

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 830**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/775** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2008 E 12162651 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2520587**

54 Título: **Apolipoproteína A-1 resistente a oxidantes y péptidos miméticos**

30 Prioridad:

**23.10.2007 US 981887 P**

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

**16.02.2017**

73 Titular/es:

**THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION (100.0%)  
9500 Euclid Avenue  
Cleveland, OH 44195, US**

72 Inventor/es:

**SMITH, JONATHAN D. y  
STANLEY, L. HAZEN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 601 830 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

Apolipoproteína A-1 resistente a oxidantes y péptidos miméticos

**Antecedentes de la invención**

- 5 El colesterol en circulación es transportado por lipoproteínas plasmáticas. Las lipoproteínas son partículas de lípido y proteína que transportan lípidos en la sangre. Las lipoproteínas de baja densidad (HDL) y las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son los vehículos de colesterol principales. Se cree que las LDL son responsables del suministro de colesterol desde el hígado a tejidos extrahepáticos en el organismo.
- 10 La expresión "transporte de colesterol inverso" (RCT) describe el transporte de colesterol desde tejidos extrahepáticos al hígado en el que se cataboliza y elimina. Se cree que las partículas de HDL en plasma desempeñan un papel principal en el proceso de transporte inverso, actuando como neutralizadores de colesterol en tejido. El RCT consiste principalmente en tres etapas: (a) eflujo de colesterol, la retirada inicial de colesterol a partir de diversas combinaciones de células periféricas; (b) esterificación de colesterol mediante la acción de lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT), evitando la reentrada de colesterol efluído en las células; y (c) absorción/suministro de éster de colesterol de HDL a células hepáticas.
- 15 Los niveles elevados de HDL y apolipoproteína A-1 (ApoA1), la proteína de HDL principal, se han asociado desde hace tiempo con la disminución del riesgo de enfermedades cardiovasculares. La ApoA1 es una cadena poli peptídica individual con 243 restos de aminoácidos de secuencia de aminoácidos primaria conocida (Brewer y col., (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 623-630). La ApoA1 actúa como un aceptor del colesterol celular en el transporte de colesterol inverso por mediación del ex flujo de colesterol de las células.
- 20 Cada partícula de HDL contiene al menos una copia (y normalmente de dos a cuatro copias) de ApoA1. La ApoA1 se sintetiza en seres humanos en forma de a preapoproteína de 267 restos por el hígado y el intestino delgado que se secreta como una proproteína que se escinde rápidamente por la acción de una proteasa dependiente de calcio para generar un polipéptido maduro de 243 aminoácidos y se secreta en el plasma. Se ha postulado que la Apo A1 posee ocho secuencias de 22 mer de repetición en tándem y dos secuencias de 11 mer, la mayoría de los cuales tienen el potencial para 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 restos con carga positiva en la superficie de contacto polar-no polar y restos con carga negativa en el centro de la cara polar (Segrest y col., (1974) FEBS Lett. 38: 247-253; Segrest y col., (1990) Proteins: Structure, Function, and Genetics 8: 103-117);
- 25 La ApoA1 forma tres tipos de complejos estables con lípidos: complejos con pocos lípidos, pequeños denominados HDL pre-beta-1; partículas discoidales aplanadas que contienen lípidos polares (fosfolípidos y colesterol) denominadas HDL pre-beta-2; y partículas esféricas que contienen lípidos tanto polares como no polares, denominadas HDL esféricas o maduras (HDL<sub>3</sub> y HDL<sub>2</sub>). La mayoría de las HDL en la población circulante contiene tanto ApoA1 como ApoAII (la segunda proteína principal de HDL) y se denominan fracción A1/AII-HDL de HDL. Sin embargo, parece que la fracción de HDL que solamente contiene ApoA1 (denominada en el presente documento la fracción A1-HDL) es más eficaz en el RCT. Ciertos estudios epidemiológicos apoyan la hipótesis de que la fracción A1-HDL es anti-aterogénica. (Parra y col., 1992, Arterioscler. Thromb. 12: 701-707; Decossin y col., 1997, Eur. J. Clin. Invest. 27: 299-307).
- 30 La evidencia que relaciona el colesterol en suero elevado con la enfermedad cardíaca coronaria es abrumadora. Por ejemplo, la aterosclerosis es una enfermedad lentamente progresiva caracterizada por la acumulación de colesterol dentro de la pared arterial. La evidencia convincente apoya el concepto de que los lípidos depositados en lesiones ateroscleróticas se obtienen principalmente a partir del LDL en plasma; de este modo, las LDL se ha llegado a conocer popularmente como "colesterol malo". Por el contrario, los niveles en suero de HDL se correlacionan de forma inversa con la enfermedad con cardíaca coronaria, y como tal se contemplan como un factor de riesgo negativo. Se ha realizado la hipótesis de que los niveles elevados de HDL en plasma no solamente son protectores frente a la enfermedad arterial coronaria, sino que realmente inducen la regresión de placas ateroscleróticas (por ejemplo, Badimon y col., 1992, Circulation 86 (Supl. III): 86-94). Por lo tanto, la HDL se ha llegado a conocer popularmente como el "colesterol bueno".
- 35 La evidencia que relaciona el colesterol en suero elevado con la enfermedad cardíaca coronaria es abrumadora. Por ejemplo, la aterosclerosis es una enfermedad lentamente progresiva caracterizada por la acumulación de colesterol dentro de la pared arterial. La evidencia convincente apoya el concepto de que los lípidos depositados en lesiones ateroscleróticas se obtienen principalmente a partir del LDL en plasma; de este modo, las LDL se ha llegado a conocer popularmente como "colesterol malo". Por el contrario, los niveles en suero de HDL se correlacionan de forma inversa con la enfermedad con cardíaca coronaria, y como tal se contemplan como un factor de riesgo negativo. Se ha realizado la hipótesis de que los niveles elevados de HDL en plasma no solamente son protectores frente a la enfermedad arterial coronaria, sino que realmente inducen la regresión de placas ateroscleróticas (por ejemplo, Badimon y col., 1992, Circulation 86 (Supl. III): 86-94). Por lo tanto, la HDL se ha llegado a conocer popularmente como el "colesterol bueno".
- 40 Peng y col., (J. Biol Chem. 280 n.º 40 (2005) pp 33775 - 33784) desvela que la modificación de tirosina no es necesaria para la pérdida de actividades funcionales de Apolipoproteína A-1 inducida por mieloperoxidasa.
- 45 Davidson y col., (Biochem (1999), 38, pp 14387 -14395) desvela mutantes de ApoA1 con sustituciones de Phe-Trp y muestra que tales mutantes no alteran la conformación de los mutantes con respecto a la proteína de tipo silvestre.
- Brouillette y col., (Biochem (2005), 44, p 16413 - 16425) desvela mediciones de transferencia de energía de resonancia en ApoA1 incluyendo un mutante de ApoA1 que comprende un solo Trp en la posición 50.
- 50 Maiorano y col., (Biochem (2004), 43, p 11717 - 11726) estudia en el dominio bisagra de ApoA1 y describe mutantes de ApoA1 en los que cada uno de los 5 restos de Trp de origen natural se han sustituido con Phe.

**Sumario de la Invención**

La presente invención se refiere a un nuevo mimético de ApoA1 que es capaz de estimular el eflujo de colesterol desde células cargadas con lípido. El nuevo mimético de ApoA1, a diferencia del ApoA1 nativo o miméticos de ApoA1 anteriores, tiene todos los triptófanos en la secuencia de aminoácidos sustituidos con fenilalanina. El nuevo mimético de ApoA1 puede incluir una secuencia de aminoácidos de ApoA1 nativa en la que todos los triptófanos en la secuencia de aminoácidos del nuevo mimético de ApoA1 están sustituidos con fenilalanina.

El nuevo mimético de ApoA1 puede encontrar uso en un procedimiento para tratar trastornos cardiovasculares mediante la administración a un sujeto de una formulación farmacéutica que comprende un nuevo mimético de ApoA1 que es capaz de estimular el eflujo de colesterol desde células cargadas con lípido.

El nuevo mimético de ApoA1 puede encontrar uso en un procedimiento para estimular el eflujo de colesterol desde una célula cargada con lípido. El procedimiento puede incluir la administración a la célula cargada con lípido de una cantidad biológicamente eficaz de un polipéptido purificado. El polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos que comprende una parte aceptora de eflujo de colesterol de SEQ ID NO: 1, en la que cada X es fenilalanina.

**Breve descripción de las figuras**

Las características y ventajas mencionadas anteriormente y otras de la presente invención serán evidentes para los expertos en la materia a la que se refiere la presente invención después de leer la siguiente descripción por referencia a las figuras adjuntas, en las que:

Las Figs. 1 (A-F) ilustran espectrometría de masas en tándem de modificaciones de proteína de ApoA1 aislada a partir de tejido de ateroma humano. Los espectros de disociación inducidos por colisión se adquirieron después de digestión directa o triptica en gel de ApoA1 purificada por inmunofinidad obtenidos a partir de ateroma humano. Se detectaron iones con doble carga y se fragmentaron en un experimento de espectrometría de masas en tándem de LC. A. Péptido D1-R10 (SEQ ID NO: 70) que contiene monohidroxitriptófano en el resto 8. B. Péptido L46-K59 (SEQ ID NO: 71) que contiene monohidroxitriptófano en el resto 50. C. Péptido E62-K77 que contiene monohidroxitriptófano en el resto 72 (SEQ ID NO: 72). D. Péptido W108-R116 (SEQ ID NO: 73) que contiene monohidroxitriptófano en el resto 108 y sulfóxido de metionina en el resto 112. E. El mismo péptido que en D, pero el triptófano en el resto 108 se convierte en dihidroxitriptófano (SEQ ID NO: 74). F. Péptido L41-R49 (SEQ ID NO: 75) que contiene sulfóxido de metionina como en el resto 48.

La Fig. 2 ilustra un gráfico de modificación de lisina en ApoA1 aislada de plasma humano y tejido de ateroma humano. La ApoA1 se aisló mediante cromatografía de afinidad a partir del plasma de seis sujetos sanos y de seis muestras de ateroma. Los niveles de ácido 2-aminoadípico, un producto de modificación de lisina, se cuantificaron mediante espectrometría de masas después de hidrólisis ácida, y se normalizaron con respecto al contenido de lisina de ApoA1. Los datos muestran la media de determinaciones por duplicado para cada muestra ( $p = 0,005$  mediante un ensayo t de dos colas).

La Fig. 3 ilustra representaciones que muestran que la protección de restos de lisina mediante metilación reductora no los protege de su inactivación por el sistema MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Cl<sup>-</sup> completo. La ApoA1 (círculos rellenos, línea sólida) y la ApoA1 metilada de forma reductora (círculos abiertos, línea discontinua) se sometieron a modificación con MPO a proporciones molares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:ApoA1 variables. A continuación, estas proteínas se sometieron a ensayo para actividad aceptora de colesterol celular dependiente de ABCA1 durante un periodo de incubación de 4 h a 5 µg/ml con células RAW264.7 etiquetadas con colesterol, que se habían tratado con 8Br-cAMP 0,3 mM para inducir ABCA1. Los datos son la media ± D.T. de determinaciones por triplicado, cuando no aparecen barras, la D.T. está dentro del símbolo.

Las Figs. 4 (A-B) ilustran un gráfico (A) y representación (B) que muestra que la ApoA1 sustituida con metionina con respecto a valina aumentan la susceptibilidad con respecto a la pérdida de función mediada por MPO. A. La modificación de MPO de dosis elevada, a una proporción molar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:ApoA1 de 15:1, se realizó en ApoA1 recombinante humana (rh-ApoA1), rh-ApoA1 3MV (3 Met internas sustituidas con Val), y rh-ApoA1 3MV tratada con ácido fórmico (rh-ApoA1 3MV F.A.), que produce una delección del inicio de la etiqueta de Met y 6-His a partir de la proteína recombinante. La actividad de eflujo de colesterol celular se determinó como se describe en la Fig. 1. Los datos son la media ± D.T. de determinaciones por duplicado. B. rh-ApoA1 (círculos rellenos, línea sólida) y rh-ApoA1 3MV (círculos abiertos, línea discontinua) se sometieron a modificación con MPO a proporciones molares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:ApoA1 variables. A continuación, estas proteínas se sometieron a ensayo para actividad aceptora de colesterol celular dependiente de ABCA1 como se describe en la Fig. 3. Los datos son la media ± D.T. de determinaciones por triplicado. \*,  $p < 0,01$  con respecto a rh-ApoA1 3MV a la misma proporción molar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:ApoA1, mediante ensayo t de dos colas.

Las Figs. 5 (A-B) ilustran representaciones que muestran el efecto de sustituciones de triptófano por fenilalanina o leucina en la función de rh-ApoA1, y la resistencia de la sustitución de fenilalanina con respecto a inactivación mediante MPO. A. Se sometieron a ensayo concentraciones variables de rh-ApoA1 (círculos cerrados, línea sólida), rh-ApoA1 4WF (cuatro triptófanos convertidos en fenilalanina, círculos abiertos, línea discontinua), y rh-ApoA1 4WL (cuatro

triptófanos convertidos en leucina, cuadrados abiertos, línea de puntos) para actividad aceptora de colesterol celular como se describe en la Fig. 3. La variante 4WF conservaba en gran medida esta actividad, mientras que la variante 4WL perdía esta actividad. Los datos son la media  $\pm$  D.T. de determinaciones por triplicado. B. rh-ApoA1 (círculos rellenos, línea sólida) y rh-ApoA1 4WF (círculos abiertos, línea discontinua) se sometieron a modificación con MPO a proporciones molares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:ApoA1 variables. A continuación, estas proteínas se sometieron a ensayo para actividad aceptora de colesterol celular dependiente de ABCA1 como se describe en la Fig. 3. Los datos son la media  $\pm$  D.T. de determinaciones por triplicado. \*, p < 0,05; y \*\*, p < 0,0001 con respecto a rh-ApoA1 a la misma proporción molar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:ApoA1, respectivamente, mediante ensayo t de dos colas.

La Fig. 6 ilustra una representación que muestra que ApoA1 sustituida con triptófano con respecto a fenilalanina es resistente a la pérdida de función mediada por HOCl. La rh-ApoA1 (círculos rellenos, línea sólida) y rh-ApoA1 4WF (círculos abiertos, línea discontinua) se sometió a modificación a proporciones molares de HOCl: ApoA1 variables. A continuación, estas proteínas se sometieron a ensayo para actividad aceptora de colesterol celular dependiente de ABCA1 como se describe en la Fig. 3. Los datos son la media  $\pm$  D.T. de determinaciones por triplicado. \*\*, p < 0,0001 con respecto a rh-ApoA1 a la misma proporción molar de HOCl:ApoA1, respectivamente, mediante ensayo t de dos colas.

Las Figs. 7 (A-B) ilustran representaciones que muestran que rh-ApoA1 4WF se une a lípido así como a rh-ApoA1 y su actividad de unión a lípido es resistente a oxidación mediada por MPO. A. Se prepararon emulsiones de dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) (125  $\mu$ g) y se incubaron sin adición (línea gruesa sólida) o con la adición de 25  $\mu$ g de rh-ApoA1 (línea fina sólida) o rh-ApoA1 4WF (línea de puntos). La unión a lípido y la solubilización se controló mediante la pérdida de turbidez mediante lectura de absorbancia a 325 nm en el tiempo a 24 °C (n = 3 por condiciones, media  $\pm$  D.T.). La variante 4WF proporcionaba una eliminación de DMPC similar en comparación con la rh-ApoA1 de tipo silvestre. B.. rh-ApoA1 (círculos rellenos, línea sólida) y rh-ApoA1 4WF (círculos abiertos, línea discontinua) se sometieron a modificación con MPO a proporciones molares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:ApoA1 variables. A continuación, estas proteínas se sometieron a ensayo para actividad de unión a lípido mediante prevención de agregación de LDL dependiente de fosfolipasa C. Los datos se normalizan con respecto a la actividad de unión a lípido de rh-ApoA1 tratada en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los datos una media + D.T. de determinaciones por triplicado. \*, p < 0,05; y \*\*, p < 0,001 con respecto a rh-ApoA1 4WF a la misma proporción molar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:ApoA1, respectivamente, mediante ensayo t de dos colas. Los datos muestran que la rh-ApoA1 4WF no pierde su actividad de unión a lípido a una dosis de modificación de MPQ que disminuía la actividad de unión lípido de la rh-ApoA1 de tipo silvestre.

La Fig. 8 ilustra una inmunotransferencia que muestra que ApoA1 sustituida con triptófano con respecto a fenilalanina aún es susceptible a reticulación por MPO. La rh-ApoA1, y la rh-ApoA1 4WF se sometieron a modificación con MPO a las siguientes proporciones molares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:ApoA1; 0, 1, 2, 3, 5, y 12,5 (de izquierda a derecha). La reticulación de ApoA1 se evaluó de forma cualitativa mediante transferencia de Western. La migración de los patrones de peso molecular se muestra en el lado izquierdo.

La Fig. 9 ilustra un gel de gradiente que muestran la migración de rh-ApoA1 sin lípido. A. rHDL se preparó mediante diálisis con colato usando palmitoil oleoil fosfatidilcolina (POPC) y rh-ApoA1 de tipo silvestre o de 4WF (proporción molar de POPC:apoAI a 100:1) y se desarrolló en geles de poliacrilamida de gradientes no desnaturizante al 4-20 %. La calle 1, patrones de tamaño con diámetros indicados en la parte izquierda; calle 2, 10  $\mu$ g de rHDL de rh-ApoA1 de tipo silvestre; calle 3, 10  $\mu$ g de rHDL de rh-apoA1 de 4WF. Ambas variantes de ApoA1 proporcionaban discos de ~ 9,8, 12, y 17 nm en geles de gradiente no desnaturizante. La migración de la rh-ApoA1 sin lípido se muestra con la flecha en la parte derecha.

La Fig. 10 ilustra un gráfico que muestra la actividad de eflujo de colesterol de preparaciones de rHDL (4 h. de incubación) de células RAW264.7 etiquetadas con [<sup>3</sup>H]colesterol en presencia (barras rellenas) o ausencia (barras abiertas) de inducción de ABCA1 mediante tratamiento previo con 8Br-cAMP 0,3 mM. La rh-ApoA1 (10  $\mu$ g/ml) proporcionaba actividad aceptora de colesterol dependiente de ABCA1; sin embargo, las preparaciones de rHDL de ApoA1 tanto de tipo silvestre (WT) como de 4WF (10  $\mu$ g/m de ApoA1) proporcionarían solamente actividad aceptora de colesterol dependiente de ABCA1. Las barras muestran la media  $\pm$  D.T. (n = 3).

La Fig. 11 ilustra un gráfico que muestra la actividad aceptora de colesterol dependiente de ABCA1 de péptidos sintéticos con sustituciones de triptófano. El péptido precursor p18 (Ac-DWFKAFYDKVAEKFKAEAF-NH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO: 76) se sintetizó con o sin sustitución del resto de triptófano (W) por fenilalanina (p18 WF) o leucina (p18WL). La actividad aceptora de colesterol de los tres péptidos se midió mediante un periodo de incubación de 4 horas con células RAW264.7 etiquetadas con [<sup>3</sup>H]colesterol que se habían tratado previamente con 8Br-cAMP 0,3 mM para inducir ABCA1. La concentración de péptido se muestra en  $\mu$ g/ml en las etiquetas de la columna. Las barras muestran la media + D.T. (n = 3).

## **Descripción Detallada**

La presente invención se refiere a miméticos de polipéptido de apolipoproteína A-1 (ApoA1) que son resistentes a la oxidación cuando se administran a un sujeto y pueden aumentar el eflujo de colesterol celular desde células cargadas con lípido. Por "resistente a la oxidación" o "resistente a oxidante", como se usan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, se hace referencia a que el polipéptido mimético de ApoA1 puede ser al menos

parcialmente resistente a la oxidación que altera o reduce las actividades de aceptación de colesterol por el polipéptido de ApoA1 y de unión a lípido. La oxidación puede estar asociada potencialmente con o causada por, por ejemplo, oxidación a partir de las rutas de oxidación que incluyen al menos uno de mieloperoxidasa (MPO), un oxidante generado por MPO, una especie de cloración reactiva generada por MPO, un sistema MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/CL<sup>-</sup>, un HOCL/OCl<sup>-</sup>, una especie reactiva de nitrógeno generada por MPO, sistema MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, dióxido de nitrógeno, peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), peroxycarboxinitrito (ONOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup>), y el producto formado cuando ONOO<sup>-</sup> actúa en presencia de CO<sub>2</sub> (o HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en tampón).

Se encontró que algunos restos de triptófano de la proteína ApoA1 se oxidan rápidamente con, por ejemplo, mieloperoxidasa (MPO), ácido hipocloroso, o otros oxidantes potenciales. La oxidación de los restos de triptófano de ApoA1 conduce su pérdida de actividades de aceptación de colesterol y de unión a lípido. Además, la oxidación mediada por MPO de ApoA1 nativa del inactivar potencialmente la aceptación de colesterol celular como parte del transporte de colesterol inverso.

Los miméticos resistentes a oxidantes de ApoA1 (o miméticos resistentes a la oxidación) de acuerdo con la presente invención tienen una secuencia de aminoácidos de ApoA1, en la que todos los restos de triptófano están sustituidos con fenilalanina, y para que se conserven las actividades de unión a lípido de ApoA1 y de eflujo.

Por "miméticos de ApoA1" o "miméticos anteriores o ApoA1" o "miméticos conocidos de ApoA1" como se usa en la presente memoria descriptiva, se hace referencia a miméticos de ApoA1 que se pueden identificar o se pueden obtener a partir de cualquier referencia y que tienen comportamiento de ApoA1. Éstos incluyen miméticos de ApoA1 identificada en las patentes y publicaciones de Estados Unidos y extranjeras. Las expresiones "miméticos de ApoA1" o "miméticos anteriores o ApoA1" o "miméticos conocidos de ApoA1" se distinguen de la expresión "miméticos de ApoA1" o "miméticos de ApoA1 novedosos" o "nuevos miméticos de ApoA1" en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, que pretenden incluir los miméticos de ApoA1 de la presente invención que son resistentes a la oxidación o resistentes a oxidantes.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para hacer referencia a un polímero de restos de aminoácido. Los términos se aplican a polímeros de aminoácido en los que uno o más restos de aminoácido son un análogo químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácido de origen natural. "Aminoácido Aromático", como se usa en el presente documento, se refiere a un aminoácido hidrófobo con una cadena lateral que tiene al menos un anillo aromático o heteroaromático. El anillo aromático o heteroaromático puede contener uno o más sustituyentes tales como -OH, -SH, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -NO<sub>2</sub>, -NO, -NH<sub>2</sub>, -NHR, -NRR, -C(O)R, -C(O)OH, -C(O)OR, -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR, -C(O)NRR y similares en los que cada R es independientemente alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) sustituido, alqueno (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alqueno (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) sustituido, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) sustituido, arilo (C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>), arilo (C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>) sustituido, alcarilo (C<sub>6</sub>-C<sub>26</sub>), alcarilo (C<sub>6</sub>-C<sub>26</sub>) sustituido, heteroarilo de 5-20 miembros, heteroarilo de 5-20 miembros sustituido, alheteroarilo de 6-26 miembros o alheteroarilo de 6-26 miembros sustituido. Los aminoácidos aromáticos genéticamente codificados incluyen fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W). En un ejemplo en particular, el aminoácido resistente a oxidación de la presente invención puede ser fenilalanina.

Los miméticos de ApoA1 que son resistentes a la oxidación son superiores para estimular el eflujo de colesterol desde células cargadas con lípido y se pueden usar como agentes terapéuticos para tratar, mejorar, y/o prevenir trastornos vasculares coronarios (por ejemplo, enfermedad cardiovascular), incluyendo tanto placas existentes reductoras como placas de desarrollo de inhibición, aterosclerosis. La presente invención por lo tanto incluye miméticos de Apo A1 que pueden encontrar usan procedimientos para tratar, prevenir, y/o mejorar trastornos vasculares coronarios, en un sujeto mediante la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un mimético de ApoA1 de acuerdo con la presente invención.

De acuerdo con la invención reivindicada, el mimético de ApoA1 tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

DEPPQSPXDR VKDLATVYVD VLKDSGRDYV SQFEGSALGK QLNKLLDNX DSVTSTFSKL  
 REQLGPVTQE FXDNLEKETE GLRQEMSKDL EEVKAKVQPY LDDFQKXQE  
 EMELYRQKVE PLRAELQEGA RQKLHELQEK LSPLGEEMRD RARAHVDALR  
 THLAPYSDEL RQRLAARLEA LKENGARLA EYHAKATEHL STLSEKAKPA LEDLRQGLLP  
 VLESFKVSFL SALEEYTKKL NTQ (SEQ ID NO: 1)

en la que X es cualquiera de un resto de triptófano o un resto resistente a oxidantes (por ejemplo, fenilalanina) y al menos uno de los cuatro X es un resto resistente a oxidantes. En otros ejemplos, al menos dos de los X de SEQ ID NO: 1 son un resto resistente a oxidantes, al menos tres de los X de SEQ ID NO: 1 son restos resistentes a oxidantes, o los cuatro de los X son restos resistentes a oxidantes.

Los miméticos de ApoA1, además de incluir formas de ApoA1 de tipo silvestre o nativas sustituidas con triptófano, también pueden incluir variantes de ApoA1 naturales sustituidas con triptófano que se conocen en la técnica. Por ejemplo, Weisgraber y col., ha mostrado que la cisteína se pueden sustituir por arginina en la posición 173 en una ApoA1 mutante denominada ApoA1-Milano (Weisgraber y col., (1983) J. Biol. Chem. 258: 2508-2513). Por lo tanto,

5

**MKAAVLTAV LFLTGSQARH FXQQDEPPQS PXDRVKDLAT VYVDVLKDSG  
RDYVSQFEGS ALGKQLNLKL LDNXDSVTST FSKLREQLGP VTQEFXDNLE KETEGLRQEM  
SKDLEEVKAK VQPYLDDFQK KXQEEMELYS QKVEPLRAEL QEGARQKLHE  
LQEKLSPLGE EMRDRARAHV DALRTHLAPY SDELQRLAA RLEALKENGG  
ARLAEYHAKA TEHLSTLSEK AKPALEDLRQ GLLPVLESFK VSFLSALEEY TKKLNTQ (SEQ  
ID NO: 2)**

en la que X es un triptófano o un resto resistente a oxidantes (por ejemplo, fenilalanina) y al menos un X está sustituido por un resto resistente a oxidantes.

Otro ejemplo de mimético de ApoA1 de acuerdo con la presente invención se basa en un mimético de longitud completa conocido de péptido de ApoA1 humana que posee un resto de cisteína en la posición 151 de la ApoA1 madura (que corresponde a la posición 175 en la secuencia SEQ ID NO: 3). El mimético de ApoA1 de acuerdo con este ejemplo puede incluir la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

10

**MKAAVLTAV LFLTGSQARH FXQQDEPPQS PXDRVKDLAT VYVDVLKDSG  
RDYVSQFEGS ALGKQLNLKL LDNXDSVTST FSKLREQLGP VTQEFXDNLE KETEGLRQEM  
SKDLEEVKAK VQPYLDDFQK KXQEEMELYS QKVEPLRAEL QEGARQKLHE  
LQEKLSPLGE EMRDCARAHV DALRTHLAPY SDELQCLAA RLEALKENGG  
ARLAEYHAKA TEHLSTLSEK AKPALEDLRQ GLLPVLESFK VSFLSALEEY TKKLNTQ (SEQ  
ID NO: 3);**

en la que X fenilalanina.

Por consiguiente, los miméticos de polipéptido de ApoA1 incluyen polipéptidos modificados de las formas y variantes de ApoA1 que incluyen, por ejemplo, apolipoproteína A-1 (Brewer y col., (1978)), apolipoproteína A-1 Milano (Weisgraber (1983)), apolipoproteína A-1 Marburg, (Utermann y col., (1982) J. Biol. Chem. 257: 501-507), apolipoproteína A-1 Paris (Bielicki y Oda (2002) Biochemistry 41, 2089-2096), proapolipoproteína A-1, o cualquier otra forma mutante de ApoA1 conocida en la técnica ya sea formada por vía sintética o de origen natural.

15

Como alternativa, los miméticos de ApoA1 pueden incluir péptidos helicoidales anfipáticos que imitan muy de cerca a la hélice anfipática de clase A de péptido de ApoA1 humana o de ratón (es decir, miméticos de ApoA1), en los que los restos indicados por X son fenilalanina. La expresión "un péptido helicoidal anfipático" se refiere a un péptido que comprende al menos una hélice anfipática (dominio helicoidal anfipático). Ciertos péptidos helicoidales anfipáticos de la presente invención pueden comprender dos o más (por ejemplo, 3, 4, 5, etc.) hélices anfipáticas.

20

La expresión "hélice anfipática de clase A" se refiere a una estructura de proteína que forma una hélice a que produce una segregación de caras polar y no polar con los restos con carga positiva permaneciendo en la superficie de contacto polar-no polar y los restos con carga negativa permaneciendo en el centro de la cara polar (véase, por ejemplo, Segrest y col., (1990) Proteins: Structure, Function, and Genetics 8: 103-117). Los péptidos particularmente preferentes pueden incluir una identidad de secuencia de aminoácidos superior a aproximadamente un 50 % con el polipéptido codificado por el exón que codifica una hélice anfipática de clase A de ApoA1 humana o de ratón. El péptido se puede combinar con un excipiente farmacológicamente aceptable (por ejemplo, un excipiente adecuado para su administración oral a un mamífero).

25

30

Un mimético de ApoA1 puede ser un fragmento o mimético de ApoA1, que es capaz de estimular el eflujo de colesterol, y comprende una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos:

**D-X-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO: 4),  
D-X-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO: 5),  
D-X-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F- (SEQ ID NO: 6),  
D-X-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F- (SEQ ID NO: 7),  
D-X-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO: 8),**

35

- 5 D-X-L-K-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO: 9),  
D-X-F-K-A-F-Y-D-K-F-F-E K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO: 10),  
D-X-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F- (SEQ ID NO: 11),  
D-X-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F- (SEQ ID NO: 12),  
D-X-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F- (SEQ ID NO: 13),  
D-X-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO: 14),  
D-X-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO: 15),  
E-X-L-K-L-F-Y-E-K-V-L-E-K-F-K-E-A-F- (SEQ ID NO: 16),  
E-X-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F- (SEQ ID NO: 17),  
10 E-X-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F- (SEQ ID NO: 18),  
E-X-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F- (SEQ ID NO: 19),  
E-X-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F- (SEQ ID NO: 20),  
E-X-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO: 21),  
E-X-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO: 22),  
15 D-X-L-K-A-L-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-L- (SEQ ID NO: 23),  
D-X-F-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F- (SEQ ID NO: 24),  
D-X-F-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO: 25),  
E-X-L-K-A-L-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-L- (SEQ ID NO: 26),  
E-X-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO: 27),  
20 E-X-F-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F- (SEQ ID NO: 28),  
E-X-L-K-A-F-Y-E-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO: 29),  
E-X-L-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO: 30),  
E-X-F-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO: 31),  
D-F-L-K-A-X-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-X- (SEQ ID NO: 32),  
25 E-F-L-K-A-X-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-X- (SEQ ID NO: 33),  
D-F-X-K-A-X-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-X-X- (SEQ ID NO: 34),  
E-F-X-K-A-X-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-X-X- (SEQ ID NO: 35),  
D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-X-A-K-E-A-F- (SEQ ID NO: 36),  
D-K-X-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L- (SEQ ID NO: 37),  
30 E-K-L-K-A-F-Y-E-K-V-F-E-X-A-K-E-A-F- (SEQ ID NO: 38),  
E-K-X-K-A-V-Y-E-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L- (SEQ ID NO: 39),  
D-X-L-K-A-F-V-D-K-F-A-E-K-F-K-E-A-Y- (SEQ ID NO: 40),  
E-K-X-K-A-V-Y-E-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L- (SEQ ID NO: 41),  
  
35 D-X-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F- (SEQ ID NO: 42),  
E-X-L-K-A-F-V-Y-E-K-V-F-K-L-K-E-F-F- (SEQ ID NO: 43),  
D-X-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO: 44),  
E-X-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO: 45),  
D-X-L-K-A-F-Y-D-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO: 46),  
E-X-L-K-A-F-Y-E-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO: 47),  
40 D-X-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO: 48),  
E-X-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO: 49),  
D-X-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F- (SEQ ID NO: 50),  
E-X-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F- (SEQ ID NO: 51),  
D-X-L-K-A-F-Y-D-R-V-A-E-R-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO: 52),  
45 E-X-L-K-A-F-Y-E-R-V-A-E-R-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO: 53),  
D-X-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F- (SEQ ID NO: 54),  
E-X-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F- (SEQ ID NO: 55),  
D-X-L-R-A-F-Y-D-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO: 56),  
X-L-R-A-F-Y-E-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO: 57),  
50 D-X-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-R-E-A-F- (SEQ ID NO: 58),  
E-X-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-R-E-A-F- (SEQ ID NO: 59),  
D-X-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO: 60),  
E-X-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO: 61),  
D-X-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-P-D-X-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F (SEQ ID NO: 62),  
55 D-X-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-P-D-X-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F (SEQ ID NO: 63),  
D-X-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-P-D-X-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F (SEQ ID NO: 64),  
D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-X-A-K-E-A-F-P-D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-X-L-K-E-A-F (SEQ ID NO: 65),  
D-K-X-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L-P-D-K-X-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L (SEQ ID NO: 66),  
D-X-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-P-D-X-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F (SEQ ID NO: 67),  
60 D-X-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F-P-D-X-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F (SEQ ID NO: 68), y  
D-X-L-K-A-F-Y-D-K-F-A-E-K-F-K-E-F-F-P-D-X-L-K-A-F-Y-D-K-F-A-E-K-F-K-E-F-F (SEQ ID NO: 69);

en las que X es fenilalanina.

Las secuencias mencionadas anteriormente (SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 69) se describen en el documento de patente de Estados Unidos n.º 7.144.862 B2 de Fogelman y col., (en lo sucesivo en el presente documento, la patente '862). La patente '862 se refiere a péptidos usados para mejorar uno o más síntomas de aterosclerosis. Los péptidos que se describen en la patente '862 incluyen un resto de triptófano en cada resto designado en el presente documento con una X. Los péptidos sintéticos de la patente '862 se diseñaron para imitar al motivo helicoidal anfipático de clase A (Segrest y col., (1990) Proteins: Structure, Function and Genetics 8: 103-117)) y son capaces de asociarse con fosfolípidos y presentan muchas propiedades biológicas similares a las de la ApoA1 humana.

También se indica que esta lista de péptidos miméticos de ApoA1 no es totalmente inclusiva. Los truncamientos de las secuencias mencionadas anteriormente, combinaciones multiméricas (por ejemplo, que varían de dímeros a trímeros, tetrámeros, 5 mers, 8 mers, o 10 mers) de las secuencias mencionadas anteriormente, sustituciones conservativas de las secuencias mencionadas anteriormente, y/o las secuencias mencionadas anteriormente que comprenden análogos de aminoácido también se contemplan usando las enseñanzas proporcionadas en las mismas.

Se observará que los equivalentes biológicamente funcionales, o incluso mejoras, de los polipéptidos miméticos de ApoA1, se pueden preparar, por lo general usando ApoA1 como un punto de partida. En la estructura se pueden realizar modificaciones y cambios de una proteína de este tipo y además obtener una molécula con características similares o de otro modo deseables. Por ejemplo, ciertos aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos en la estructura de la proteína sin pérdida apreciable de actividad aceptora de eflujo de colesterol.

También se debería contemplar que un experto en la materia puede modificar adicionalmente las secuencias de aminoácidos de ApoA1 de la presente invención mediante sustitución, delección o adición de al menos un aminoácido, y que estas modificaciones adicionales crean equivalentes biológicamente funcionales para los polipéptidos de ApoA1 resistentes a oxidantes. Estas sustituciones no inhiben de forma sustancial la capacidad de la ApoA1 modificada para estimular el eflujo de colesterol a partir de células de lípido cargadas. Como se usa en el presente documento, "inhibir sustancialmente" o "inhibición" incluye cualquier reducción reproducible mensurable en la capacidad de un polipéptido de ApoA1 modificado para estimular el eflujo de colesterol, a partir de células de lípido cargadas.

El experto en la materia también entiende bien que, inherente en la definición de una proteína o polipéptido "equivalente biológicamente funcional", está el concepto de que hay un límite para el número de cambios que se pueden realizar dentro de una parte definida de la molécula y aún dar como resultado una molécula con un nivel aceptable de actividad biológica equivalente. Las proteínas y péptidos equivalentes biológicamente funcionales se definen por lo tanto en el presente documento como las proteínas y péptidos en los que ciertos, no la mayoría ni todos, de los aminoácidos se pueden sustituir. Por supuesto, una pluralidad de distintas proteínas/péptidos con diferentes sustituciones se puede preparar fácilmente y usar de acuerdo con la invención.

Las sustituciones de aminoácido por lo general se basan en la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral de aminoácido, por ejemplo, y hidrofobia, hidrofilia, carga, tamaño, y similares. Un análisis del tamaño, forma y tipo de los sustituyentes de la cadena lateral del aminoácido revela que arginina, lisina y histidina son todos restos con carga positiva; que alanina, glicina y serina son todos de un tamaño similar. Por lo tanto, basándose en estas consideraciones, arginina, lisina e histidina; alanina, glicina y serina se definen en el presente documento como equivalentes biológicamente funcionales.

Siguiendo los procedimientos indicados en la solicitud publicada por Alton y col., (documento WO83/04053), se pueden diseñar y fabricar fácilmente genes que codifican expresión microbiana de polipéptidos que tienen conformaciones primarias que se diferencian de los que en el presente documento se especifican en términos de la identidad o ubicación de uno o más restos (por ejemplo, sustituciones, adiciones y delecciones terminales e intermedias). Como alternativa, las modificaciones de ADNc y genes genómicos se pueden conseguir fácilmente mediante técnicas de mutagénesis dirigida al sitio bien conocidas y usar para generar análogos y derivados de ApoA1. Tales productos podrían compartir al menos una de las propiedades biológicas de la ApoA1 modificada resistente a oxidantes pero se podrían diferenciar en otras.

Los polipéptidos miméticos de ApoA1 pueden ser fragmentos de péptidos de ApoA1 humana de longitud completa. La ApoA1 que se describe en el presente documento son equivalentes biológicamente funcionales con respecto a los polipéptidos de ApoA1 descritos anteriormente en al menos un aspecto que incluye, pero no se limita a, la presentación eflujo de colesterol y mejora de uno o más síntomas de una afección inflamatoria. Los fragmentos de ApoA1 pueden consistir en aproximadamente 5 a aproximadamente 50 aminoácidos e incluyen al menos un resto de triptófano, en los que el resto de triptófano está sustituido con un aminoácido resistente a oxidantes.

Se observará que al igual que con el polipéptido mimético de ApoA1, se pueden realizar modificaciones y cambios en la estructura y secuencia de amino de los fragmentos de ApoA1 y además obtener una molécula que tiene características similares o de otro modo deseables. Por ejemplo, ciertos aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos en una estructura de proteínas sin pérdida apreciable de la presentación de eflujo de colesterol.



Los polipéptidos miméticos de ApoA1 de la presente invención también pueden incluir un grupo protector acoplado al extremo amino terminal y/o the carboxilo terminal de los polipéptidos. La expresión "grupo protector" se refiere a un grupo químico que, cuando se une a un grupo funcional en un aminoácido (por ejemplo, una cadena lateral, grupo alfa amino, un grupo alfa carboxilo, etc.) bloquea o enmascara las propiedades de ese grupo funcional. Los ejemplos de grupos protectores de amino terminal incluyen, pero no se limitan a grupos acetilo, o amino. En una realización de este tipo, el primero a cuatro restos de aminoácidos en el extremo N-terminal y/o C-terminal de los polipéptidos descritos en el presente documento pueden estar sustituidos con uno o más restos de aminoácido, o uno o más segmentos de péptido, que se conocen por transmitir estabilidad a regiones de la estructura secundaria  $\alpha$ -helicoidal (restos o segmentos de "protección terminal" o "grupos protectores"). Tales restos y segmentos de protección terminal se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Richardson y Richardson, 1988, Science 240: 1648-1652; Harper y col., 1993, Biochemistry 32 (30): 7605-7609; Dasgupta y Bell, 1993, Int. J. Peptide Protein Res. 41: 499-511; Seale y col., 1994, Protein Science 3: 1741-1745; Doig y col., 1994, Biochemistry 33: 3396-3403; Zhou y col., 1994, Proteins 18: 1-7; Doig y Baldwin, 1995, Protein Science 4: 1325-1336; Odaert y col., 1995, Biochemistry 34: 12820-12829; Petrukhov y col., 1996, Biochemistry 35: 387-397; Doig y col., 1997, Protein Science 6: 147-155). Como alternativa, el primero de uno a cuatro restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de los polipéptidos descritos en el presente documento se pueden sustituir con restos peptidomiméticos que imitan la estructura y/o propiedades de restos o segmentos de protección terminal. Los ejemplos de miméticos de protección terminal se conocen bien en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Richardson y Richardson, 1988, Science 240: 1648-1652; Harper y col., 1993, Biochemistry 32 (30): 7605-7609; Dasgupta and Bell, 1993, Int. J. Peptide Protein Res. 41: 499-511; Seale y col., 1994, Protein Science 3: 1741-1745; Doig y col., 1994, Biochemistry 33: 3396-3403; Zhou y col., 1994, Proteins 18: 1-7; Doig y Baldwin, 1995, Protein Science 4: 1325-1336; Odaert y col., 1995, Biochemistry 34: 12820-12829; Petrukhov y col., 1996, Biochemistry 35: 387-397; Doig y col., 1997, Protein Science 6: 147-155).

Los polipéptidos miméticos de ApoA1 de la presente invención se pueden purificar y aislar. La expresión "unificado y aislado" en el presente documento significa sustancialmente libre de sustancias no deseadas de modo que los polipéptidos presentes de miméticos de ApoA1 modificada son útiles para estimular el eflujo de colesterol desde células cargadas con lípido. Por ejemplo, se puede tener un polipéptido mimético de ApoA1 humana recombinante modificada sustancialmente libre de otras proteínas humanas o agentes patológicos. Los polipéptidos también se caracterizan por ser un producto de células de mamífero, o el producto de procedimientos de síntesis química o de expresión de hospedador procarionota o eucariota (por ejemplo, mediante células bacterianas, de levadura, de plantas superiores, insecto y de mamífero en cultivo) de secuencias de ADN exógeno obtenidas mediante clonación genómica o de ADNc o mediante síntesis genética. Los productos de expresión en células hospedadoras de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*) o procarionotas (por ejemplo, *E. coli*) habituales están libres de asociación con cualquier proteína de mamífero. Los productos de expresión en vertebrados (por ejemplo, células de mamífero no humano (por ejemplo, COS o CHO) y aviar) están libres de asociación con cualquier proteína humana. Dependiendo del hospedador empleado, y otros factores, los polipéptidos de la invención se pueden glicosilar con carbohidratos de mamífero u otros carbohidratos de eucariota o pueden no estar glicosilados. Los polipéptidos de la invención también pueden incluir un resto de aminoácido metionina inicial (en la posición -1 con respecto al primer resto de aminoácido del polipéptido).

Los péptidos de la invención se pueden purificar mediante técnicas conocidas en la técnica tales como cromatografía de fase inversa cromatografía líquida de alto rendimiento, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, cromatografía por afinidad y similares. Las condiciones reales usadas para purificar un péptido en particular dependerán, en parte, de la estrategia de síntesis y de factores, tales como la carga neta, hidrofobia, hidrofilia, etc., y sean evidentes para las personas con experiencia en la materia. Los péptidos ramificados multiméricos se pueden purificar, por ejemplo, mediante cromatografía de intercambio iónico o de exclusión por tamaño.

Para la purificación mediante cromatografía por afinidad, se puede usar cualquier anticuerpo que se una de forma específica al péptido. Para la producción de anticuerpos, diversos animales hospedadoras, que incluyen, pero no se limitan a conejos, ratones, ratas, etc., se pueden inmunizar mediante inyección con un péptido. El péptido se puede unir a un vehículo adecuado, tal como BSA, por medio de un grupo funcional de cadena lateral o conectores unidos a un grupo funcional de cadena lateral. Se pueden usar diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie hospedadora, incluyendo, pero sin limitación, Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias de superficie activa tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa californiana, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilos de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

Los anticuerpos monoclonales para un péptido se pueden preparar usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Estas incluyen, pero no se limitará, la técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein, 1975, Nature 256: 495-497, o Kaprowski, documento de Pat. de Estados Unidos n.º 4.376.110, la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Kosbor y col., 1983, Immunology Today 4: 72; Cote y col., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 2026-2030); y la técnica de hibridoma de EBV (Cole y col., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)). Además, se pueden usar algunas técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison y col., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 6851-6855; Neuberger y col., 1984, Nature 312: 604-608; Takeda y col., 1985, Nature 314: 452-454, Boss, documento de Pat. de Estados Unidos n.º 4.816.397;

Cabilly, documento de Pat. de Estados Unidos n.º 4.816.567; mediante corte y empalme de los genes de una molécula de anticuerpos de ratón de especificidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. O se pueden preparar anticuerpos "humanizados" (véase, por ejemplo, Queen, documento de Pat. de Estados Unidos n.º 5.585.089p. Como alternativa, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de una sola cadena (documento de Pat. de Estados Unidos n.º 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos de una sola cadena específicos de péptido.

Los fragmentos de anticuerpo que contienen deleciones de sitios de unión específicos se pueden generar mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos de  $F(ab')_2$ , que se pueden producir mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y fragmentos de Fab, que se pueden generar por reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos de  $F(ab')_2$ . Como alternativa, se pueden construir bibliotecas de expresión de Fab (Huse y col., 1989, Science 246: 1275-1281) para permitir una identificación rápida y fácil de fragmentos de Fab monoclonales con la especificidad deseada hacia el péptido de interés.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico para el péptido deseado se puede unir, por ejemplo, a agarosa, y el complejo de anticuerpo-agarosa se usa en inmunocromatografía para purificar los péptidos de la invención. Véase, Scopes, 1984, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag New York, Inc., NY, Livingstone, 1974, Methods In Enzymology: Immunoaffinity Chromatography of Proteins 34: 723-731.

Para fines ilustrativos, los polipéptidos de mimético de ApoA1 de la presente invención pueden incluir una etiqueta de polihistidina. Una etiqueta de polihistidina es un motivo de aminoácidos de proteínas que consiste en al menos seis restos de histidina (*His*), a menudo en el extremo N- o C-terminal de la proteína. También se conoce como etiqueta de hexa histidina, etiqueta de 6xHis, y con el nombre de marca registrada His-tag® (EMD Biosciences). Las etiquetas de polihistidina se pueden usar para purificación por afinidad de proteínas recombinantes etiquetadas con polihistidina que se expresan en *Escherichia coli* u otros sistemas de expresión procarionta. Las células bacterianas se cosechan por centrifugación y el sedimento celular resultante se puede lisar mediante medios físicos o con detergentes o enzimas, tales como lisozima. En este estadio, el lisado sin procesar contiene la proteína recombinante entre otras varias proteínas obtenidas a partir de las bacterias y se incuban con medios de actividad tales como NTA-agarosa, resina de HisPur o resina Talon. Estos medios de afinidad contienen iones metálicos unidos, ya sea níquel o cobalto a los que la etiqueta de polihistidina se une con afinidad micromolar. A continuación, la resina se daba con tampón de fosfato para retirar proteínas que no interactúan de forma específica con el ión de cobalto o níquel. La eficacia del lavado se puede mejorar mediante la adición de imidazol 20 mM y a continuación, las proteínas normalmente se eluyen con imidazol 150-300 mM, pero también se usan concentraciones más elevadas. La pobreza y la cantidad de proteína se pueden evaluar mediante SDS-PAGE y transferencia de Western.

La purificación por afinidad usando una etiqueta de polihistidina normalmente da como resultado una proteína relativamente pura cuando la proteína recombinante se expresa en un organismo hospedador procarionta. En casos especiales o para fines especiales tales como la purificación de complejos de proteína para estudiar interacciones de polipéptido de ApoA1 modificada, la purificación a partir de organismos superiores tales como levadura, células de insecto u otros eucariotas puede requerir una purificación por afinidad en tándem usando dos etiquetas para producir una pureza más elevada. Como alternativa, la purificación de una sola etapa usando iones de cobalto inmovilizados en lugar de iones de níquel por lo general proporciona un aumento sustancial de la pureza y requiere concentraciones de imidazol más bajas para la elución de la proteína etiquetada con his.

Para fines ilustrativos adicionales, se pueden concebir ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos miméticos de ApoA1 modificada como se ha definido anteriormente. Los ácidos nucleicos pueden ser un ácido desoxirribonucleico (ADN) o un ácido ribonucleico (ARN). Entre los ADN, se puede usar un ADN complementario de ApoA1 (ADNc) (por ejemplo, Breslow y col., (1982) Proc. Nat. Acad. Sci. 79: 6861-6865, quienes aislaron y caracterizaron clones de ADNc para ApoA1 humana), un ADN genómico (ADNg), una secuencia híbrida o una secuencia sintética o semisintética. Además, el ácido nucleico puede ser uno que este modificado químicamente, por ejemplo con el fin de aumentar su resistencia a nucleasas, su penetración celular o dirección celular, su eficacia terapéutica, y similares. Estos ácidos nucleicos pueden ser de origen humano, animal, vegetal, bacteriano, viral, sintético y similares. Se pueden obtener mediante cualquier técnica conocida por una persona experta en la materia, y en particular mediante la identificación sistemática de bibliotecas, mediante síntesis química o como alternativa mediante procedimientos mixtos que incluyen modificación química o enzimática de secuencias obtenidas con la identificación sistemática de bibliotecas.

Las secuencias de ácidos nucleicos pueden ser útiles para facilitar la expresión en células hospedadoras procariontas o eucariotas de polipéptidos o proteínas que comprenden al menos una parte del mimético de ApoA1. Para la producción de miméticos de ApoA1 recombinante de acuerdo con la invención, los ácidos nucleicos se pueden incorporar en un vector viral o plásmido, que pueden se pueden replicar de forma autónoma o con vector integrante. Este vector a continuación se usa para transfectar o infectar una población de células elegidas. Las células transfectadas o infectadas obtenidas de ese modo a continuación se cultivan en condiciones que permiten la expresión del ácido nucleico, y el mimético de ApoA1 recombinante de acuerdo con la invención se aísla. Las células hospedadoras que se pueden usar para la producción de las variantes de la invención con medios recombinantes son cualquiera de hospedadores eucariotas o procariontas. Los ejemplos de hospedadores eucariotas incluyen células animales, levaduras, u hongos. En particular, con respecto a las levaduras, se pueden usar levaduras del

género *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces* o *Hansenula*. Con respecto a células animales, se pueden usar células COS, CHO, CI27, NIH-3T3, y similares. Entre los hongos, se pueden usar *Aspergillus ssp.* o *Trichoderma ssp.* Con respecto a los hospedadores procariotas, por ejemplo, se pueden usar las siguientes bacterias: *E. coli*, *Bacillus* o *Streptomyces*. La variante aislada de este modo a continuación se puede empaquetar con una visión con respecto a su uso terapéutico.

Por lo tanto, se pueden proporcionar ácidos nucleicos que codifica polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos modificada de miméticos de ApoA1 o fragmentos de los mismos que es capaz de estimular el eflujo de colesterol desde células cargadas con lípido. La secuencia de aminoácidos se modifica mediante sustitución de todos los triptófanos de la secuencia de aminoácidos por fenilalanina.

Si el péptido está formado totalmente por aminoácidos codificados por genes, o una parte del mismo está formada de este modo, el polipéptido o la parte pertinente también se puede sintetizar usando técnicas convencionales de ingeniería genética recombinante. Para producción recombinante, una secuencia de polinucleótidos que codifica el péptido se inserta en un vehículo de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia de codificación insertada, o en el caso de un vector viral de ARN, los elementos necesarios para su replicación y traducción. El vehículo de expresión a continuación se transfecta en una célula diana adecuada, que expresará el péptido. Dependiendo del sistema de expresión usado, el Péptido expresado se aísla a continuación con procedimientos bien establecidos en la técnica. Los procedimientos para producción de proteína y péptido recombinantes se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook y col., 1989, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.; y Ausubel y col., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.)

Para aumentar la eficacia de la producción, el polinucleótido se puede diseñar para codificar múltiples unidades del péptido separadas por sitios de escisión enzimática – cualquiera de homopolímeros (unidades repetidas de péptidos) o heteropolímeros (diferentes péptidos encadenados en conjunto) se pueden diseñar de este modo. El polipéptido resultante se puede escindir (por ejemplo, por tratamiento con la enzima apropiada) para recuperar las unidades peptídicas. Esto puede aumentar el rendimiento de los péptidos conducidos por un único promotor. En un ejemplo, una polinucleótido policistrónico se puede diseñar de modo que se transcribe un único ARNm, que codifica múltiples péptidos (es decir, homopolímeros o heteropolímeros) con cada región codificante unida de forma operativa a una secuencia de control de traducción independiente de protección; por ejemplo, un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES). Cuando se usa en sistemas de expresión viral apropiados, la traducción de cada péptido codificado por el ARNm se dirige internamente en la transcripción; por ejemplo, por el IRES. Por lo tanto, la construcción policistrónica dirige la transcripción de un solo ARNm policistrónico grande que, a su vez, dirige la traducción de múltiples péptidos individuales. Este enfoque elimina la producción y el procesamiento enzimático de poliproteínas y puede aumentar de forma significativa el rendimiento del péptido conducido por un solo promotor.

Una diversidad de sistemas de hospedador-vector de expresión se puede usar para expresar los péptidos que se describen en el presente documento. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante o de ADN de plásmido que contienen una secuencia codificante apropiada; levadura u hongos filamentosos transformados con vectores de expresión de levadura u hongos recombinantes que contienen una secuencia codificante apropiada; inspeccionar los sistemas de células infectadas con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, baculovirus) que contienen una secuencia codificante apropiada; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor o virus del mosaico del tabaco) o transformadas con vectores de expresión de plásmido recombinante (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen una secuencia codificante apropiada; o sistemas de células animales.

Los elementos de expresión de los sistemas de expresión varían en su fuerza y especificidades. Dependiendo del sistema de hospedador/vector usado, cualquiera de un número de elementos de transcripción y traducción, incluyendo promotores constitutivos e inducibles, se puede usar en el vector de expresión. Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos, se pueden usar promotores inducibles, tales como pL de bacteriófago  $\lambda$ , plac, ptrp, ptac (promotor híbrido ptrp-lac) y similares; cuando se clona en sistemas de células de insectos, se pueden usar promotores tales como el promotor de poliedro de baculovirus; cuando se clona en sistemas de células vegetales, se pueden usar promotores obtenidos a partir del genoma de células vegetales (por ejemplo, promotores de choque térmico; el promotor para la subunidad pequeña de RUBISCO; el promotor para la proteína de unión a clorofila a/b) o de virus de plantas (por ejemplo, el promotor de 35S ARN de CaMV; el promotor de proteína de revestimiento de TMV); cuando se clona en sistemas de células de mamífero, se pueden usar promotores obtenidos a partir del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, promotor metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor de 7,5 K del virus vaccinia); cuando se generan líneas celulares que contienen múltiples copias de producto de expresión, se pueden usar vectores basados en SV40, BPV y EBV con un marcador seleccionable apropiado.

Los oligonucleótidos pueden ser ADN o ARN o mezclas químicas o derivados o versiones modificadas de los mismos, de cadena sencilla o de doble cadena. Tales oligonucleótidos se pueden modificar en el resto de base, resto de azúcar, o estructura principal de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, hibridación, etc. Los oligonucleótidos pueden incluir adicionalmente otros grupos adjuntos, tales como péptidos (por ejemplo,

para dirección de receptores de células hospedadoras *in vivo*), o agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular (véase, por ejemplo, Letsinger y col., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6553-6556; Lemaitre y col., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 648-652; Publicación de PCT n.º WO 88/09810, publicada el 15 de diciembre de 1988), agentes de escisión activados por hibridación. (Véase, por ejemplo, Krol y col. (1988) BioTechniques 6: 958-976) o agentes intercalantes. (Véase, por ejemplo, Zon (1988) Pharm. Res. 5: 539-549). Con este fin, los oligonucleótidos se pueden conjugar con otra molécula, por ejemplo, un péptido, agente de reticulación activado por hibridación, agente de transporte, agente de escisión activado por hibridación, etc.

En células hospedadoras de mamífero, se puede usar un número de sistemas de expresión basados en virus. En los casos en los que se usa un adenovirus como un vector de expresión, una secuencia codificante se puede ligar a un complejo de control de transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico a continuación se puede insertar en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, la región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar el péptido en hospedador es infectados. (Por ejemplo, véase Logan y Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81: 3655-3659). Como alternativa, se puede usar el promotor de 7,5 K de vaccinia, (véase, por ejemplo, Mackett y col., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79: 7415-7419; Mackett y col., 1984, J. Virol. 49: 857-864; Panicali y col., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 4927-4931).

Otros sistemas de expresión para producir los polipéptidos de la invención serán evidentes para los que tengan experiencia en la materia. Las secuencias de ADN descritas en el presente documento, que codifican polipéptidos de ApoA1 modificada son valiosos por la información que proporcionan con respecto a la secuencia de aminoácidos de proteína de mamífero que hasta ahora no he estado disponibles. Dicho de otra manera, las secuencias de ADN pueden ser útiles para generar vectores de ADN de plásmido virales y circulares nuevos y útiles, células hospedadoras procarionta sigue eucariotas transformadas y transfectadas nuevas y útiles (incluyendo células bacterianas y de levadura y células de mamífero desarrolladas en cultivo), y procedimientos nuevos y útiles para el crecimiento en cultivo de tales células hospedadoras capaces de expresión de polipéptidos de ApoA1 resistentes a oxidantes modificados y sus productos relacionados.

Como alternativa, puede no usarse ningún vector para facilitar la presencia relativamente estable en el hospedador. Por ejemplo, la recombinación homóloga puede facilitar la integración en un genoma hospedador. El ácido nucleico se puede colocar dentro de un vehículo farmacéuticamente aceptable para facilitar la absorción celular, tal como un vehículo de solución de lípido (por ejemplo, un lípido cargado), un liposoma, o vehículo de polipéptido (por ejemplo, polilisina). Un artículo de revisión sobre terapia genética es Verma, Scientific American, noviembre de 1990, páginas 68-84.

El ácido nucleico deseado se puede colocar primero dentro de una célula, y la célula se puede administrar a un paciente (tal como un tejido trasplantado) o el ácido nucleico deseado se puede administrar directamente al paciente para su absorción *in vivo*. Las células a transferir al receptor se pueden cultivar usando uno o más factores que afectan al crecimiento o la proliferación de dichas células, como por ejemplo, SCF.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican un conjugado de mimético de ApoA1 resistente a oxidantes modificado, tales como una proteína de fusión, también se pueden usar en la invención. Tales ácidos nucleicos se pueden realizar preparando una construcción (por ejemplo, un vector de expresión) que expresa una proteína fusión de mimético de ApoA1 cuando se introduce en un hospedador adecuado. Por ejemplo, una construcción de este tipo se puede por ligación de un primer polinucleótido que codifica una proteína de mimético de ApoA1 resistente a oxidantes modificada capaz de estimular el eflujo de colesterol desde células cargadas con lípido, fusionada en marco un segundo polinucleótido que codifica otra proteína de modo que la expresión de la construcción en un sistema de expresión adecuado produce una proteína de fusión.

Las proteínas de fusión de mimético de ApoA1 se pueden preparar fácilmente usando técnicas de biología molecular. Cualquier proteína de fusión se puede designar y preparar usando cualquier de los agentes terapéuticos desvelados en el presente documento y los conocidos en la técnica. La tecnología de proteína de fusión se adapta rápidamente para preparar proteínas de fusión en las que las dos partes están unidas mediante una secuencia de péptidos que se pueden escindir de forma selectiva. El uso de técnicas de ADN recombinante para conseguir tales fines es en la actualidad una práctica convencional para los expertos en la materia. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas de síntesis y recombinación *in vivo*/recombinación genética. Además, la síntesis de ADN y ARN se puede realizar usando un sintetizador automatizado.

La preparación de una proteína de fusión de este tipo por lo general implica la preparación de una primera y segunda región codificante de ADN y la ligación o unión funcional de tales regiones, en marco, para preparar una sola región codificante que codifica la proteína de fusión deseada. Por lo general no se cree que sea particularmente relevante cuál es la parte de la construcción que se prepara como la región N-terminal o como la región C-terminal.

La presente invención también se refiere a composiciones y/o formulaciones farmacéuticas y al uso de tales composiciones en el tratamiento de hiperlipidemia, hipercolesterolemia, enfermedad cardíaca coronaria, y aterosclerosis. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir el polipéptido mimético de ApoA1 como el principio activo y un excipiente farmacéuticamente aceptable adecuados para su administración y suministro

*in vivo*. Las composiciones farmacéuticas por lo general comprenderán una cantidad eficaz de polipéptidos de ApoA1 modificada disueltos o dispersos en un vehículo o medio acuoso farmacéuticamente aceptable. También se contemplan agentes terapéuticos combinados, y se puede usar el mismo tipo de composiciones farmacéuticas subyacentes para medicamentos tanto individuales como combinados.

5 Las expresiones "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" hacen referencia a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra de creación no deseada cuando se administran a un animal, o un ser humano, si fuera apropiado. Los usos veterinarios están incluidos del mismo modo dentro de la invención y las formulaciones "farmacéuticamente aceptables" incluyen formulaciones para uso tanto clínico y/o veterinario.

10 Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de disolvente, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias activas farmacéuticas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en la que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. A la administración en seres humanos, las preparaciones deberían satisfacer los patrones de esterilidad, pirogenia, seguridad general y pureza según lo requieran los patrones de FDA Office of Biologics. En las composiciones también se pueden incorporar principios activos suplementarios.

Los ejemplos de vehículos incluyen disolventes y medios de dispersión que contienen, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas de los mismos, y aceites vegetales. En muchos casos, será preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y/o mediante el uso de tensioactivos.

La presente invención contempla la administración de las composiciones farmacéuticas descritas mediante diversas vías. Las composiciones farmacéuticas que comprenden polipéptidos miméticos de ApoA1 o fragmentos de los mismos de la invención se pueden administrar mediante cualquier vía que asegure la biodisponibilidad en la circulación. Estas vías pueden incluir, pero bajo ningún concepto se limitan a administración oral, administración nasal, administración rectal, inyección intraperitoneal, inyección intravascular, inyección subcutánea, administración transcutánea, administración mediante inhalación, e inyección intramuscular.

Las preparaciones inyectables incluyen suspensiones, soluciones o emulsiones estériles del principio activo en vehículos acuosos u oleosos. Las composiciones también pueden contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de múltiples dosis, y pueden contener conservantes añadidos.

Como alternativa, la formación inyectable se puede proporcionar en forma de polvo para su reconstitución con un vehículo, que incluye, pero no se limita a, agua sin pirógenos estéril, tampón, solución de dextrosa, etc., antes de su uso. Con este fin, los polipéptidos miméticos de ApoA1 de la presente invención se pueden liofilizar, o se puede preparar el complejo de péptido-lípido liofilizado. Las preparaciones almacenadas se pueden suministrar en formas de dosificación unitaria y se pueden reconstituir antes de su uso *in vivo*.

Para administración prolongada, al principio activo se puede formular como una preparación de liberación prolongada, para su administración mediante el implante; por ejemplo, inyección subcutánea, intradérmica, o intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, el principio activo se puede formular con materiales poliméricos o hidrófobos (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles; por ejemplo, como una formales al poco soluble de los polipéptidos de ApoA1 modificada o fragmentos de los mismos.

Como alternativa, se pueden usar sistemas de administración transdérmica fabricados como un disco o parche adhesivo que libera lentamente el principio activo para absorción percutánea. Con este fin, se pueden usar potenciadores de la permeación para facilitar la penetración transdérmica del principio activo. Se puede conseguir un beneficio en particular mediante la incorporación de los polipéptidos de ApoA1 modificada o fragmentos de los mismos de la invención o el complejo de péptido-lípido en un parche de nitroglicerina para su uso en pacientes con insuficiencia cardíaca isquémica e hipercolesterolemia.

Para su administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil metilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato cálcico); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); agentes disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de almidón sódico); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato sódico). Los comprimidos se pueden revestir mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para su administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar como un producto seco para la

5 constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulgentes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Si fuera apropiado, las preparaciones también pueden contener sales tampón, agentes saborizantes, colorantes y edulcorantes. Las preparaciones para su administración oral se pueden formular de forma adecuada para dar liberación controlada del compuesto activo.

10 Para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas para chupar formulados de una manera convencional. Para vías de administración rectal y vaginal, el principio activo se puede formular como soluciones (enemas de retención), supositorios o pomadas.

15 Para administración por inhalación, el principio activo se puede administrar de forma conveniente en forma de una presentación de pulverización en aerosol a partir de bases presurizados o un memorizado, con el uso de un agente propulsor, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos por ejemplo de gelatina para su uso en inhalador o insuflador que contienen una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

20 Si se desea, las composiciones se pueden presentar en un envase o dispositivo dispensador, que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el principio activo. El envase puede comprender por ejemplo lámina de metal o de plástico, tal como problemas de tipo blíster. El paquete o dispositivo dispensador puede ir acompañado con instrucciones para su administración.

25 Las formulaciones de "dosificación unitaria" son aquellas que contienen una dosis o subdosis del ingrediente administrado adaptadas para una administración programa en particular. Por ejemplo, las formulaciones de "dosificación unitaria" a modo de ejemplo son aquellas que contienen una dosis o unidad diaria o subdosis diaria o una dosis semanal o unidad o subdosis semanal y similares.

30 En las condiciones habituales de almacenamiento y uso, todas las preparaciones de este tipo deberían contener conservantes para prevenir el crecimiento de microorganismos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede prevenir con diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. La absorción prolongada de las composiciones inyectables estables se puede producir mediante el uso en las composiciones de agentes de retardo de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

35 Antes o después de la formulación, los polipéptidos de ApoA1 modificada se deberían dializar ampliamente para retirar moléculas de peso molecular pequeño no deseadas, y/o liofilizadas para una formulación más fácil en un vehículo deseado, cuando sea apropiado. Las soluciones inyectables estériles se preparan mediante la incorporación de los agentes activos en la cantidad necesaria en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, si se desea, seguido de esterilización mediante filtrado. Por lo general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos a partir de los enumerados anteriormente.

40 En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferentes son las técnicas de secado al vacío y liofilización que proporcionan un polvo del principio activo, más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución filtrada previamente de forma estéril del mismo.

45 Se pueden usar cápsulas farmacéuticas de "liberación lenta" o composiciones o preparaciones de "liberación sostenida" y por lo general se pueden aplicar. Las poblaciones de liberación lenta por lo general se diseñan para dar un nivel de fármaco constante durante un periodo de tiempo prolongado se pueden usar para suministrar los polipéptidos miméticos de ApoA1 de acuerdo con la presente invención.

50 En ciertas realizaciones, se pueden usar liposomas y/o nanopartículas con los polipéptidos miméticos de ApoA1. Por lo general, los expertos en la materia conocen la formación y uso de liposomas, tal como se resume a continuación. Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y de forma espontánea forman vesículas de bicapa concéntricas multilamelares (también denominadas vesículas multilamelares (MLV)). Por lo general, las MLV tienen diámetros de 25 nm a 4 µm. La sonicación de las MLV da como resultado la formación de vesículas unilamelares pequeñas (SUV) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 Å, que contienen una solución acuosa en el núcleo. Los polipéptidos miméticos de ApoA1 también se pueden formular en discos de fosfolípido de 55 un tamaño entre 8 y 20 nm, a través de reacción espontánea con liposomas fosfolípidicos, o a través del procedimiento de diálisis de colato.

Las nanocápsulas por lo general pueden atrapar compuestos de una manera estable y reproducible. Para evitar los efectos secundarios debidos a sobrecarga polimérica intracelular, tales partículas ultra finas (con un tamaño de aproximadamente 0:1 µm) se deberían diseñar usando polímeros capaces de ser degradados *in vivo*. Las nanopartículas de cianoacrilato de polialquilo biodegradables que satisface estos requisitos se contemplan para su uso en la presente invención, y tales partículas se pueden preparar fácilmente.

Los agentes farmacológicamente activos adicionales se pueden suministrar junto con los agentes activos primarios, por ejemplo, los péptidos de la presente invención. Las terapias pueden incluir, pero no se limitan a, administración simultánea o secuencial de los fármacos implicados. En una realización, tales agentes incluyen, pero no se limitan a agentes que reducen el riesgo de sucesos ateroscleróticos y/o complicaciones de los mismos. Tales agentes incluyen, pero no se limitan a, beta bloqueantes, combinaciones de beta bloqueantes y diuréticos de tiazida, estatinas, aspirina, inhibidores de ace, inhibidores de receptor de ace (ARB), y similares.

Los ejemplos de beta bloqueantes incluyen, pero no se limitan a cardioselectivos (bloqueantes beta 1 selectivos), por ejemplo, acebutolol (Sectral), atenolol (Tenormin), betaxolol (Kerlone), bisoprolol (Zebeta), metoprolol (Lopressor), y similares. Los ejemplos de bloqueantes no selectivos (beta 1 y beta 2 bloqueantes igualmente) incluyen, pero no se limitan a carteolol (Cartrol), nadolol (Corgard), penbutolol (Levatol), pindolol (Visken), propranolol (Inderal), timolol (Blockadren), labetalol (Normodyne, Trandate), y similares.

Los ejemplos de combinaciones de beta bloqueante y diurético de tiazida incluyen, pero no se limitan a Lopressor HCT, ZIAC, Tenoretic, Corzide, Timolide, Inderal LA 40/25, Inderide, Normozide, y similares.

Los ejemplos de estatinas incluyen, pero no se limitan a pravastatina (Pravachol/Bristol-Myers Squibb), simvastatina (Zocor/Merck), lovastatina (Mevacor/Merck), Lipitor (Pfizer), y similares.

Los ejemplos de inhibidores de ace incluyen, pero no se limitan a captopril (por ejemplo, Capoten de Squibb), benazepril (por ejemplo, Lotensin de Novartis), enalapril (por ejemplo, Vasotec de Merck), fosinopril (por ejemplo, Monopril de Bristol-Myers), lisinopril (por ejemplo, Prinivil de Merck o Zestril de Astra-Zeneca), quinapril (por ejemplo, Accupril de Parke-Davis), ramipril (por ejemplo, Altace de Hoechst Marion Roussel, King Pharmaceuticals), imidapril, perindopril erbumina (por ejemplo, Aceon de Rhone-Polenc Rorer), trandolapril (por ejemplo, Mavik de Knoll Pharmaceutical), y similares. Los ARBS adecuados (Bloqueantes de Receptor de Ace) incluyen, pero no se limitan a, losartán (por ejemplo, Cozaar de Merck), irbesartán (por ejemplo, Avapro de Sanofi), candesartán (por ejemplo, Atacand de Astra Merck), valsartán (por ejemplo, Diovan de Novartis), y similares.

Los miméticos de la invención se pueden usar en un procedimiento para tratar trastornos cardiovasculares. "Trastorno cardiovascular", como se usa en el presente documento, se refiere a la clase de trastornos que implican al corazón o a los vasos sanguíneos (arterias y venas). Además "trastorno cardiovascular" se refiere adicionalmente a cualquier enfermedad que afecte al sistema cardiovascular, se puede usar para hacer referencia a los relacionados con aterosclerosis (enfermedad arterial). Los trastornos cardiovasculares pueden incluir, pero no se limitan a, Aneurismas, Angina, Arritmia, Aterosclerosis, Cardiomiopatía, Enfermedad Cerebrovascular, Enfermedad Cardíaca Congénita, Insuficiencia Cardíaca Congestiva, Miocarditis, Enfermedad de las Válvulas, Enfermedad Arterial Coronaria, Cardiomiopatía dilatada, Disfunción Diastólica, Endocarditis, Presión Arterial Elevada (Hipertensión), Cardiomiopatía Hipertrófica, Prolapso de la válvula mitral, Ataque al Corazón, Estenosis Vasculare y Tromboembolismo Venoso.

"Arteriosclerosis", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier endurecimiento (y pérdida de elasticidad) de arterias medianas o grandes (en griego, "Arterio" significa arteria y "esclerosis" significa endurecimiento), arteriolosclerosis es la aterosclerosis que afecta principalmente a las arteriolas (arterias pequeñas). "Aterosclerosis", como se usa en el presente documento, se refiere a un endurecimiento de una arteria debido específicamente a una placa de ateroma. Por lo tanto, la aterosclerosis es una forma de arteriosclerosis. La aterosclerosis es una respuesta inflamatoria crónica en las paredes de las arterias, debida en gran parte a la deposición de lipoproteínas (proteínas en plasma que portan colesterol y triglicéridos). Normalmente se denomina "endurecimiento" o "incrustaciones" de las arterias. Está causada por la formación de múltiples placas dentro de las arterias.

El procedimiento puede incluir la etapa de administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz o biológicamente eficaz de una composición farmacéutica que incluye un mimético de ApoA1 o fragmento del mismo que es capaz de estimular el eflujo de colesterol desde células cargadas con lípido. El mimético de ApoA1 o un fragmento de secuencia de aminoácidos se puede modificar como se ha descrito anteriormente por sustitución de todos los triptófanos con fenilalanina.

Por lo tanto, "cantidades biológicamente eficaz" o "cantidades terapéuticamente eficaces", en términos de cada uno de los procedimientos terapéuticos mencionados anteriormente son cantidades de el al menos un polipéptido de ApoA1 modificada o un fragmento del mismo eficaz para ejercer un efecto antiinflamatorio, aumento del eflujo de colesterol celular, o mejora de síntomas de enfermedad cardiovascular.

"Administración", como se usa en el presente documento, significa provisión o administración de una composición que incluye al menos un polipéptido mimético de ApoA1 o un fragmento del mismo en una cantidad(s) y durante un

periodo de tiempo(s) eficaz para ejercer un efecto antiinflamatorio, aumento del eflujo de colesterol celular, o mejora de síntomas de enfermedad cardiovascular. Por lo general, es preferente la administración pasiva de agentes terapéuticos proteicos, en parte, por su simplicidad y reproducibilidad.

5 Debido a las propiedades de los polipéptidos resistentes a la oxidación de la presente invención, los polipéptidos miméticos de ApoA1 y fragmentos de los mismos descritos en el presente documento también se pueden usar en un procedimiento para estimular el eflujo de colesterol desde una célula al hígado. El procedimiento incluye la etapa de administrar a la célula una cantidad biológicamente eficaz de polipéptido purificado que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a una parte de la SEQ ID NO: 1, en la que X es fenilalanina.

10 Los procedimientos y usos terapéuticos de la invención también se extienden a la provisión de ácidos nucleicos que codifican al menos un agente terapéutico que incluye polipéptido(s) mimético de ApoA1 de una manera eficaz para dar como resultado su expresión en las cercanías del síntoma, afección o enfermedad dirigidos. Se puede usar cualquier técnica de terapia genética, tal como administración de ADN desnudo, genes y lectores recombinantes, administración basada en células, incluyendo manipulación *ex vivo* de células de pacientes, y similares.

15 También se entenderá que incluso en tales circunstancias en las que la dosis, o terapia combinada de polipéptidos de ApoA1 están en el extremo inferior del intervalo terapéutico pretendido, puede suceder que esta terapia todavía sea igualmente o incluso más eficaz que todas las otras terapias conocidas en el contexto del trastorno o paciente en particular. Desafortunadamente, es evidente para un profesional clínico que ciertos trastornos y afecciones no se pueden tratar de forma eficaz en un plazo intermedio o largo, pero esto no invalida la utilidad de la presente terapia, en particular cuando es al menos aproximadamente tan eficaz como las otras estrategias propuestas por lo general.

20 Por lo general, la intención de los regímenes terapéuticos de la presente invención es producir un aumento significativo del eflujo de colesterol, a la vez que la dosis aún se mantiene por debajo de los niveles asociados con una toxicidad inaceptable. Además de variar la dosis por sí misma, el régimen de administración también se puede adaptar para optimizar la estrategia de tratamiento.

25 Los agentes activos de la presente invención también son útiles en un número de contextos. Por ejemplo, se ha observado en los trastornos cardiovasculares (por ejemplo, aterosclerosis, apoplejía, etc.) Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la presente invención contempla la administración de uno o más de los agentes activos descritos en el presente documento a un sujeto con riesgo de, o contraer un síntoma de aterosclerosis y/o una patología asociada (por ejemplo, apoplejía).

30 Por lo tanto, por ejemplo, a una persona que tiene o que presenta riesgo de enfermedad coronaria se le pueden administrar de forma profiláctica una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención durante la temporada de la gripe. En otro ejemplo específico, se podría tratar el infarto post miocardio de un sujeto mediante inyecciones i.v. para reducir el tamaño de la placa y estabilizar la placa para prevenir rotura o erosión.

35 Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferentes de la invención. Los expertos en la materia deberían observar que las técnicas desveladas en los ejemplos que siguen a continuación representan técnicas descubiertas por el inventor que funcionan bien en la práctica de la invención, y por lo tanto se puede considerar que constituyen modos preferentes para su práctica. Sin embargo, los expertos en la materia deberían observar, a la vista de la presente divulgación, que se pueden realizar muchos cambios en las realizaciones específicas que se desvelan y aún obtener un resultado parecido o similar.

### Ejemplos

40 En los siguientes ejemplos, los inventores buscaban determinar los efectos de la modificación de lisina, metionina, y triptófano, que son restos sensibles a MPO en ApoA1. Se encontró que la sustitución de los cuatro restos de triptófano en ApoA1 con leucinas conduce una pérdida de función, mientras que la sustitución de triptófano con fenilalanina no solamente conserva la función de ApoA1, sino que la hace resistente a la inactivación oxidativa con MPO.

### 45 Procedimientos

#### Espectrometría de Masas

50 La ApoA1 obtenida a partir de ateroma humano se aisló mediante cromatografía de inmunoafinidad como se ha descrito anteriormente. La ApoA1 se eluyó en tampón de glicina (pH 2,5) y se sometió directamente a digestión con tripsina o se separó en primer lugar con SDS-PAGE y se sometió a una digestión con tripsina en gel. Se realizó espectrometría de masas y se obtuvieron espectros de disociación inducida por colisión (CID), como se ha descrito anteriormente. Los análisis de clorotirosina y ácido 2-amino adípico se realizaron después de hidrólisis ácida con patrones internos de isótopos pesados como se ha descrito anteriormente usando ensayos por duplicado de ApoA1 a partir de ateroma humano o a partir de plasma de voluntarios sanos aislados mediante cromatografía de inmunoafinidad.

55



### Mutagénesis Dirigida al Sitio y Producción de ApoA1 Recombinantes

Se prepararon mutaciones puntuales para restos de triptófano (8, 50, 72, 108) y metionina (86, 112, 148) usando el Kit de Mutagénesis Quick-Change de Stratagene y se confirmaron mediante secuenciación de ADN. Los plásmido se transformaron en expresión de ApoA1 de las cepas BL21 (DE-3) pLysS, InJ de *Escherichia coli* y la purificación se realizó como se ha descrito anteriormente. Se hizo una diálisis extensa de la rh-ApoA1 con respecto a tampón de reacción de PBS o MPO (60 mmol/l de fosfato sódico, 100 mmol/l de cloruro sódico, 100 µmol/l de ácido dietilentriamina pentaacético, pH 7,0) para retirar cualquier traza de imidazol, se analizó mediante SDS-PAGE, y se encontró que era pura en > 95 %. Dado que la sustitución de Trp y Met altera la DO<sub>280</sub> de la proteína y la reactividad con respecto a los ensayos de proteína de BCA o Lowry, las concentraciones de proteína se determinaron basándose en aminos libres usando el ensayo de o-ftaldialdehído (OPA), con un patrón de ApoA1 derivada de plasma humano (Biodesign), como se ha descrito anteriormente. La escisión de la etiqueta inicial de Met e His de rh-ApoA1 se realizó mediante tratamiento con ácido fórmico, seguido de purificación con cromatografía líquida rápida de proteína (FPLC).

### Modificaciones de Lisina de ApoA1

La ApoA1 derivada del plasma humano se dializó con respecto a PBS y se diluyó hasta 0,5 mg/ml. La metilación reductora con lisina se realizó como se ha descrito anteriormente. El alcance de la modificación de lisina se determinó mediante el ensayo de OPA. A continuación, la ApoA1 se dializó con respecto a tampón de reacción de MPO, y la concentración de proteína de la ApoA1 modificada con lisina se determinó usando reactivos BCA.

### Modificaciones de ApoA1 con MPO y Ácido Hipocloroso

El MPO a una concentración final de 57 nmol/l, preparado como se ha descrito anteriormente, se añadió a ApoA1 a 100 µg/ml (3,5 µmol/l) que se había dializado ampliamente con respecto a tampón de reacción de MPO. La reacción comenzó mediante la adición de peróxido de hidrógeno a proporciones molares variables con respecto a ApoA1 en 4 alícuotas a intervalos de 15 minutos a 37 °C, y la incubación continuó durante 90 minutos, momento en el que se añadieron 2 mmol/l de L-metionina inactivar la reacción. Para la modificación química de la ApoA1, se añadió hipoclorito sódico (NaOCl) a 100 µg/ml de ApoA1 en tampón de MPO a concentraciones variables en 4 alícuotas a intervalos de 15 minutos a 37 °C. Después de un tiempo de incubación total de 60 minutos, se añadieron 2 mmol/l de L-Metionina para interrumpir la reacción.

### Ensayo de Eflujo de Colesterol Dependiente de ABCA I

Las células de macrófago de murino RAW 264.7 se etiquetaron con [<sup>3</sup>H] colesterol y se trataron con 0,3 mmol/l de 8Br-cAMP para inducir actividad de ABCA1, como se ha descrito anteriormente. Las células se lavaron y se siguieron durante 4 horas en medio sin suero en presencia de 0,3 mmol/l de 8Br-cAMP ay la presencia o ausencia de diversas preparaciones de ApoA1. La radiactividad en los medios de seguimiento se determinó después de una breve centrifugación hasta el residuo sedimentado. La radiactividad en las células de término por extracción en hexano:isopropanol (3:2) con el disolvente evaporado el mundial de centelleo antes del recuento. El porcentaje de eflujo de colesterol se calculó como 100 X (dpm en el medio)/(dpm en el medio + dpm celular).

### Ensayo de Actividad de Unión a Lípido

La actividad de unión a lípido de ApoA1 se evaluó a través de la inhibición de la agregación mediada por fosfolipasa C (PLC) de lipoproteína de baja densidad humana, realizará como se ha descrito anteriormente. Los inventores han mostrado anteriormente que este ensayo da resultados similares a los observados con el ensayo de eliminación de dispersión de DMPC, pero es más sensible y requiere menos ApoA1. La concentración final de ApoA1 usada en este ensayo era de 12,5 µg/ml que era suficiente para disminuir la agregación de LDL de tasa de inicial en ≈75 %.

### Detección de Reticulaciones de ApoA1

Se desnaturalizaron 250 ng de ApoA1 por calle en un tampón muestra de SDS, desarrollado en un gel de Tris glicina al 10 % en presencia de SDS; y la proteína se transfirió a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). La membrana se sondeó secuencialmente con anticuerpo primario de ApoA1 anti-humana de cabra (dilución la 1:1.000. DiaSorin) y anticuerpo conjugado con HRP anticabra de conejo (dilución la 1:1.000), y la ApoA1 se visualizó con un sustrato con aumento de la quimioluminiscencia.

### Resultados

#### Modificaciones de ApoA1 en Ateroma Humano

Los inventores determinaron si la ApoA1 aislada de células de ateroma humano incluían restos de triptófano, metionina y lisina modificados Usando espectrometría de masas en tándem, los inventores fueron capaces de detectar restos de monohidroxitriptófano en las cuatro posiciones del triptófano, 8, 50, 72, y 108, y de dihidroxitriptófano en la posición 108 dentro de ApoA1 (Figs. 1A-F). Los inventores anteriormente identificaron mono- y di-hidroxitriptófano en el resto W72 en ApoA1 modificada con MPO *in vitro* (Peng, D.Q., Wu, Z., Brubaker, G.,

Zheng, L., Settle, M., Gross, E., Kinter, M., Hazen, S.L. y Smith, J.D. (2005) *J Biol Chem* 280, 33775-33784). Además, los inventores detectaron sulfóxido de metionina en los restos 48 y 112 (Fig. 1D, E). Para buscar modificación de lisina con HOCl generado por MPO, los inventores usaron HPLC con dilución de isótopos estables con espectrometría de masas en tándem en línea para cuantificar el ácido 2-aminoadípico, un producto final de la oxidación de la lisina con el oxidante generado por MPO. Los niveles de ácido 2-aminoadípico eran bajos pero detectables en la ApoA1 aislada a partir del plasma de seis voluntarios sanos, mientras que los valores medios eran sorprendentemente elevados, ~16 veces en ApoA1 aislada de seis muestras de ateroma humano (Fig. 2,  $p = 0,005$  con un ensayo t de dos colas). Por lo tanto, la oxidación de ApoA1 con triptófano, metionina, y lisina se produce fisiológicamente dentro del ateroma humano. Por lo tanto, los inventores buscaban determinar cuál de estas modificaciones era responsable de proporcionar ApoA1 disfuncional con una disminución de la capacidad para aceptar colesterol celular.

#### Modificación de Lisina de ApoA1

En la estructura anfipática de ApoA1, los 21 restos de lisina residen de forma abrumadora en ambos lados y adyacentes a la cara hidrófoba. La modificación de lisina con MPO es un candidato atractivo para ser responsable de la pérdida de la función ApoA1 inducida por MPO ya que anteriormente los inventores demostraron que los restos de lisina de ApoA1 pueden sufrir modificación por MPO, y que una amplia modificación química de los restos de lisina de ApoA1 que alteran su carga positiva conduce a la pérdida de actividad aceptor de colesterol de ApoA1. Sin embargo, los inventores también encontraron que la modificación de lisina por metilación reductora, que conserva la carga positiva de la lisina, conducía solamente a reducciones discretas de la función de ApoA1. La ApoA1 se sometió a una metilación reductora, lo que conduce a una modificación de la lisina de un 92 %, o incubación de control y se dializó ampliamente frente a tampón de reacción de MPO. Se realizaron reacciones de modificación usando cantidades catalíticas de MPO y aumentando las proporciones molares de  $H_2O_2$ :ApoA1. Los productos de reacción se evaluaron para determinar la actividad aceptor de colesterol usando macrófagos RAW264 etiquetados con colesterol que se habían tratado previamente con un análogo de cAMP para inducir ABCA1. En ausencia de  $H_2O_2$  en la reacción de modificación, las ApoA1 de control metiladas y no metiladas tenían actividad aceptor de colesterol dependiente de ABCA1 robusta y equivalente. Con dosis crecientes de  $H_2O_2$  la actividad aceptor de colesterol de las muestras de ApoA1 tanto metiladas como de control disminuyó de una manera similar (Fig. 3). Además, el contenido de hélice alfa de estas preparaciones se calculó con CD, y las preparaciones de ApoA1 tanto metiladas como de control eran igualmente susceptibles a la reducción del contenido de hélice alfa dependiente de la dosis de MPO/ $H_2O_2$ . Dado que la metilación reductora de la amina primaria de la lisina en una amina terciaria disminuye su reactividad química, pero no conducía a la protección de la función de ApoA1, es improbable que la modificación de lisina de ApoA1 con MPO sea responsable de la pérdida de función de ApoA1.

#### La modificación de metionina no protege frente a la pérdida de la función de ApoA1 inducida con MPO

A continuación, los inventores centraron su atención en los tres restos de metionina de ApoA1, que anteriormente se habían relacionado con la pérdida de la función ApoA1 de inducida por MPO. Para sustituir la valina para las tres metioninas, los inventores usaron ApoA1 recombinante humana (rh-ApoA1), que añade un codón de inicio de metionina adicional y una etiqueta de 6-his en el extremo N-terminal. Los inventores habían demostrado previamente que la rh-ApoA1 se comporta de un modo similar a la ApoA1 derivada de plasma en su actividad de colesterol en su actividad aceptor de colesterol, actividad de unión a lípido, y su susceptibilidad a la pérdida de función mediada por MPO. Usando mutagénesis dirigida al sitio, los inventores crearon una construcción de expresión de ApoA1 que codifica una proteína con las tres metioninas internas convertidas en valinas, a las que los inventores se refieren como rh-ApoA1 3MV (3 metionina con respecto a valina). La metionina de inicio no se puede sustituir. Sin embargo, esta metionina y la etiqueta de his se puede prescindir por vía química mediante incubación con ácido fórmico, tal como se ha descrito anteriormente (Ryan, R. O., Forte, T. M., y Oda, M. N. (2003) *Protein Expr. Purif.* 27, 98-103), debido a la sustitución de glutamato en la posición 2 con un aspartato, produciendo un dipéptido de Asp-Pro único sensible al ácido fórmico adyacente a la etiqueta de His. Los inventores determinaron que la rh-ApoA1 3MV, independientemente de si las etiquetas de Met e His de inicio estaban intactas o eliminadas, tenía una actividad de aceptor de colesterol dependiente de ABCA1 similar en comparación con la rh-ApoA1 de tipo silvestre. Además, la rh-ApoA1 3MV, con o sin la metionina N-terminal, y la rh-ApoA1 de tipo silvestre eran igualmente susceptibles a una pérdida de actividad aceptor de colesterol mediada por MPO a dosis elevada ( $H_2O_2$ :ApoA1 = 15:1) (Fig. 4A). Las modificaciones de MPO de rh-ApoA1 y la variante 3MV se realizaron a proporciones molares de  $H_2O_2$ :ApoA1 variables y discretas, y la variante 3MV era más sensible a la pérdida de la actividad aceptor de colesterol a proporciones molares bajas (Fig 4B). Por ejemplo, a una proporción de  $H_2O_2$ :ApoA1 de 1,4, la ApoA1 de tipo silvestre presentaba una pérdida insignificante de actividad aceptor de colesterol, mientras que la variante 3MV perdía aproximadamente la mitad de su actividad aceptor de colesterol. Por lo tanto, los inventores encontraron que los tres restos de metionina en ApoA1, en lugar de desempeñar un papel en el deterioro oxidativo de la función de ApoA1, de hecho desempeñaban un papel protector por oxidantes inofensivamente absorbentes.

#### Los restos de triptófano de ApoA1 desempeñan un papel en la función de ApoA1

A continuación, los inventores examinaron el papel de los restos de triptófano de ApoA 1 resto de triptófanos alterando cada uno de los cuatro restos de triptófano con respecto a cualquiera de leucina (rh-ApoA1 4WL) o fenilalanina (rh-ApoA1 4WF). La naturaleza aromática de los restos de triptófano parecía ser crucial para la actividad

receptora de colesterol de la ApoA1, ya que la variante 4WL el día en la mayor parte de esta actividad en los estudios de eflujo de colesterol realizados con respecto a un amplio intervalo de dosis de ApoA1, mientras que la variante 4WF conservaba esta actividad (Fig. 5A). Los inventores examinaron el contenido predicho de hélice alfa de estas proteínas mediante CD usando el algoritmo K2d, y encontraron que la proteína de tipo silvestre tenía un 57 % de hélice alfa, mientras que las variantes de 4WL y 4WF ambas habían aumentado los contenidos de hélice alfa en un 79 % y un 77 %, respectivamente. Por lo tanto, la pérdida de eflujo y la actividad de unión a lípido de la variante 4WL no se pueden atribuir a la pérdida de contenido helicoidal.

Tanto la rh-ApoA1 como la variante 4WF se sometieron al sistema de oxidación MPO/Cl<sup>-</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a dosis crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La Fig. 5B muestra el resultado de un estudio representativo de 4 experimentos diferentes usando dos preparaciones independientes de cada proteína. Como se ha observado anteriormente, la actividad aceptora de colesterol dependiente de ABCA1 de la ApoA1 de tipo silvestre se inhibía mediante el aumento de la oxidación inducida por MPO; sin embargo, la variante 4WF mantenía esta actividad incluso a una proporción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:ApoA1 de 15.

El sistema de oxidación MPO/Cl<sup>-</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> genera HOCl, el reactivo activo de la lejía, y los inventores y otros han demostrado anteriormente que el tratamiento de ApoA1 con HOCl da como resultado una pérdida de actividad aceptora de colesterol y de unión a lípido. Por lo tanto, los inventores sometieron a la ApoA1 de tipo silvestre y a la variante 4WF a dosis crecientes de HOCl. Del mismo modo que con los hallazgos del sistema de modificación de MPO, la actividad aceptora de colesterol de la variante 4WF era resistente a este tratamiento mientras que la actividad de eflujo de la rh-ApoA1 de tipo silvestre se veía alterada por el aumento de las dosis de HOCl (Fig. 6).

La actividad de unión a lípido de rh-ApoA1 y la variante 4WF se evaluaron mediante un ensayo de eliminación de emulsión de DMPC, y ambas proteínas mostraban una actividad equivalente (Fig. 7A). La actividad de unión a lípido sin células de rh-ApoA1 4WF también era resistente a la inhibición mediada por MPO, en comparación con rh-ApoA1 (Fig. 4B) usando un ensayo de agregación de LDL mediado por PLC (Fig. 7B).

La modificación de ApoA1 con MPO conduce a una amplia reticulación que da como resultado dímeros, multímeros, y también supuestamente reticulaciones intramoleculares. Los inventores han mostrado previamente que el patrón de reticulación de ApoA1 mediado con MPO no se veía alterado en la variante con los 7 restos de tirosina convertidos en fenilalanina. Después de someter a la rh-ApoA1 y la variante 4WF a oxidación con MPO/Cl<sup>-</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a dosis crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (usando los productos proteínicos idénticos que se usaron para el flujo en la Fig. 5B), los inventores observaron una alteración de la migración de ambas proteínas en geles desnaturalizantes coherente con la reticulación intermolecular. Sin embargo, los patrones de migración eran diferentes, con la variante 4WF dando una banda predominante aguda de aproximadamente 70 kD, mientras que la proteína de tipo silvestre proporcionaba una zona predominante menos marcada entre 55 y 65 kD (Fig. 8). La migración del monómero se veía alterada para ambas proteínas, lo que podría ser indicativo de reticulaciones intramoleculares o modificaciones de amino. Aunque la variante 4WF es resistente a la pérdida de actividad aceptora de colesterol mediada por MPO, esta variante era más susceptible a la reticulación inducida por MPO, en particular a dosis bajas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los inventores también sometieron estas proteínas modificadas a análisis estructural con CD, y encontraron que ambas eran susceptibles a la pérdida de contenido de hélice alfa, aunque la variante 4WF comenzaba con un valor más elevado.

Los inventores también prepararon rHDL mediante diálisis con colato usando POCP y la ApoA1 de tipo silvestre o de 4WF. Ambas proporcionaban un patrón similar de discos de rHDL calculados mediante geles no desnaturalizantes a ~ 9,8, 12, y 17 nm, sin ninguna ApoA1 sin líquido restante (Fig. 9). Los inventores sometieron a ensayo la rHDL de tipo silvestre y la de 4WF, y ambas eran igualmente competentes para mediar el eflujo de colesterol independiente de ABCA1 de las células RAW264.7 (Fig. 10), sin actividad aceptora dependiente de ABCA1, tal como se esperaba para la ApoA1 totalmente lipidada.

Los inventores sintetizaron el péptido p18 anfipático helicoidal descrito anteriormente, que contiene un resto de triptófano en la posición 2. Los inventores también sintetizaron análogos que reemplazan el triptófano con fenilalanina (P 18 WF) o leucina (P 18 LF). Los inventores demostraron que estos péptidos sin triptófano no tienen actividad lectora de colesterol mediada por ABCA1 dependiente de la dosis (Fig.11).

La presente divulgación también contempla lo siguiente:

1. Un polipéptido purificado que comprende un mimético de ApoA1 que es capaz de estimular el eflujo de colesterol desde células cargadas con lípido, mimético de ApoA1 que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye al menos una parte de la secuencia de aminoácidos de ApoA1 o un mimético de la ApoA1 que contiene al menos un triptófano, al menos un triptófano de la ApoA1 o mimético de la ApoA1 que está siendo sustituido con un aminoácido resistente a oxidación en la secuencia de aminoácidos del mimético de ApoA1.

2. El polipéptido de la cláusula 1, en el que el mimético de ApoA1 es resistente a al menos uno de oxidación con oxidante generado por MPO MPO, oxidación con una especie de cloración reactiva generada por MPO, oxidación asociada con el sistema MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Cl<sup>-</sup>, oxidación con HOCl/OCl<sup>-</sup>, oxidación con una especie reactiva de nitrógeno generada por MPO, oxidación asociada con el sistema MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, oxidación con dióxido de nitrógeno, oxidación con peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), oxidación con peroxicarboxinitrito (ONOCO<sub>2</sub><sup>-</sup>), u oxidación con

- un producto formado cuando  $\text{ONOO}^-$  actúa en presencia de  $\text{CO}_2$  o  $\text{HCO}_3^-$  en tampón.
3. El polipéptido de la cláusula 1, siendo fenilalanina el aminoácido resistente a oxidantes.
  4. El polipéptido de la cláusula 1 que comprende al menos una parte de la SEQ ID NO: 1, en la que X se selecciona entre el grupo que consiste en triptófano o fenilalanina y al menos un X es fenilalanina.
  5. El polipéptido de la cláusula 1, mimético de ApoA1 que consta esencialmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 aminoácidos de ApoA1 nativa, que incluye al menos un triptófano, y el al menos un triptófano está sustituido con un aminoácido resistente a oxidantes.
  6. El polipéptido de la cláusula 1, mimético de ApoA1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 2-69, en las que X es un triptófano o un amino resistente a oxidantes y al menos un X está sustituido por un resto resistente a oxidantes.
  7. El polipéptido de la cláusula 1, polipéptido que comprende al menos un resto de aminoácido "D".
  8. El polipéptido de la cláusula 1, en el que todos o la mayoría de los aminoácidos enantioméricos son aminoácidos "D".
  9. El polipéptido de la cláusula 1, polipéptido que comprende adicionalmente un grupo protector.
  10. El polipéptido de la cláusula 1 que comprende adicionalmente una etiqueta de polihistidina.
  11. El polipéptido de la cláusula 1, polipéptido que es resistente a la inactivación oxidativa mediante inactivación con mieloperoxidasa (MPO) cuando se administra a un sujeto.
  12. El polipéptido de la cláusula 1, polipéptido que es una proteína de fusión.
  13. Un polipéptido de apolipoproteína purificada que comprende una secuencia de aminoácidos de apolipoproteína nativa modificada mediante la sustitución de uno o más restos de triptófano de la secuencia de aminoácidos nativa con un aminoácido resistente a oxidantes.
  14. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de la cláusula 1, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
  15. La composición farmacéutica de la cláusula 14, en la que la composición se formula para su administración a un sujeto mediante una vía seleccionada entre el grupo que consiste en administración oral, administración nasal, administración rectal, inyección intraperitoneal, inyección intravascular, inyección subcutánea, administración transcutánea, administración mediante inhalación, e inyección intramuscular.
  16. Un procedimiento para tratar trastornos cardiovasculares que comprende la etapa de:
    - administrar a un sujeto un mimético de ApoA1 que es capaz de estimular el flujo de colesterol desde células cargadas con lípido, mimético de ApoA1 que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye al menos una parte de la secuencia de aminoácidos de ApoA1 o un mimético de la ApoA1 que contiene al menos un triptófano, al menos un triptófano de la ApoA1 o mimético de la ApoA1 que está siendo sustituido con un aminoácido resistente a oxidantes en la secuencia de aminoácidos del mimético de ApoA1.
  17. El procedimiento de la cláusula 16, en el que el mimético de ApoA1 es resistente a al menos uno de oxidación con oxidante generado por MPO, oxidación con una especie de cloración reactiva generada por MPO, oxidación asociada con el sistema  $\text{MPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Cl}^-$ , oxidación con  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$ , oxidación con una especie reactiva de nitrógeno generada por MPO, oxidación asociada con el sistema  $\text{MPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{NO}_2^-$ , oxidación con dióxido de nitrógeno, oxidación con peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), oxidación con peroxycarboxinitrito ( $\text{ONOOCO}_2^-$ ), u oxidación con un producto formado cuando  $\text{ONOO}^-$  actúa en presencia de  $\text{CO}_2$  o  $\text{HCO}_3^-$  en tampón.
  18. El procedimiento de la cláusula 16, siendo fenilalanina el aminoácido resistente a oxidantes.
  19. El procedimiento de la cláusula 16 que comprende al menos una parte de la SEQ ID NO: 1, en la que X se selecciona entre el grupo que consiste en triptófano o fenilalanina y al menos un X es fenilalanina.
  20. El procedimiento de la cláusula 16, mimético de ApoA1 que consta esencialmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 aminoácidos de ApoA1 nativa, que incluye al menos un triptófano, y el al menos un triptófano está sustituido con un aminoácido resistente a oxidantes.
  21. El procedimiento de la cláusula 16, mimético de ApoA1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 2-69, en el que X es un triptófano o un amino resistente a oxidantes y al menos un X está sustituido por un resto resistente a oxidantes.

22. El procedimiento de la cláusula 16, polipéptido que es resistente a la inactivación oxidativa mediante inactivación con mieloperoxidasa (MPO) cuando se administra al sujeto.
23. Un procedimiento para estimular el eflujo de colesterol de una célula que comprende la etapa de:
- 5 administrar a la célula una cantidad biológicamente eficaz de un mimético de ApoA1 que es capaz de estimular el eflujo de colesterol desde células cargadas con lípido, mimético de ApoA1 que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye al menos una parte de la secuencia de aminoácidos of ApoA1 o un mimético de la ApoA1 que contiene al menos un triptófano, al menos un triptófano de la ApoA1 o mimético de la ApoA1 que está siendo sustituido con un aminoácido resistente a oxidantes en la secuencia de aminoácidos del mimético de ApoA1.
- 10 24. El procedimiento de la cláusula 23, polipéptido que no inhibe sustancialmente la unión de lípido de apolipoproteína y el eflujo de colesterol.
- 15 25. El procedimiento de la cláusula 23, en el que el mimético de ApoA1 es resistente a al menos uno de oxidación con oxidante generado por MPO MPO, oxidación con una especie de cloración reactiva generada por MPO, oxidación asociada con el sistema MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Cl<sup>-</sup>, oxidación con HOCl/OCl<sup>-</sup>, oxidación con una especie reactiva de nitrógeno generada por MPO, oxidación asociada con el sistema MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, oxidación con dióxido de nitrógeno, oxidación con peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), oxidación con peroxycarboxinitrito (ONOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup>), u oxidación con un producto formado cuando ONOO<sup>-</sup> actúa en presencia de CO<sub>2</sub> o HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en tampón.
- 20 26. El procedimiento de la cláusula 23, siendo fenilalanina el aminoácido resistente a oxidantes.
27. El procedimiento de la cláusula 23 que comprende al menos una parte de la SEQ ID NO: 1, en la que X se selecciona entre el grupo que consiste en triptófano o fenilalanina y al menos un X es fenilalanina.
- 25 28. El procedimiento de la cláusula 23, mimético de ApoA1 que consta esencialmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 aminoácidos de ApoA1 nativa, que incluye al menos un triptófano, y el al menos un triptófano está sustituido con un aminoácido resistente a oxidantes.
29. El procedimiento de la cláusula 23, mimético de ApoA1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 2-69, en las que X es un triptófano o un amino resistente a oxidantes y al menos un X está sustituido por un resto resistente a oxidantes.
30. Un procedimiento para mejorar uno o más síntomas de una afección inflamatoria en un sujeto que comprende:
- 30 administrar al sujeto un mimético de ApoA1 que es capaz de estimular el eflujo de colesterol desde células cargadas con lípido, mimético de ApoA1 que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye al menos una parte de la secuencia de aminoácidos of ApoA1 o un mimético de la ApoA1 que contiene al menos un triptófano, al menos un triptófano de la ApoA1 o mimético de la ApoA1 que está siendo sustituido con un aminoácido resistente a oxidantes en la secuencia de aminoácidos del mimético de ApoA1.
- 35 31. El procedimiento de la cláusula 30, la afección inflamatoria que comprende aterosclerosis.
32. El procedimiento de la cláusula 30, la afección inflamatoria que comprende estenosis.
33. El procedimiento de la cláusula 30 que comprende adicionalmente la etapa de administración de una estatina al sujeto.
- 40 34. El procedimiento de la cláusula 30, en el que el mimético de ApoA 1 es resistente a al menos uno de oxidación con oxidante generado por MPO MPO, oxidación con una especie de cloración reactiva generada por MPO, oxidación asociada con el sistema MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Cl<sup>-</sup>, oxidación con HOCl/OCl<sup>-</sup>, oxidación con una especie reactiva de nitrógeno generada por MPO, oxidación asociada con el sistema MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, oxidación con dióxido de nitrógeno, oxidación con peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), oxidación con peroxycarboxinitrito (ONOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup>), u oxidación con un producto formado cuando ONOO<sup>-</sup> actúa en presencia de CO<sub>2</sub> o HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en tampón.
- 45 35. El procedimiento de la cláusula 30, siendo fenilalanina el aminoácido resistente a oxidantes.
36. El procedimiento de la cláusula 30 que comprende al menos una parte de la SEQ ID NO: 1, en la que X se selecciona entre el grupo que consiste en triptófano o fenilalanina y al menos un X es fenilalanina.
37. El procedimiento de la cláusula 30, mimético de ApoA1 que consta esencialmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 aminoácidos de ApoA1 nativa, que incluye al menos un triptófano, y el al menos un triptófano está sustituido con un aminoácido resistente a oxidantes.
- 50 38. El procedimiento de la cláusula 30, mimético de ApoA1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 2-69, en las que X es un triptófano o un amino

resistente a oxidantes y al menos un X está sustituido por un resto resistente a oxidantes.

39. Un procedimiento para aliviar mitigar la pérdida de oxidante de MPO de la función de eflujo de colesterol de ApoA1, un triptófano que contiene un fragmento de la misma, o miméticos de la misma que comprende la sustitución de al menos un resto de triptófano de la ApoA1, fragmento de la misma, o mimético de la misma para un aminoácido resistente a oxidantes, procedimiento que comprende:

sustituir al menos un resto de triptófano de la ApoA1, fragmento de la misma, o mimético de la misma con un aminoácido resistente a oxidantes.

40. El procedimiento de la cláusula 39, siendo fenilalanina el aminoácido resistente a oxidantes.

41. Un procedimiento para tratar lesión de células endoteliales en un sujeto, procedimiento que comprende:

administrar al sujeto un mimético de ApoA1 que es capaz de estimular el eflujo de colesterol desde células cargadas con lípido, mimético de ApoA1 que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye al menos una parte de la secuencia de aminoácidos of ApoA1 o un mimético de la ApoA1 que contiene al menos un triptófano, al menos un triptófano de la ApoA1 o mimético de la ApoA1 que está siendo sustituido con un aminoácido resistente a oxidantes en la secuencia de aminoácidos del mimético de ApoA1.

42. El procedimiento de la cláusula 41, lesión de células endoteliales que se produce después de lesión vascular.

43. El procedimiento de la cláusula 41, siendo la ApoA1 administrada a una cantidad eficaz para estimular la migración de células endoteliales en el sujeto.

44. El procedimiento de la cláusula 41, en el que el mimético de ApoA1 es resistente a al menos uno de oxidación con oxidante generado por MPO MPO, oxidación con una especie de cloración reactiva generada por MPO, oxidación asociada con el sistema MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Cl<sup>-</sup>, oxidación con HOCl/OCl<sup>-</sup>, oxidación con una especie reactiva de nitrógeno generada por MPO, oxidación asociada con el sistema MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, oxidación con dióxido de nitrógeno, oxidación con peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), oxidación con peroxycarboxinitrito (ONOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup>), u oxidación con un producto formado cuando ONOO<sup>-</sup> actúa en presencia de CO<sub>2</sub> o HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en tampón.

45. El procedimiento de la cláusula 41, siendo fenilalanina el aminoácido resistente a oxidantes.

46. El procedimiento de la cláusula 41 que comprende al menos una parte de la SEQ ID NO: 1, en la que X se selecciona entre el grupo que consiste en triptófano o fenilalanina y al menos un X es fenilalanina.

47. El procedimiento de la cláusula 41, mimético de ApoA1 que consta esencialmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 aminoácidos de ApoA1 nativa, que incluye al menos un triptófano, y el al menos un triptófano está sustituido con un aminoácido resistente a oxidantes.

48. El procedimiento de la cláusula 41, mimético de ApoA1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 2-69, en las que X es un triptófano o un amino resistente a oxidantes y al menos un X está sustituido por un resto resistente a oxidantes.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Cleveland Clinic Foundation

<120> APOLIPOPROTEÍNA RESISTENTE A OXIDACIÓN A-I Y PÉPTIDOS MIMÉTICOS

<130> PE953877EPA

<160> 76

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 243

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8) .. (8)

<223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación

<220>

ES 2 601 830 T3

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (50)..(50)  
 <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (72)..(72)  
 <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (108)..(108)  
 <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación

15 <400> 1

Asp	Glu	Pro	Pro	Gln	Ser	Pro	Xaa	Asp	Arg	Val	Lys	Asp	Leu	Ala	Thr
1				5					10					15	
Val	Tyr	Val	Asp	Val	Leu	Lys	Asp	Ser	Gly	Arg	Asp	Tyr	Val	Ser	Gln
			20					25					30		
Phe	Glu	Gly	Ser	Ala	Leu	Gly	Lys	Gln	Leu	Asn	Leu	Lys	Leu	Leu	Asp
		35					40					45			
Asn	Xaa	Asp	Ser	Val	Thr	Ser	Thr	Phe	Ser	Lys	Leu	Arg	Glu	Gln	Leu
	50					55					60				
Gly	Pro	Val	Thr	Gln	Glu	Phe	Xaa	Asp	Asn	Leu	Glu	Lys	Glu	Thr	Glu
65					70					75					80
Gly	Leu	Arg	Gln	Glu	Met	Ser	Lys	Asp	Leu	Glu	Glu	Val	Lys	Ala	Lys
				85					90					95	

ES 2 601 830 T3

Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Xaa Gln Glu Glu Met  
 100 105 110

Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu  
 115 120 125

Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu  
 130 135 140

Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg  
 145 150 155 160

Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala  
 165 170 175

Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr  
 180 185 190

His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys  
 195 200 205

Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser  
 210 215 220

Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu  
 225 230 235 240

Asn Thr Gln

- 5 <210> 2
- <211> 243
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
  
- 10 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (8) .. (8)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
  
- 15 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (22) .. (22)
- <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación
  
- 20 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (32) .. (32)
- <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación
  
- 25 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (50) .. (50)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
  
- 30 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (72) .. (72)



ES 2 601 830 T3

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> MISC\_FEATURE

5 <222> (74) .. (74)

<223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación

<220>

<221> MISC\_FEATURE

10 <222> (96) .. (96)

<223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación

<220>

<221> misc\_feature

15 <222> (108)..(108)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> MISC\_FEATURE

20 <222> (132) .. (132)

<223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación

<400> 2

Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Xaa Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr  
1 5 10 15

Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln  
20 25 30

Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp  
35 40 45

Asn Xaa Asp Ser Val Thr Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu  
50 55 60

Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Xaa Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu  
65 70 75 80

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

Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Xaa Gln Glu Glu Met  
100 105 110

Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu  
115 120 125

25

ES 2 601 830 T3

Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu  
 130 135 140

Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg  
 145 150 155 160

Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Cys Leu Ala Ala  
 165 170 175

Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr  
 180 185 190

His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys  
 195 200 205

Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser  
 210 215 220

Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu  
 225 230 235 240

Asn Thr Gln

- 5 <210> 3
- <211> 243
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
  
- 10 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (8).. (8)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
  
- 15 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (22).. (22)
- <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación
  
- 20 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (32).. (32)
- <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación
  
- 25 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (50).. (50)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
  
- 30 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (72).. (72)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
  
- 35 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (74).. (74)
- <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (96)..(96)  
 <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación

5

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (108)..(108)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

10

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (132)..(132)  
 <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación

15

<400> 3

```

Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Xaa Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr
 1          5          10          15

Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln
          20          25          30

Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp
          35          40          45

Asn Xaa Asp Ser Val Thr Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu
 50          55          60

Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Xaa Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu
65          70          75          80

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

Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Xaa Gln Glu Glu Met
          100          105          110

Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu
          115          120          125

Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu
          130          135          140

Gly Glu Glu Met Arg Asp Cys Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg
          145          150          155          160

Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Cys Leu Ala Ala
    
```



ES 2 601 830 T3

<213> *Homo sapiens*

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación

<400> 6

```

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

```

Ala Phe

<210> 7  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación

<400> 7

```

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

```

Ala Phe

<210> 8  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación

<400> 8

```

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

```

Phe Phe

<210> 9  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación

<400> 9

ES 2 601 830 T3

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

Phe Phe

5 <210> 10  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2) .. (2)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación

<400> 10

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

Phe Phe

15 <210> 11  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 20 <213> *Homo sapiens*

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2) .. (2)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación

<400> 11

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

Ala Phe

30 <210> 12  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 35 <213> *Homo sapiens*

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2) .. (2)  
 <223> Xaa es un ácido resistente a oxidación

<400> 12

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

Ala Phe

45 <210> 13  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 50 <213> *Homo sapiens*



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

Ala Phe

5 <210> 17  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2).. (2)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación

<400> 17

Glu Xaa Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu

15 1 5 10 15

Ala Phe

20 <210> 18  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2).. (2)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación

<400> 18

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

Phe Phe

30 <210> 19  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2).. (2)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación

<400> 19

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

Ala Phe

45 <210> 20  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*



<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2) .. (2)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación  
 <400> 20

5

**Glu Xaa Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Leu Lys Glu**

**1 5 10 15**

**Phe Phe**

10

<210> 21  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2) .. (2)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación  
 <400> 21

20

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

**Phe Phe**

25

<210> 22  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

30

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2) .. (2)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación

35

<400> 22

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

**Phe Phe**

40

<210> 23  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

45

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2) .. (2)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación

50

<400> 23

**Asp Xaa Leu Lys Ala Leu Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu**





**Glu Xaa Leu Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Phe Phe Glu Lys Phe Lys Glu**  
**1 5 10 15**

**Phe Phe**

5 <210> 31  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación  
 <400> 31

**Glu Xaa Phe Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Phe Phe Glu Lys Phe Lys Glu**  
**1 5 10 15**

15 **Phe Phe**

20 <210> 32  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación  
 <400> 32

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

**Ala Xaa**

35 <210> 33  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación  
 50 <400> 33

ES 2 601 830 T3

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

Ala Xaa

- 5 <210> 34
- <211> 18
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- 10 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (3)..(3)
- <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación
- 15 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (6)..(6)
- <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación
- 20 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (17)..(17)
- <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación
- 25 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (18)..(18)
- <400> 34

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

Xaa Xaa

- 30 <210> 35
- <211> 18
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- 35 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (3)..(3)
- <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación
- 40 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (6)..(6)
- <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación
- 45 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (17)..(17)
- <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación
- 50 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (18)..(18)
- <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación
- 55 <400> 35

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

Xaa Xaa

5 <210> 36  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación  
 <400> 36

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

15 Ala Phe

20 <210> 37  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación  
 <400> 37

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

30 Phe Leu

35 <210> 38  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación  
 <400> 38

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

45 Ala Phe

50 <210> 39  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>

ES 2 601 830 T3

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación

5 <400> 39

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

10 <210> 40  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación

20 <400> 40

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

25 <210> 41  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación

35 <400> 41

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

40 <210> 42  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación

<400> 42

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

50 Phe Phe

<210> 43

ES 2 601 830 T3

<211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación

10 <400> 43

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

Phe Phe

15 <210> 44  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación

25 <400> 44

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

Ala Phe

30 <210> 45  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación

<400> 45

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

Ala Phe

40

45 <210> 46  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación

<400> 46



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

Ala Phe

5 <210> 47  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación  
 <400> 47.

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

Ala Phe

15 <210> 48  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 20 <213> *Homo sapiens*

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación  
 <400> 48

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

Ala Phe

30 <210> 49  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 35 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación  
 40 <400> 49

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

Ala Phe

45 <210> 50  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación  
 5  
 <400> 50  
  
     **Asp Xaa Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Arg Glu**  
     1                  5                                  10                                  15  
  
     **Ala Phe**  
  
 10     <210> 51  
        <211> 18  
        <212> PRT  
        <213> *Homo sapiens*  
  
 15     <220>  
        <221> MISC\_FEATURE  
        <222> (2)..(2)  
        <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación  
  
 20     <400> 51  
  
             **Glu Xaa Leu Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Val Ala Glu Lys Leu Arg Glu**  
             1                  5                                  10                                  15  
  
                                   **Ala Phe**  
  
 25     <210> 52  
        <211> 18  
        <212> PRT  
        <213> *Homo sapiens*  
  
 30     <220>  
        <221> MISC\_FEATURE  
        <222> (2)..(2)  
        <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación  
  
        <400> 52  
  
 35     **Asp Xaa Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Arg Val Ala Glu Arg Leu Lys Glu**  
           1                  5                                  10                                  15  
  
                                   **Ala Phe**  
  
 40     <210> 53  
        <211> 18  
        <212> PRT  
        <213> *Homo sapiens*  
  
 45     <220>  
        <221> MISC\_FEATURE  
        <222> (2)..(2)  
        <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación  
  
        <400> 53

ES 2 601 830 T3

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

Ala Phe

5 <210> 54  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación

<400> 54

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

Ala Phe

15 <210> 55  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

20 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación

<400> 55

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

Ala Phe

30 <210> 56  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

35 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación

<400> 56

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

Ala Phe

45 <210> 57  
<211> 17  
<212> PRT

ES 2 601 830 T3

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC\_FEATURE

5 <222> (1)..(1)

<223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación

<400> 57

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

10 Phe

<210> 58

<211> 18

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC\_FEATURE

20 <222> (2)..(2)

<223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación

<400> 58

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

Ala Phe

25 <210> 59

<211> 18

<212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC\_FEATURE

35 <222> (2)..(2)

<223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación

<400> 59

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

Ala Phe

40 <210> 60

<211> 18

<212> PRT

45 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC\_FEATURE

50 <222> (2)..(2)

<223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación

<400> 60

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

Ala Phe

5 <210> 61  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es un aminoácido resistente a oxidación

<400> 61

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

15 Ala Phe

20 <210> 62  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación

<400> 62

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

Ala Phe Pro Asp Xaa Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys  
 20 25 30

Leu Lys Glu Ala Phe  
 35

35 <210> 63  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación

<400> 63

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

Phe Phe Pro Asp Xaa Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys  
 20 25 30

Leu Lys Glu Phe Phe  
 35

5 <210> 64  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación

20 <400> 64

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

Ala Phe Pro Asp Xaa Phe Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys  
 20 25 30

Leu Lys Glu Ala Phe  
 35

25 <210> 65  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (22)..(22)  
 <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación

40 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (32)..(32)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

45 <400> 65



ES 2 601 830 T3

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

Ala Phe Pro Asp Xaa Phe Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys  
 20 25 30

Phe Lys Glu Ala Phe  
 35

5 <210> 68  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación

<400> 68

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

Phe Phe Pro Asp Xaa Leu Lys Ala Phe Val Tyr Asp Lys Val Phe Lys  
 20 25 30

Leu Lys Glu Phe Phe  
 35

20 <210> 69  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 25 <213> *Homo sapiens*

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Xaa es triptófano o un aminoácido resistente a oxidación

<400> 69





ES 2 601 830 T3

<210> 75  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 75

Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg  
1 5

10

<210> 76  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 7

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

Ala Phe

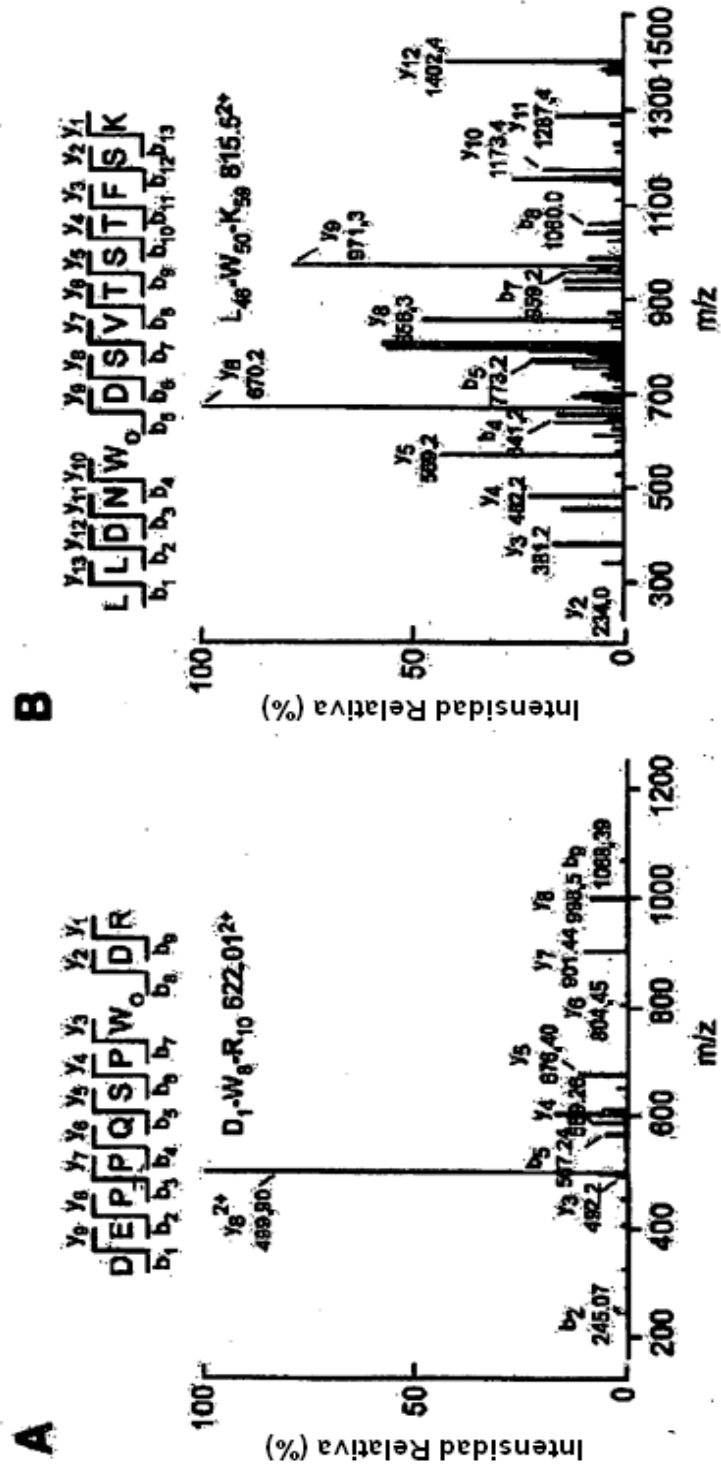
## REIVINDICACIONES

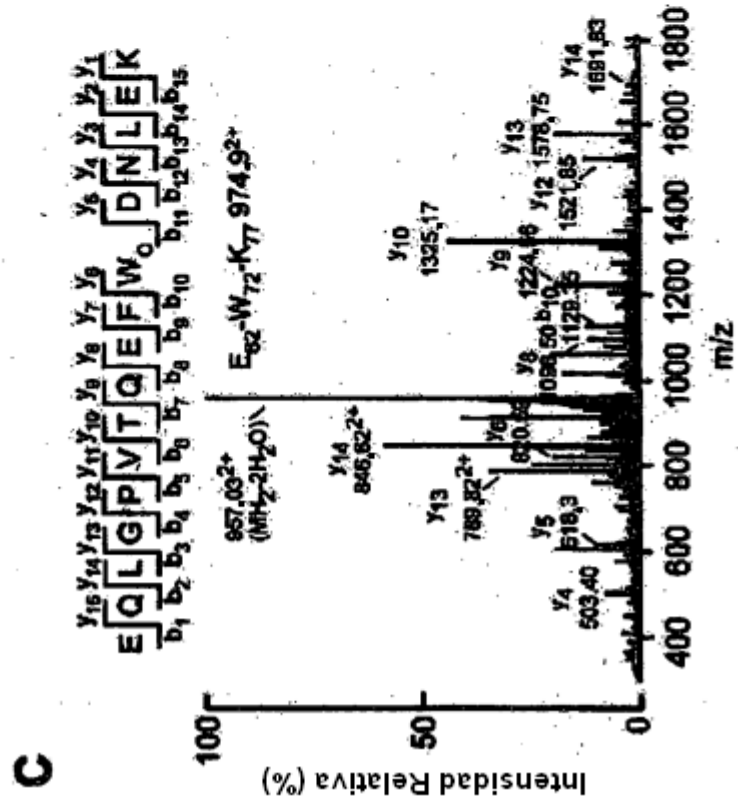
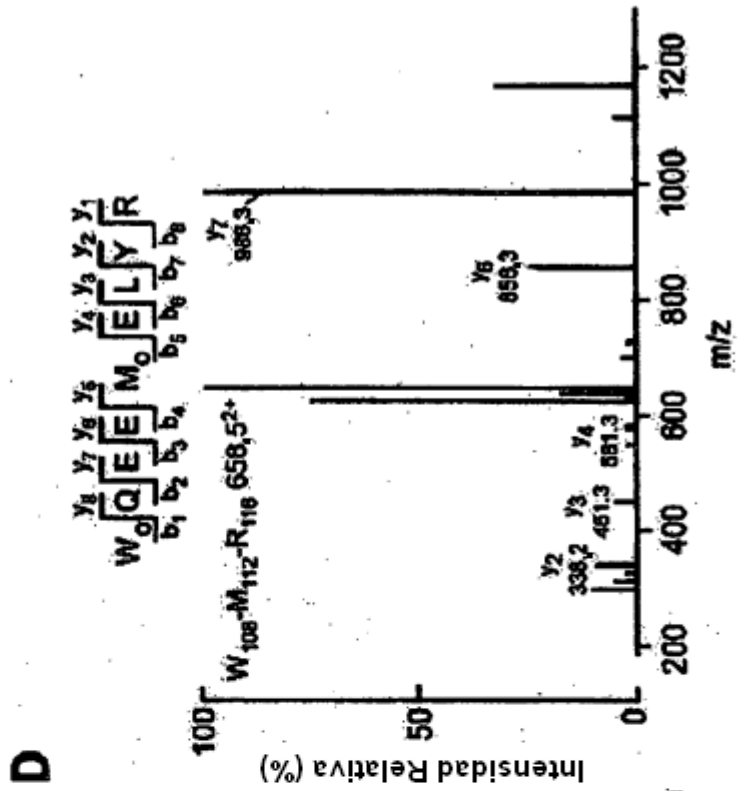
- 5 1. Un polipéptido de ApoA1 para su uso en un procedimiento para tratar trastornos cardiovasculares, el polipéptido de ApoA1, capaz de estimular el eflujo de colesterol en células cargadas con lípido, tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, en el que cada aminoácido X en cada secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 es fenilalanina.
2. El polipéptido para su uso en un procedimiento para tratar trastornos cardiovasculares de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido es un polipéptido recombinante, el polipéptido recombinante producido en una cualquiera de células de bacteria, levadura, planta, insecto, aviar o de mamífero.
- 10 3. El polipéptido para su uso en un procedimiento para tratar trastornos cardiovasculares de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el trastorno cardiovascular comprende: aneurismas, angina, arritmia, aterosclerosis, arteriosclerosis, cardiomiopatía, enfermedad cerebrovascular, enfermedad cardíaca congénita, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad de las arterias coronarias, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, miocarditis, enfermedad de las válvulas, enfermedad de las arterias coronarias, cardiomiopatía dilatada, disfunción diastólica, endocarditis, hipertensión, cardiomiopatía hipertrófica, prolapso de la válvula mitral, ataque cardíaco, estenosis vascular o tromboembolismo venoso.
- 15 4. Una formulación para su uso en un procedimiento para tratar trastornos cardiovasculares, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un polipéptido y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que dicho polipéptido es capaz de estimular el eflujo de colesterol en células cargadas con lípido, y consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, en la que cada aminoácido X en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 es fenilalanina.
- 20 5. La formulación para su uso en un procedimiento para tratar trastornos cardiovasculares de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la composición farmacéutica se formula para su administración al sujeto mediante una vía seleccionada entre el grupo que consiste en: administración oral, administración nasal, administración rectal, inyección intraperitoneal, inyección intravascular, inyección subcutánea, administración transcutánea, administración mediante inhalación e inyección intramuscular.
- 25 6. La formulación para su uso en un procedimiento para tratar trastornos cardiovasculares de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la composición farmacéutica se formula como una formulación de dosificación unitaria.
7. La formulación para su uso en un procedimiento para tratar trastornos cardiovasculares de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la composición farmacéutica comprende una forma en polvo del polipéptido y un vehículo.
- 30 8. La formulación para su uso en un procedimiento para tratar trastornos cardiovasculares de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el vehículo comprende agua sin pirógenos estéril, tampón, solución de dextrosa.
9. La formulación para su uso en un procedimiento para tratar trastornos cardiovasculares de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la forma en polvo del polipéptido comprende polipéptido en polvo liofilizado.
- 35 10. La formulación para su uso en un procedimiento para tratar trastornos cardiovasculares de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la composición farmacéutica comprende materiales poliméricos, hidrófobos o resinas de intercambio iónico.
- 40 11. La formulación para su uso en un procedimiento para tratar trastornos cardiovasculares de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el trastorno cardiovascular comprende: aneurismas, angina, arritmia, aterosclerosis, arteriosclerosis, cardiomiopatía, enfermedad cerebrovascular, enfermedad cardíaca congénita, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad de las arterias coronarias, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, miocarditis, enfermedad de las válvulas, enfermedad de las arterias coronarias, cardiomiopatía dilatada, disfunción diastólica, endocarditis, hipertensión, cardiomiopatía hipertrófica, prolapso de la válvula mitral, ataque cardíaco, estenosis vascular o tromboembolismo venoso.
- 45 12. Una formulación para su uso en un procedimiento para tratar trastornos cardiovasculares, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende: un polipéptido de ApoA1 y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que dicho polipéptido de ApoA1 consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, en la que cada aminoácido X en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 es fenilalanina, y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente farmacológicamente activo adicional seleccionado entre el grupo que consiste en: un beta bloqueante, una combinación de beta bloqueante y diurético de tiazida, una estatina, aspirina, un inhibidor de ace, y un inhibidor de receptor de ace (ARB).
- 50 13. La formulación para su uso en un procedimiento para tratar trastornos cardiovasculares de acuerdo con la reivindicación 12, en la que el beta bloqueante comprende: acebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, metoprolol, carteolol, nadolol, penbutolol, pindolol, propranolol, timolol o labetalol, la estatina comprende pravastatina, simvastatina, lovastatina o atorvastatina cálcica; el inhibidor de ace comprende: captoprilo, benazeprilo, enalaprilo,
- 55

fosinopriilo, lisinopriilo, quinapriilo, ramipriilo, imidapriilo, perindopril erbumina o trandolapriilo, y el inhibidor de receptor de ace comprende: losartán, irbesartán, candesartán o valsartán.

- 5 14. La formulación para su uso en un procedimiento para tratar trastornos cardiovasculares de acuerdo con la reivindicación 12, en la que el al menos un agente farmacológicamente activo adicional se administra al sujeto de forma simultánea o de forma secuencial a la administración del polipéptido.

Figura 1





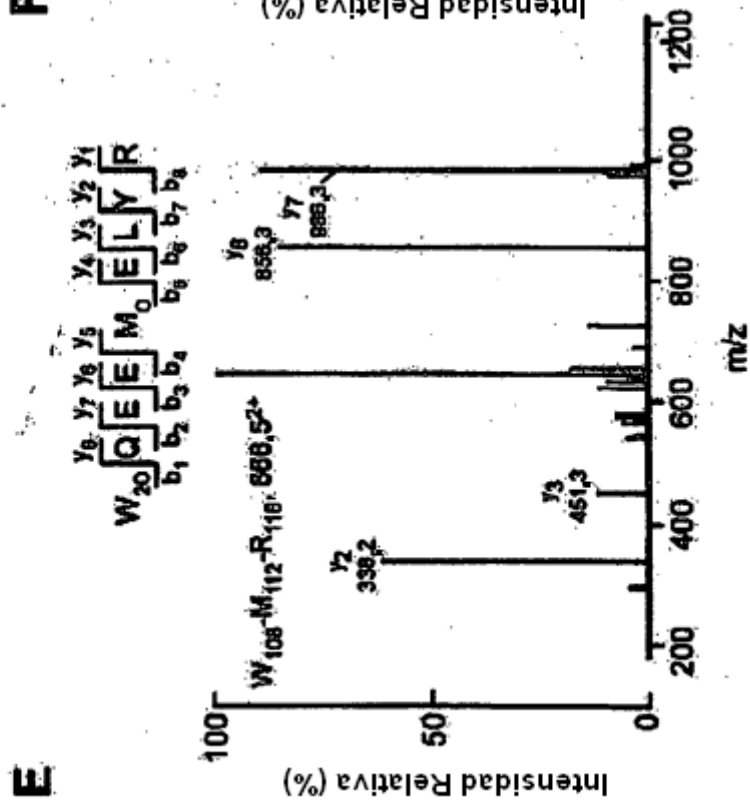
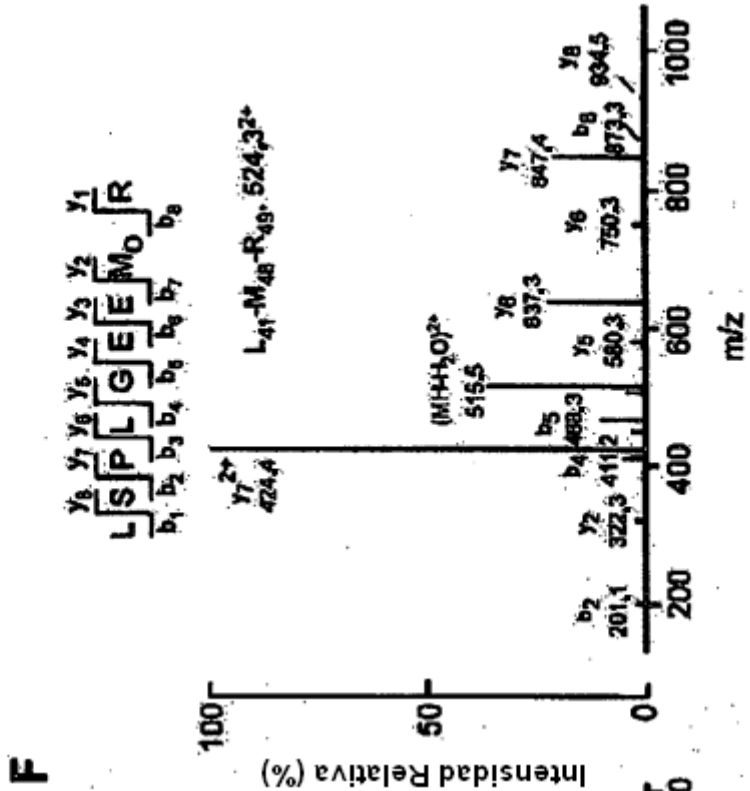


Figura 2

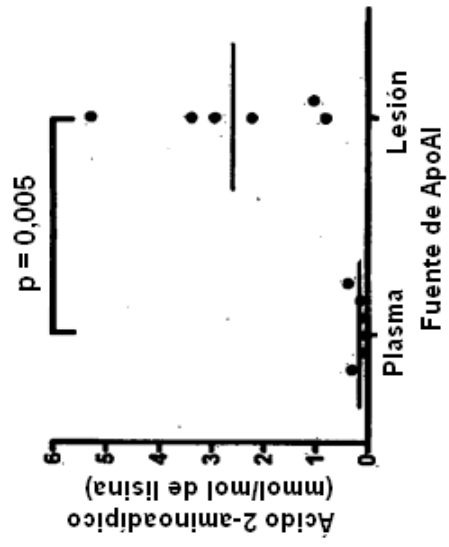




Figura 3

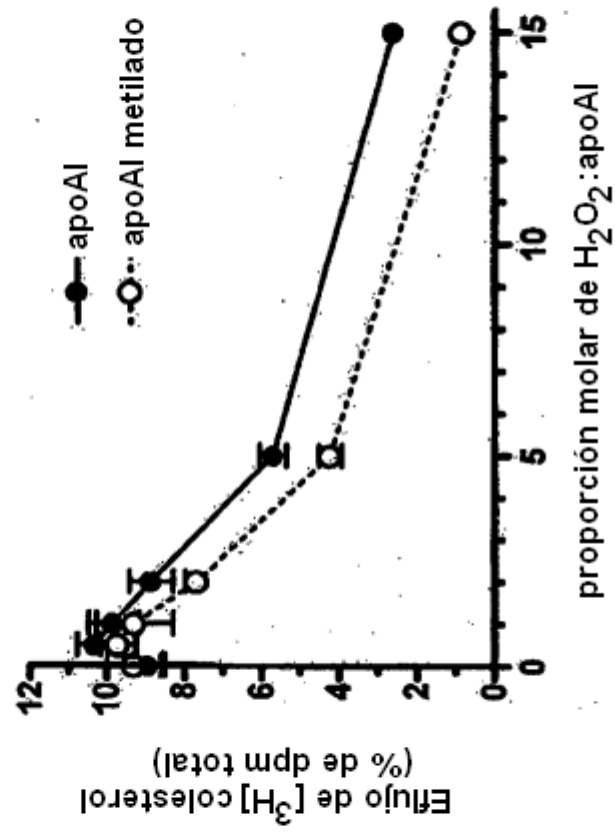


Figura 4

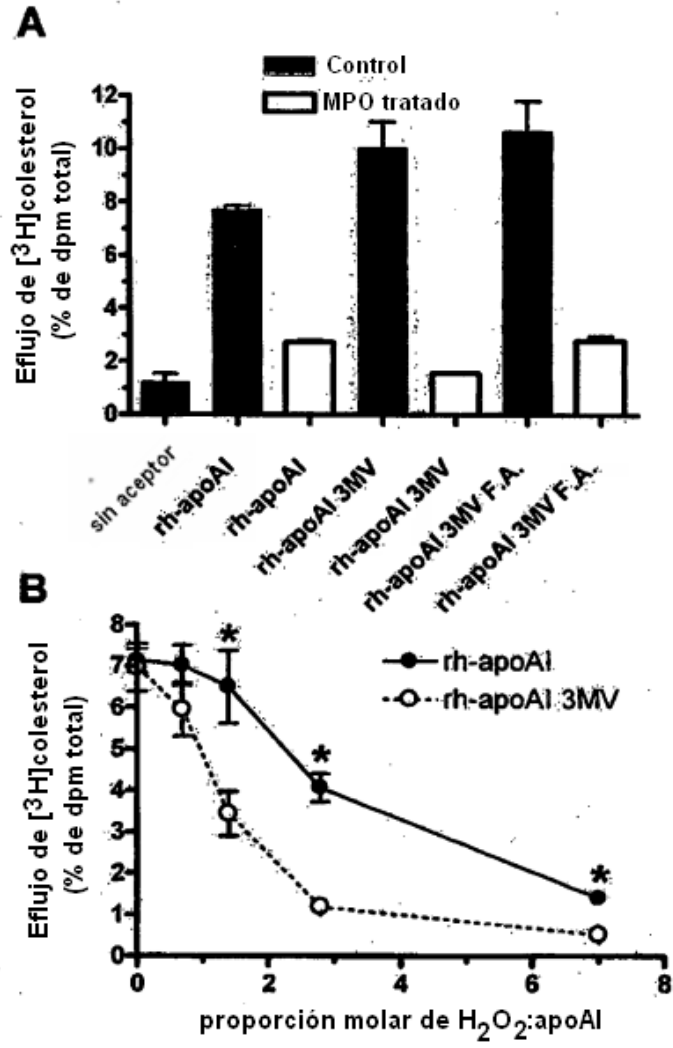


Figura 5

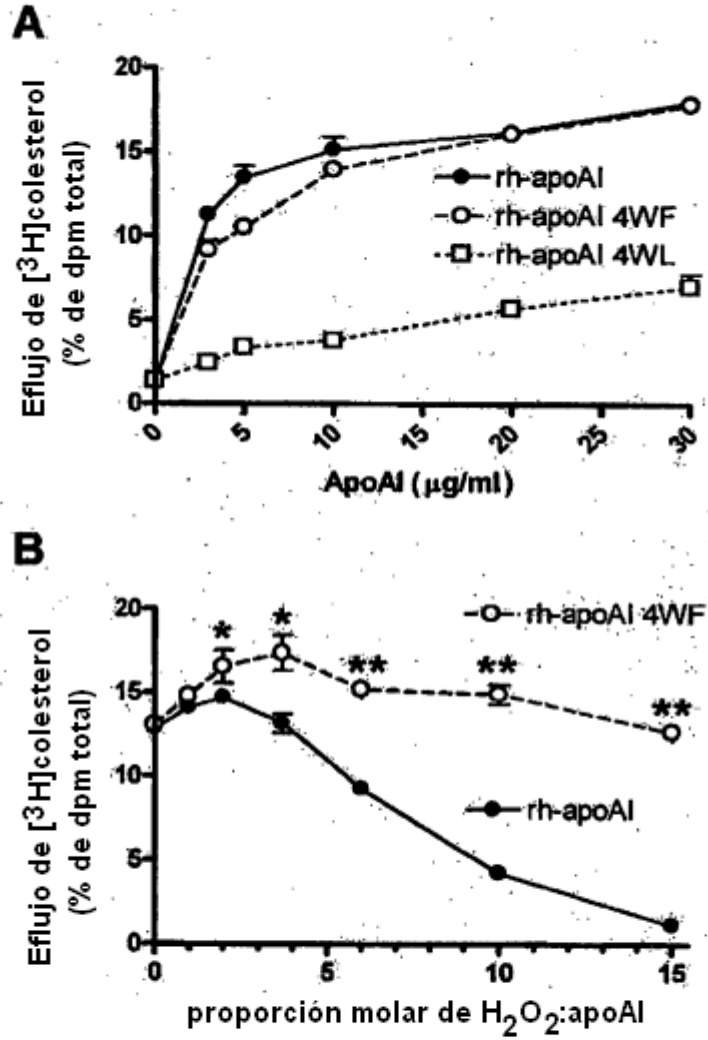


Figura 6

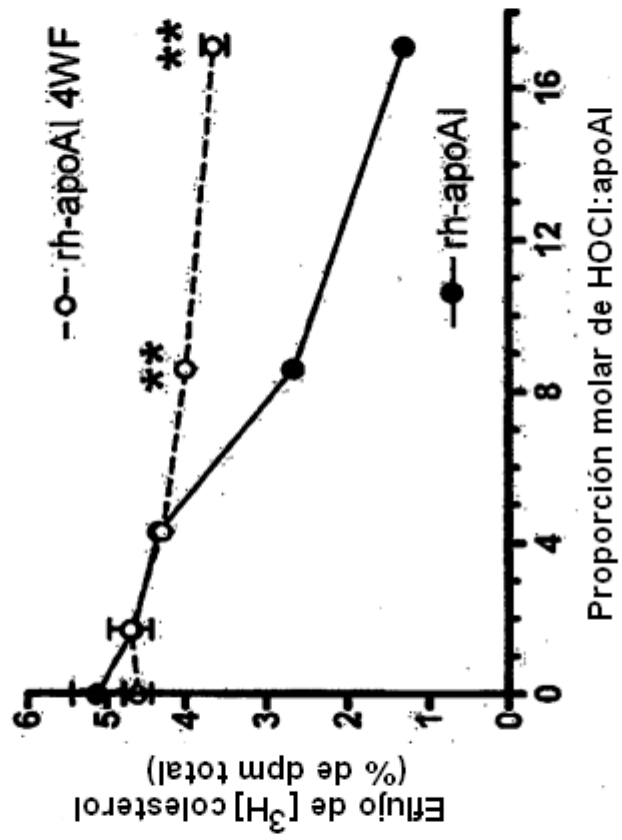


Figura 7

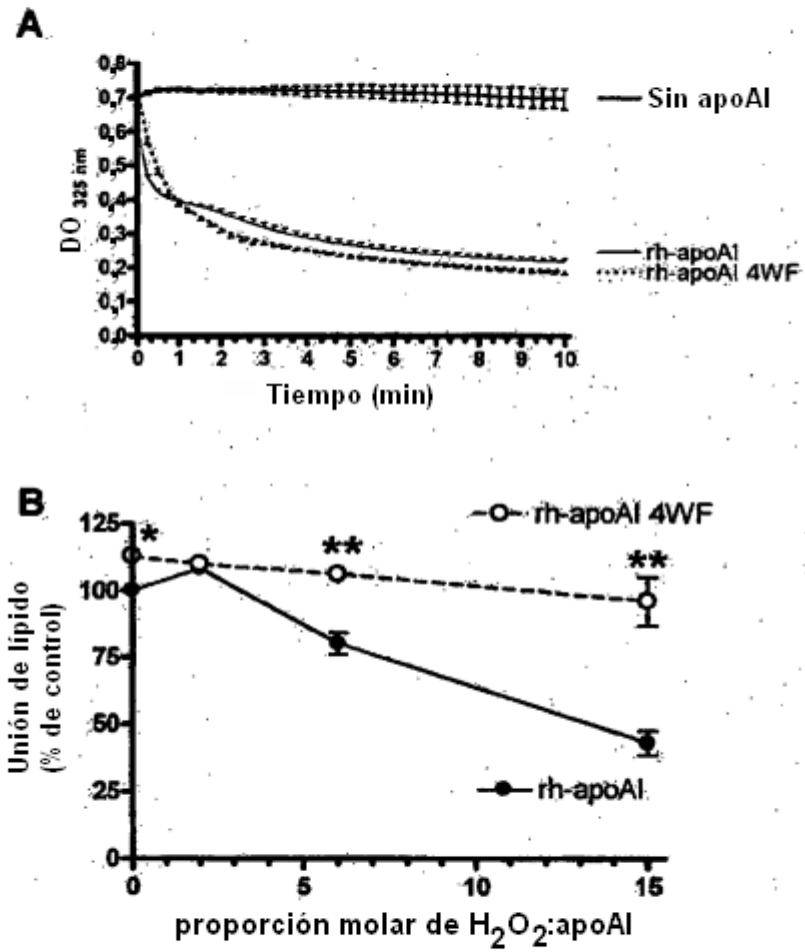


Figura 8

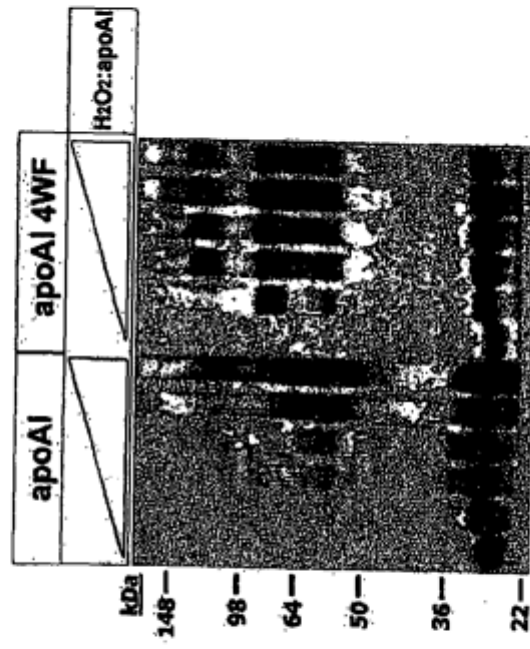


Figura 9

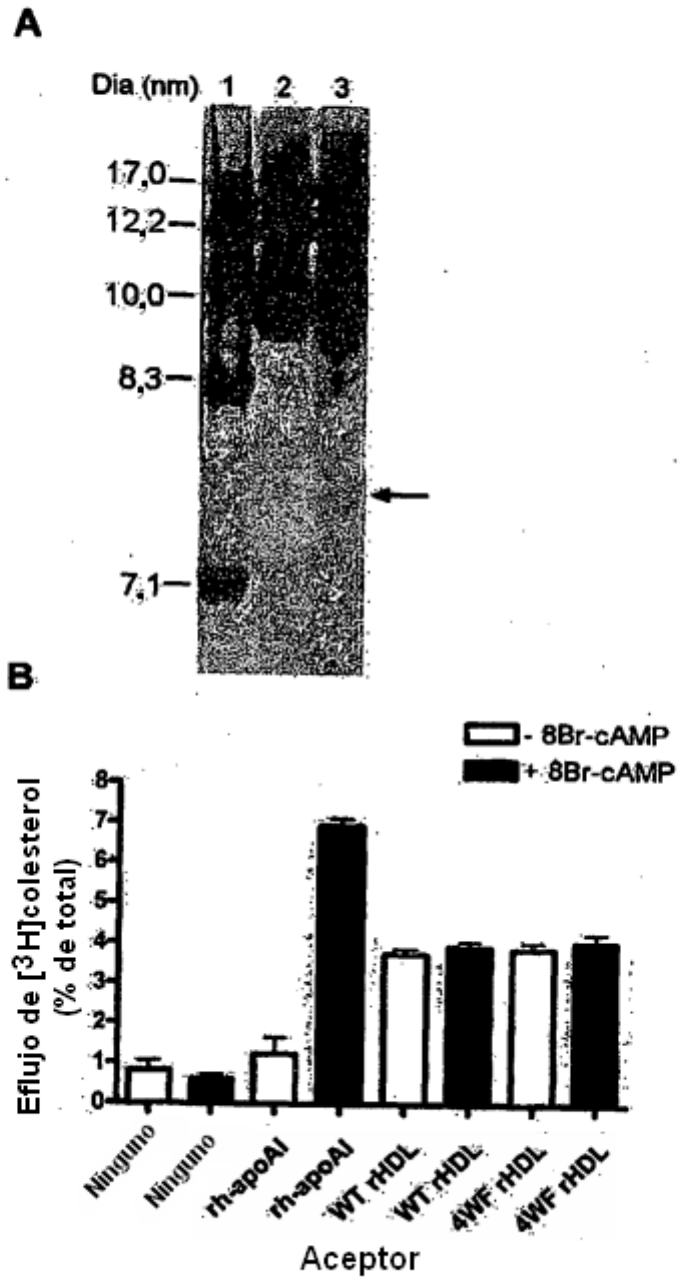


Figura 10

