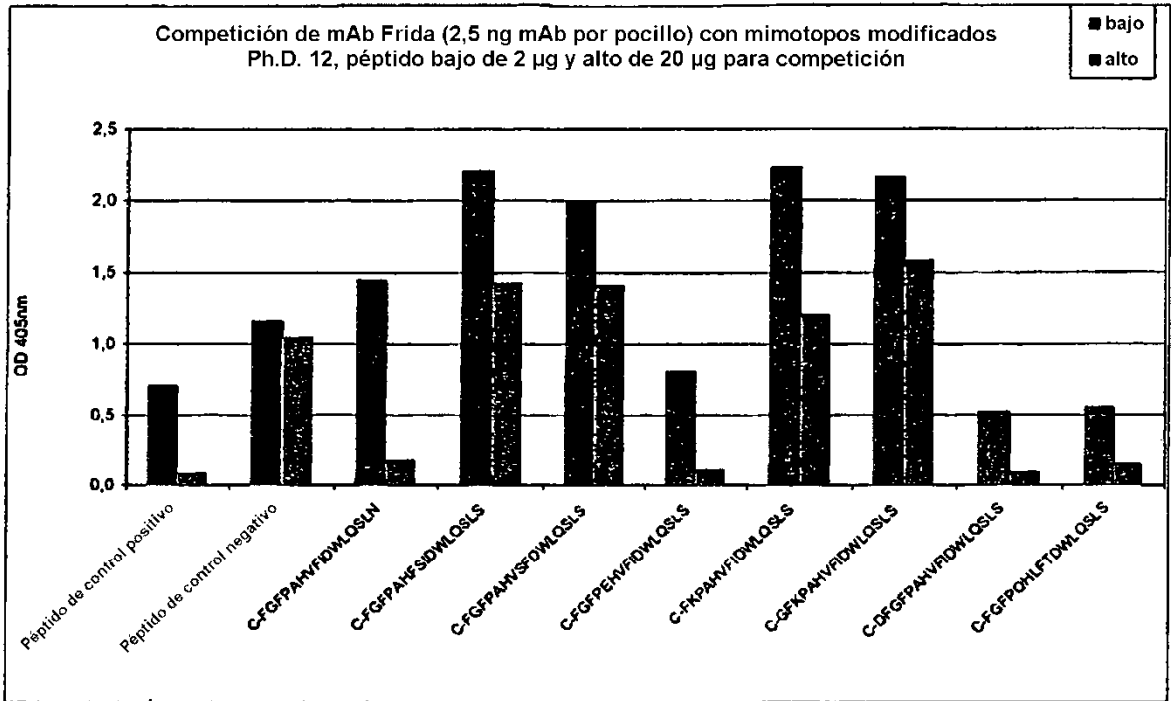


Fig. 18a

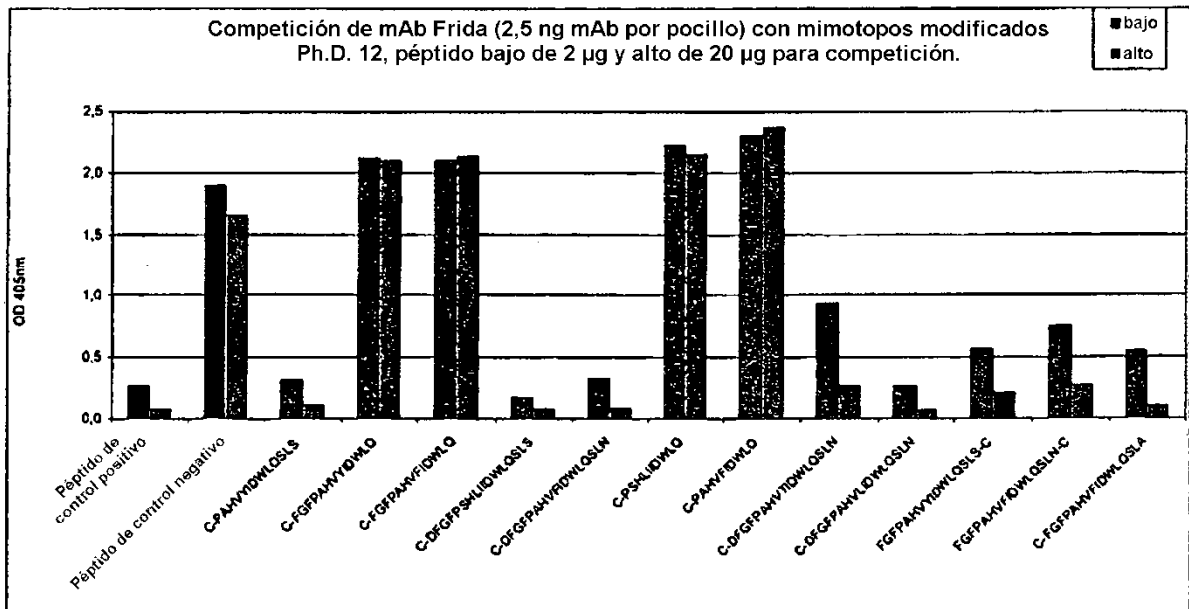


Fig. 18b

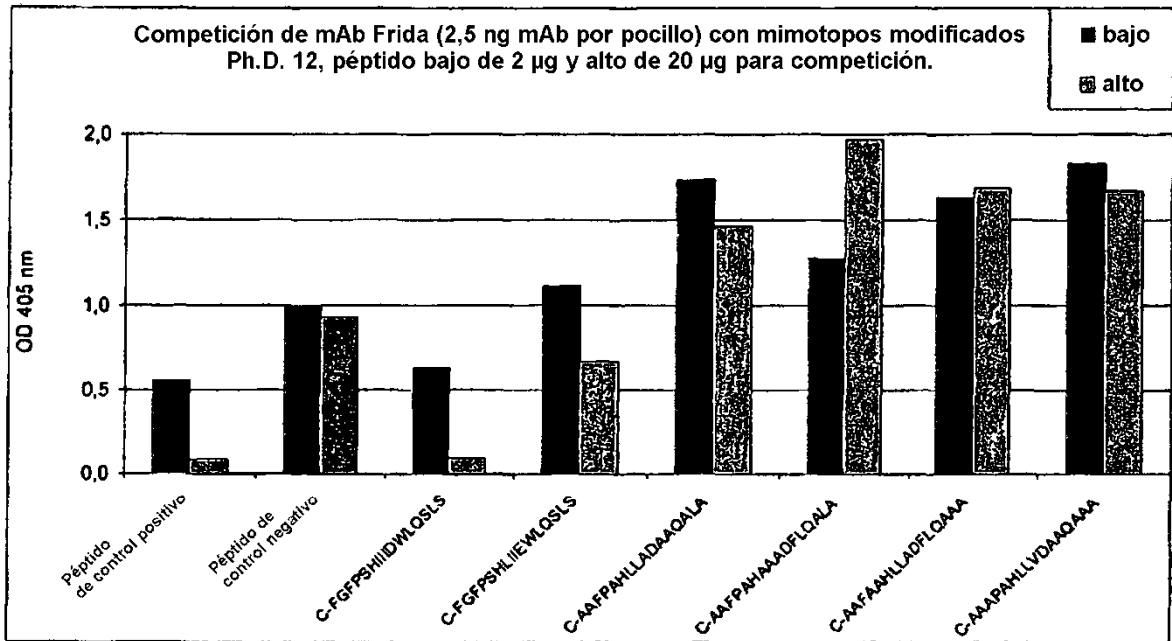
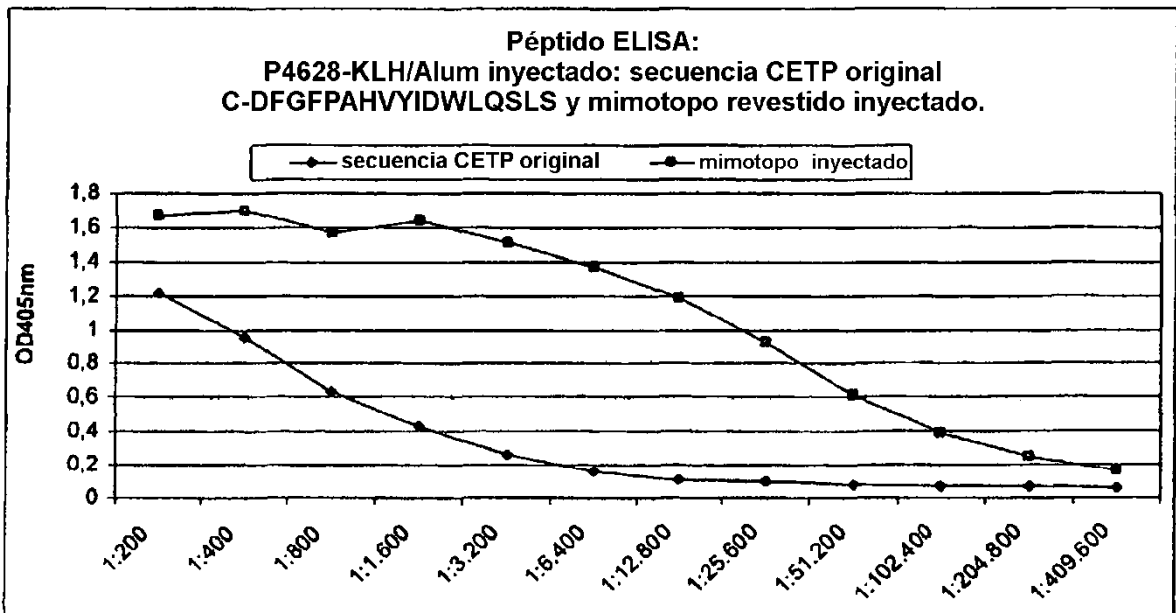
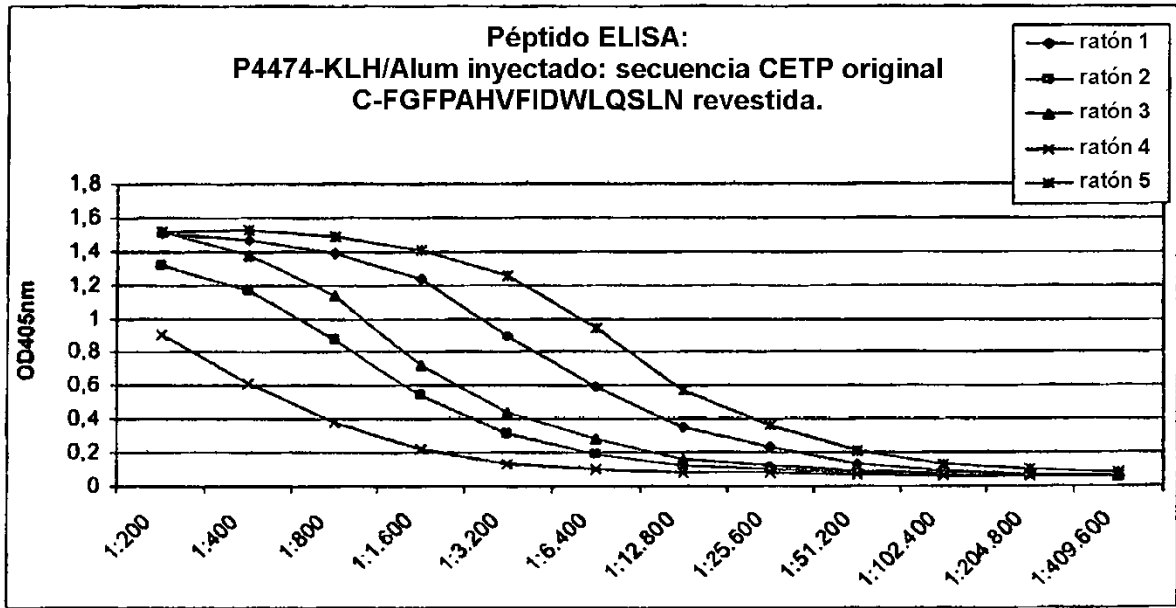


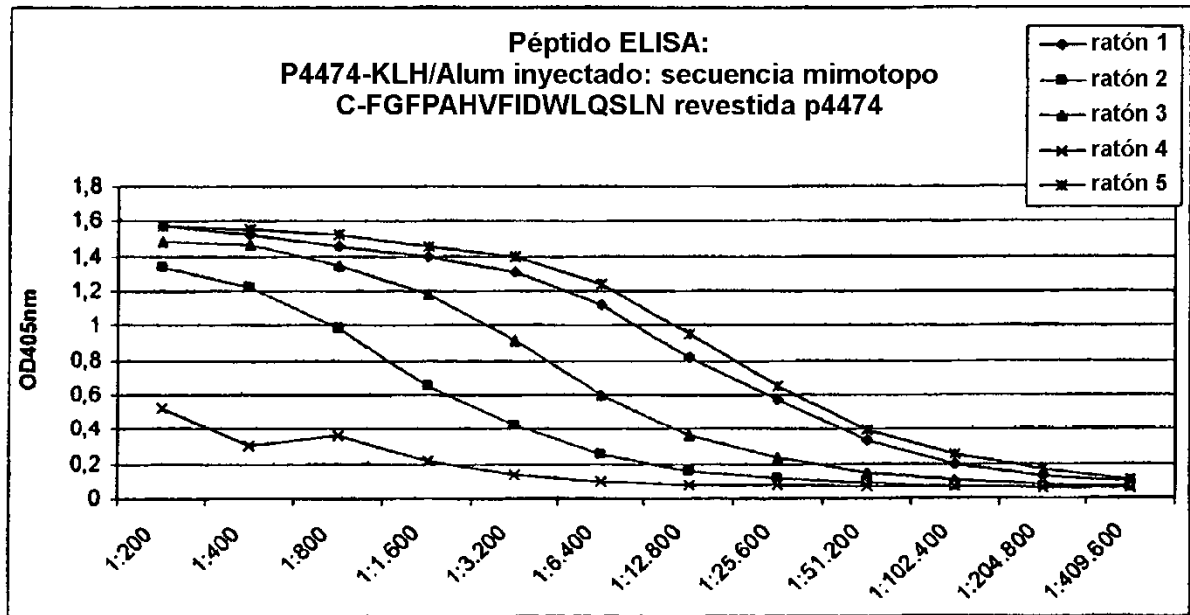
Fig. 18c



19a

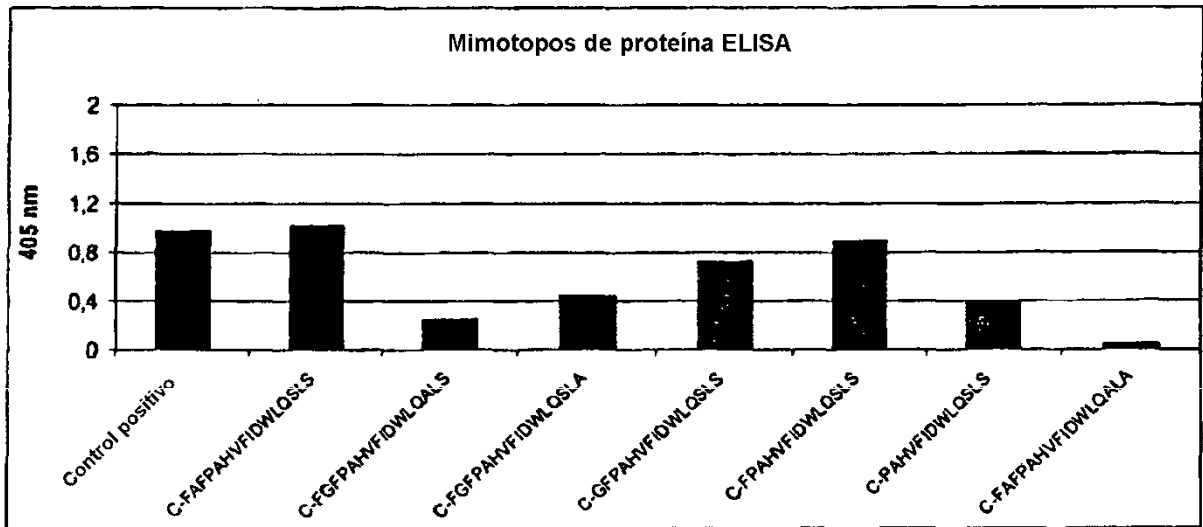


19b



19c





19d

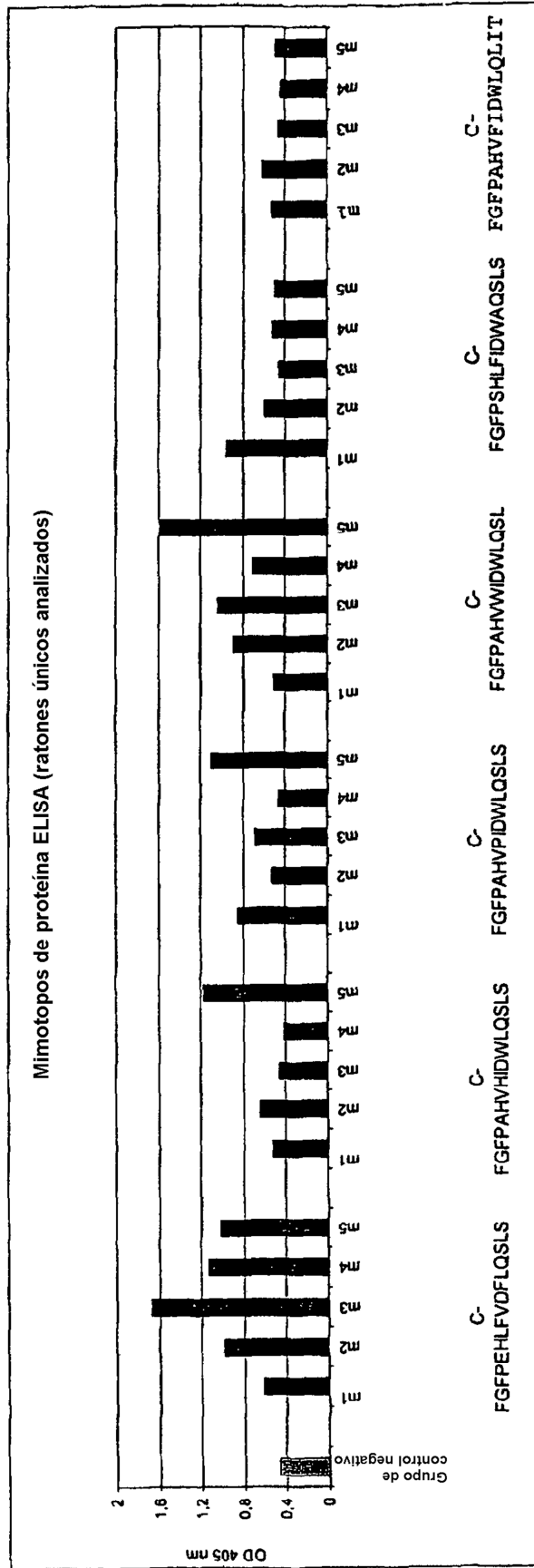


Fig. 19e