

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 359**

51 Int. Cl.:

A01H 5/00 (2008.01)
C07K 7/08 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 14/775 (2006.01)
A23L 33/00 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2013 PCT/US2013/031037**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13148214**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2013 E 13769821 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2830414**

54 Título: **Modulación de enfermedad por ingeniería genética de plantas**

30 Prioridad:

31.03.2012 US 201261618753 P
19.10.2012 US 201261716322 P
07.03.2013 US 201313789513

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.02.2020

73 Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607-5200, US

72 Inventor/es:

FOGELMAN, ALAN, M.;
REDDY, SRINIVASA, T. y
NAVAB, MOHAMAD

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Nuria

ES 2 741 359 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

Modulación de enfermedad por ingeniería genética de plantas

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica beneficio y prioridad para USSN 13/789.513, presentado el 7 de marzo, 2013, por USSN 61/618.753, presentado el 31 de marzo, 2012, y para USSN 61/716.322, presentado el 19 de octubre, 2012.

10 SOPORTE

Esta invención se realizó con el apoyo del Gobierno de Subsidios de Investigación HL-30568, HL-34343 otorgado por el Servicio de Salud Pública de Estados Unidos. El Gobierno tiene ciertos derechos en esta invención.

15 Antecedentes

La lipoproteína de alta densidad (HDL), su proteína principal, apolipoproteína A-I (apoA-I) y miméticos de apoA-I han demostrado en varios laboratorios que reducen la inflamación en modelos animales de enfermedad (Getz y Reardon (2011) *J. Inflamm. Res.* 4: 83-92; Navab *et al.* (2012) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32: 2553-2560; Degoma y Rader (2011) *Nat. Rev. Cardiol.* 8:266-277; Yao *et al.* (2012) *Front. Pharmacol.*, 3: 37; Navab *et al.* (2010) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30: 164-168).

En particular, el uso de tales péptidos miméticos de ApoA-I como 4F para modular enfermedades se ha demostrado en una amplia variedad de contextos que incluyen, pero no limitados a modelos animales de artritis (Charles-Schoeman (2008) *Clin. Immunol.* 127:234-244) asma (Nandedkar *et al.* (2011) *J. Lipid Res.*, 52:499-508) aterosclerosis (Navab *et al.* (2011) *J. Lipid Res.* 52: 1200-1210), enfermedad de Alzheimer (Handattu *et al.* (2009) *Neurobiol. Dis.* 34: 525-534), cáncer (Su *et al.* (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 107:19997-20002; Gao *et al.* (2011) *Integr. Biol. (Camb)*. 3:479-489; Ganapathy *et al.* (2012) *Int. J. Cancer*, 130:1071-1081), diabetes (Morgantini *et al.* (2010) *Diabetes*. 59: 3223-3228), fibrosis hepática (DeLeve *et al.* (2008) *Am. J. Pathol.* 173: 993-1001), enfermedad renal (Vaziri *et al.* (2009) *Kidney Int.* 76: 437-444; Vaziri *et al.* (2010) *Nephrol. Dial. Transplant.* 25: 3525-3534), obesidad (Peterson *et al.* (2009) *J. Lipid Res.* 50: 1293-1304), osteoporosis (Sage *et al.* (2011) *J. Bone Miner. Res.* 26: 1197-1206), esclerodermia (Weihsrauch *et al.* (2007) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293: H1432-H1441), lupus eritematoso sistémico (Woo *et al.* (2010) *Arthritis Res. Ther.*, 12: R93), vasculopatía de trasplante (Hsieh *et al.* (2007) *Transplantation* 27: 84: 238-243), y demencia vascular (Buga *et al.* (2006) *J. Lipid Res.* 47: 2148-2160). Así, el beneficio potencial de tales péptidos es grande.

El péptido mimético 4F de apoA-I mostró una gran promesa en una variedad de modelos de enfermedad de ratones (Navab *et al.* (2010) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30:164-168) que condujo a un estudio de fase I/II en seres humanos con enfermedad cardiovascular de alto riesgo (Bloedon *et al.* (2008) *J. Lipid Res.* 49: 1344-1352). En este estudio el péptido 4F sintetizado a partir de todos los D-aminoácidos (D-4F) se administró por vía oral a dosis que oscilaron entre 0,43 y 7,14 mg/kg. Los niveles de péptidos en plasma resultantes fueron bajos (C_{máx} 15,9 ± 6,5 ng/ml). A pesar de estos niveles plasmáticos muy bajos, las dosis de 4,3 y 7,14 mg/kg mejoraron significativamente el índice inflamatorio de HDL (I/II), que es una medida de la capacidad de un ensayo de HDL para inhibir la producción de proteína 1 quimioatrayente de monocitos inducida por LDL (MCP-1) por células de la pared arterial humana cultivadas; dosis de 0,43 y 1,43 mg/kg no fueron eficaces (*Id.*). Un segundo ensayo clínico se centró en lograr altos niveles de péptidos en plasma utilizando dosis bajas (0,042-1,43 mg/kg) del péptido 4F sintetizado a partir de todos los L-aminoácidos (L-4F) administrados por vía intravenosa (IV) o subcutánea (SQ) (Watson *et al.* (2011) *J. Lipid Res.* 52: 361-373). De hecho se lograron niveles muy altos en plasma (por ejemplo, C_{máx} 3.255 ± 630 ng/ml en el estudio IV), pero no hubo mejoría en HII (*Id.*).

Para resolver esta paradoja, se realizaron nuevos estudios en ratones que llevaron al sorprendente descubrimiento de que el principal sitio de acción para el péptido puede estar en el intestino, incluso cuando se administra el péptido SQ (Navab *et al.* (2011) *J. Lipid Res.* 52:1200-1210). Además, la dosis administrada, no el nivel en plasma, fue el principal determinante de eficacia (*Id.*). La eficacia fue la misma a la misma dosis cuando se administró el péptido por vía oral o SQ lo que sugiere que en el compartimento que controla la eficacia del péptido, las concentraciones de péptidos deberían ser similares; la concentración de péptidos fue similar solo en las heces (*Id.*). En un estudio posterior, este compartimiento fue identificado además como el intestino delgado (Navab *et al.* (2012) *J. Lipid Res.* 53:437-445). Además, se encontró que los metabolitos de los ácidos araquidónico y linoleico en los enterocitos del intestino delgado son ~ 10 veces más altos que en el hígado, pero el porcentaje de reducción en estos metabolitos después de la administración oral del péptido 4F fue significativamente mayor en el hígado en comparación con el intestino delgado lo que sugiere que el intestino delgado es un sitio importante para la acción del péptido (*Id.*). Como resultado de estos estudios (Navab *et al.* (2011) *J. Lipid Res.* 52: 1200-1210; Navab *et al.* (2012) *J. Lipid Res.* 53: 437-445), se llegó a la conclusión de que se necesitarían dosis de péptido entre 40 y 100 mg/kg/día en lugar de dosis de 0,42 a 1,43 mg/kg/día, como se utilizó en los estudios de Watson *et al.* (Watson *et al.* (2011) *J. Lipid Res.* 52: 361-373).

El péptido 4F (Ac-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH₂, (SEQ ID NO: 1)) tiene grupos de bloqueo terminal

(Ac- y -NH₂) que estabilizan la hélice anfipática de clase A y aumentan dramáticamente la eficacia (Venkatachalapathi *et al.* (1993) *Proteins Structure Function Genet.* 15: 349-359; Yancey *et al.* (1995) *Biochemistry.* 34: 7955-7965; Datta *et al.* (2001) *J. Lipid Res.* 42:1096-1104; Anantharamaiah *et al.* (2007) *J. Lipid Res.*, 48:1915-1923). En estudios no publicados en ratones, se encontró que en ausencia de estos grupos finales el péptido 4F es 25.000 veces menos eficaz *in vivo*. Los grupos terminales (protección) requeridos para 4F y para una serie de otros péptidos miméticos de apoA-I (Navab *et al.* (2010) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30: 164-168) solo se pueden añadir por síntesis química; los organismos vivos no pueden ser diseñados para hacer una molécula que contenga estos grupos finales. Así, la producción de péptido para uso clínico a estas dosis no sería práctica debido al coste de producir esta cantidad de péptido por síntesis en fase sólida.

El documento WO2008/017906 A1 se refiere a un método para producir apolipoproteínas en plantas de arroz transgénicas. El documento WO2011/159771 A2 se refiere a un método para tratar el cáncer en un sujeto usando apolipoproteína A1 (ApoA1). El documento US2005/172359 A1 se refiere a métodos para producir apolipoproteínas en plantas transgénicas.

Sumario

En el presente documento se describen plantas transgénicas que comprenden células que expresan un péptido uno o más dominios que comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos de una apolipoproteína o un péptido mimético de la apolipoproteína (por ejemplo, un péptido que comprende o consiste en una o más copias de una secuencia de aminoácidos de una apolipoproteína o péptido mimético de apolipoproteína, por ejemplo, como se describe en el presente documento). Como se describe la planta transgénica o una parte de la misma y/o el péptido tiene actividad biológica (por ejemplo, disminuye los niveles plasmáticos de SAA, y/o aumenta la actividad de la paraoxonasa, y/o reduce los niveles de ácido lisofosfatídico, y/o reduce los niveles de metabolitos de ácidos araquidónico y linoleico, y/o mejora el índice inflamatorio de HDL, y/o inhibe la quimiotaxis de monocitos inducida por LDL en cultivo, *etc.*). A este respecto la presente invención proporciona una planta de tomate transgénica de acuerdo con la reivindicación 1. El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones. Cualquier materia objeto descrita en el presente documento que cae fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo con fines informativos.

En ciertas realizaciones el péptido expresado en la planta de tomate transgénica comprende un dominio que comprende la secuencia de aminoácidos de la apolipoproteína o péptido mimético de la apolipoproteína). En ciertas realizaciones el péptido expresado en la planta de tomate transgénica comprende al menos dos dominios que comprenden la secuencia de aminoácidos de la apolipoproteína o el péptido mimético de la apolipoproteína. En el presente documento se describen secuencias de aminoácidos que comprenden una secuencia de aminoácidos mimética de ApoA-I y/o una secuencia de aminoácidos peptídica G*, y/o una secuencia de péptidos ApoE. En particular las secuencias de aminoácidos de este tipo se presentan en la Tabla 1, la Tabla 2 o la Tabla 3. En el presente documento se describen las secuencias de aminoácidos DWLKAIFYDKFFEKFEFF (6F, SEQ ID NO: 17), FFEKFEFFKDYFAKLWD (rev6F, SEQ ID NO: 25), DWFKAFYDKVAEKFEAF (4F, SEQ ID NO: 15), FAEKFEAVKDYFAKFWD (rev4F, SEQ ID NO: 23), LLEQLNEQFNWVSRLANL (SEQ ID NO:609) y LVGRQLEEFL (SEQ ID NO:612). La planta de tomate transgénica reivindicada comprende la secuencia amino DWLKAIFYDKFFEKFEFF (6F, SEQ ID NO: 17). Este péptido es eficaz para disminuir los niveles plasmáticos de ácido lisofosfatídico (LPA) en un mamífero, y/o para disminuir los niveles de SAA en el mamífero, y/o para aumentar la actividad de la paraoxonasa plasmática en el mamífero cuando se alimenta al mamífero sin una purificación sustancial de la planta transgénica. El péptido es eficaz para disminuir los niveles plasmáticos de ácido lisofosfatídico (LPA) en un mamífero cuando el mamífero se alimenta con al menos una parte de la planta (por ejemplo, solo o como componente de un alimento, suplemento alimenticio, y/o dieta). El péptido es eficaz para disminuir significativamente los niveles de SAA en un modelo de aterosclerosis en ratones cuando se alimenta al ratón con al menos una parte de la planta. El péptido es eficaz para aumentar la actividad de la paraoxonasa en plasma en un mamífero, cuando el mamífero se alimenta con al menos una parte de la planta. En ciertas realizaciones el péptido se expresa mediante un constructo de ácido nucleico integrado de manera estable en el genoma de la planta. En ciertas realizaciones la planta se transforma por un agrobacterium que comprende un constructo que codifica el péptido. Al menos una parte de la planta de tomate es comestible. En ciertas realizaciones al menos una parte de la planta de tomate, cuando se procesa es comestible. Otras plantas transgénicas descritas en el presente documento incluyen: arroz, tabaco, nabo, maíz, maíz, soja, uva, manzana, pera, ciruela, melocotón, naranja, kiwi, payaya, piña, guayaba, lilkoi, fruta estrella, lichi, mango, granada, higo, ciruela, patata, zanahoria, hojas de mostaza, acelga, kale, lechuga, brócoli, y semillas de cártamo. En la presente invención, al menos la parte frontal de la planta de tomate está seca o liofilizada, y/o molida. En ciertas realizaciones, toda la planta se seca o se liofiliza, y/o se muele.

En diversas realizaciones se proporciona una semilla de la planta de tomate transgénica (por ejemplo, una planta que expresa un péptido que comprende o consiste en un dominio de apolipoproteína como se describe en el presente documento) (por ejemplo, una semilla que expresa/contiene un péptido expresado de forma recombinante que comprende o consiste en una o más copias de una secuencia de aminoácidos de una apolipoproteína o un péptido mimético de apolipoproteína, por ejemplo, como se describe en el presente documento). En ciertas realizaciones la semilla es capaz de generar una planta de tomate transgénica como se describe en el presente documento cuando se cultiva. En ciertas realizaciones cuando un mamífero se alimenta con la semilla en una cantidad eficaz es eficaz

para disminuir los niveles plasmáticos de ácido liofosfatídico (LPA) en un mamífero, y/o para disminuir los niveles de SAA en el mamífero, y/o para aumentar la actividad de la paraoxonasa plasmática en el mamífero

5 En la presente invención se proporciona el fruto de la planta de tomate transgénica (por ejemplo, una planta que expresa un péptido que comprende o consiste en un dominio de apolipoproteína como se describe en el presente documento) (por ejemplo, un fruto que expresa/contiene un péptido expresado de forma recombinante que comprende o consiste en una o más copias de una secuencia de aminoácidos de una apolipoproteína o un péptido mimético de apolipoproteína, por ejemplo, como se describe en el presente documento). En ciertas realizaciones la fruta es una fruta fresca,, mientras que, en otras realizaciones, la fruta es una fruta seca y/o procesada. En ciertas realizaciones el
10 fruto es un tomate, una manzana, un melocotón, una pera, o una ciruela. En ciertas realizaciones cuando un mamífero se alimenta con la fruta en una cantidad eficaz es eficaz para disminuir los niveles plasmáticos de ácido liofosfatídico (LPA) en un mamífero, y/o para disminuir los niveles de SAA en el mamífero, y/o para aumentar la actividad de la paraoxonasa plasmática en el mamífero.

15 En varias realizaciones se proporciona una hoja de la planta de tomate transgénica (por ejemplo, una planta que expresa un péptido que comprende o consiste en un dominio de apolipoproteína como se describe en el presente documento) (por ejemplo, una hoja que expresa/contiene un péptido expresado de forma recombinante que comprende o consiste en una o más copias de una secuencia de aminoácidos de una apolipoproteína o un péptido mimético de apolipoproteína, por ejemplo, como se describe en el presente documento). En ciertas realizaciones
20 cuando un mamífero se alimenta con la hoja en una cantidad eficaz es eficaz para disminuir los niveles plasmáticos de ácido liofosfatídico (LPA) en un mamífero, y/o para disminuir los niveles de SAA es el mamífero, y/o para aumentar la actividad de la paraoxonasa plasmática en el mamífero

25 En diversas realizaciones se proporciona una raíz o tubérculo de la planta de tomate transgénica (por ejemplo, una planta que expresa un péptido que comprende o consiste en un dominio de apolipoproteína como se describe en el presente documento) (por ejemplo, una raíz o tubérculo que expresa/contiene un péptido expresado de forma recombinante que comprende o consiste en una o más copias de una secuencia de aminoácidos de una apolipoproteína o un péptido mimético de apolipoproteína, por ejemplo, como se describe en el presente documento). En ciertas realizaciones cuando un mamífero se alimenta con la raíz o el tubérculo en una cantidad eficaz es eficaz
30 para disminuir los niveles plasmáticos de ácido liofosfatídico (LPA) en un mamífero, y/o para disminuir los niveles de SAA es el mamífero, y/o para aumentar la actividad de paraoxonasa plasmática en el mamífero.

35 En el presente documento se describe un corte de una planta transgénica (por ejemplo, se proporciona una planta que expresa un péptido que comprende o consiste en un dominio de apolipoproteína como se describe en el presente documento) (por ejemplo, un corte que expresa/contiene un péptido expresado de forma recombinante que comprende o consiste en uno o más copias de una secuencia de aminoácidos de una apolipoproteína o un péptido mimético de apolipoproteína, por ejemplo, como se describe en el presente documento). En ciertas realizaciones el corte es capaz de generar una planta transgénica como se describe en el presente documento cuando se propaga o genera al menos una parte de una planta que es transgénica cuando se injerta en una planta hospedadora. En ciertas realizaciones el
40 tejido generado a partir del corte, cuando se alimenta a un mamífero en una cantidad eficaz, es eficaz para disminuir los niveles plasmáticos de ácido liofosfatídico (LPA) en un mamífero, y/o para disminuir los niveles de SAA en el mamífero, y/o para aumentar la actividad de la paraoxonasa en plasma en el mamífero.

45 En el presente documento se describe un clon de una planta transgénica (por ejemplo, se proporciona una planta que expresa un péptido que comprende o consiste en un dominio de apolipoproteína como se describe en el presente documento) (por ejemplo, un clon que expresa/contiene un péptido expresado de forma recombinante que comprende o consiste en uno o más copias de una secuencia de aminoácidos de una apolipoproteína o un péptido mimético de apolipoproteína, por ejemplo, como se describe en el presente documento).

50 En los ejemplos descritos la planta transgénica, semilla, frutos, raíz y/o tubérculo, corte, clon, u otros componentes y/o células, y/o tejidos de la planta no expresan ApoA-I y/o no expresan ApoA-I Milano, y/o no expresan una proteína que comprende ApoA-I, y/o ApoA-I Milano.

55 En el presente documento se describe un péptido que se proporciona cuando el péptido se expresa en una planta en donde al menos un dominio del péptido comprende un mimético de apolipoproteína y en donde ni el péptido ni su dominio comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos de ApoA-I o apoA-I milano. Como se describe, el péptido comprende un dominio que comprende la secuencia de aminoácidos del péptido mimético de la apolipoproteína. Como también se describe el péptido comprende al menos dos dominios que comprenden la secuencia de aminoácidos del péptido mimético de la apolipoproteína. Como se describe la secuencia de aminoácidos del péptido (o su dominio) comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la Tabla 1, la Tabla 2, o la Tabla 3. En el presente documento se describen las secuencias de aminoácidos DWLKAFYDKFFEKFEFF (6F, SEQ ID NO: 17), FFEKFEFFKDYFAKLWD (rev6F, SEQ ID NO: 25), DWFKAFYDKVAEKFEAF (4F, SEQ ID NO: 15), FAEKFEAVKDYFAKFWD (rev4F, SEQ ID NO: 23), LLEQLNEQFNWVSRANL (SEQ ID NO:609), y LVGRQLEEF (SEQ ID NO: 612). En la invención reivindicada la secuencia de aminoácidos comprende la secuencia amino
60 DWLKAFYDKFFEKFEFF (6F, SEQ ID NO: 17). Este péptido es eficaz para disminuir los niveles plasmáticos de ácido liofosfatídico (LPA) en un mamífero, y/o para disminuir los niveles de SAA en el mamífero, y/o para aumentar la

actividad de paraoxonasa plasmática en el mamífero cuando se alimenta al mamífero. El péptido está presente en un tejido de la planta. El péptido es eficaz para disminuir los niveles plasmáticos de ácido liofosfatídico (LPA) en un mamífero cuando se alimenta al mamífero sin un aislamiento sustancial de los tejidos de la planta. El péptido es eficaz para disminuir significativamente los niveles de SAA en un modelo de aterosclerosis en ratones cuando se alimenta al ratón sin un aislamiento sustancial de los tejidos de la planta. El péptido es eficaz para aumentar la actividad de la paraoxonasa en plasma en un mamífero, cuando se alimenta al mamífero sin aislamiento sustancial de los tejidos de la planta. El péptido se expresa mediante un constructo de ácido nucleico integrado de manera estable en el genoma de la planta. Al menos una parte de la planta es comestible. En ciertas realizaciones al menos una parte de la planta, cuando se procesa es comestible. En la presente invención el péptido se expresa en un tomate. En ciertas realizaciones el péptido está contenido en un tejido de una planta seca y/o liofilizada y/o una planta molida. En ciertas realizaciones el péptido se almacena en una semilla y fruto de la planta. En ciertas realizaciones el péptido se purifica.

En varias realizaciones se proporciona un alimento en donde el alimento comprende al menos una parte de la planta de tomate transgénica (por ejemplo, una planta que expresa un péptido que comprende o consiste en un dominio de apolipoproteína como se describe en el presente documento) capaz de ingerirse por su valor nutricional. En ciertas realizaciones el alimento es un componente de una dieta optimizada para un mamífero para el tratamiento y/o profilaxis de la aterosclerosis. En ciertas realizaciones el alimento es un componente de una dieta optimizada para un mamífero para el tratamiento y/o profilaxis de una patología caracterizada por una respuesta inflamatoria. En ciertas realizaciones el alimento es un componente de una dieta optimizada para un mamífero para el tratamiento y/o profilaxis de un cáncer. En ciertas realizaciones la dieta proporciona los requisitos nutricionales de un ser humano. En ciertas realizaciones la dieta es una dieta fija preparada para un ser humano. En ciertas realizaciones la dieta proporciona los requisitos nutricionales de un mamífero no humano. En ciertas realizaciones la dieta proporciona requisitos nutricionales de un mamífero no humano seleccionado entre el grupo que consiste en un canino, un felino, un equino, un porcino, un bovino, y un lagomorfo. En ciertas realizaciones la dieta proporciona los requisitos nutricionales de un canino. En ciertas realizaciones la dieta es un alimento para animales preenvasado, o un alimento o comida para seres humanos preenvasado. En ciertas realizaciones la dieta es una dieta fija preparada para el mamífero no humano. La parte de la planta de la comida incluye el fruto de la planta de tomate transgénica y posiblemente también las hojas de la planta, vástagos, raíces, y semillas.

En diversas realizaciones se proporciona una proteína en polvo en donde al menos una parte de la proteína en polvo comprende una apolipoproteína o un péptido mimético de la apolipoproteína o un péptido que comprende una apolipoproteína o un dominio mimético de la apolipoproteína como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones el resto de la proteína en polvo comprende una proteína derivada de una planta. En ciertas realizaciones la proteína derivada de la planta comprende una proteína derivada de una planta seleccionada entre el grupo que consiste en soja, y cáñamo. En ciertas realizaciones el resto del polvo de proteína comprende un polvo de proteína derivado de animales (por ejemplo, un polvo de proteína derivado de leche o huevos).

En diversas realizaciones se proporciona un suplemento nutricional. El suplemento nutricional comprende típicamente la planta de tomate transgénica (por ejemplo, una planta que expresa un péptido que comprende o consiste en un dominio de apolipoproteína, un dominio mimético de la apolipoproteína, una apolipoproteína, o un mimético de apolipoproteína, por ejemplo, como se describe en el presente documento), y/o una parte de la planta; y/o una apolipoproteína o un péptido mimético de apolipoproteína de acuerdo con uno cualquiera de los descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones el suplemento nutricional comprende además uno o más suplementos vitamínicos (por ejemplo, uno o suplementos de ácidos grasos omega 3, y/o uno o más antioxidantes dietéticos, y/o una o más vitaminas (por ejemplo, vitaminas B, vitamina C, la vitamina D, vitamina E, y similares).

En el presente documento también se describen métodos para el tratamiento o profilaxis de una patología caracterizada por una respuesta inflamatoria. Los métodos típicamente implican administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad eficaz de al menos una parte de una planta transgénica como se describe en el presente documento; y/o una apolipoproteína o péptido mimético de apolipoproteína como se describe en el presente documento; y/o un alimento como se describe en el presente documento; y/o una proteína en polvo como se describe en el presente documento; y/o un suplemento nutricional y/o una barra de proteína/barra en polvo como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones al mamífero se le administra al menos una parte de una planta transgénica como se describe en el presente documento. En ciertos ejemplos descritos la planta transgénica expresa un péptido 6F o un péptido que comprende un dominio 6F. En ciertas realizaciones la patología es aterosclerosis. En ciertas realizaciones al mamífero se le diagnostica aterosclerosis y la administración comprende administrar una cantidad suficiente de la planta, y/o péptido, y/o alimento, y/o proteína en polvo y/o suplemento nutricional para mejorar uno o más síntomas de aterosclerosis y/o para reducir uno o más marcadores de una patología aterosclerótica. En ciertas realizaciones el mamífero está en riesgo de aterosclerosis y la administración comprende administrar una cantidad suficiente de la planta, y/o péptido, y/o alimento, y/o proteína en polvo, y/o suplemento nutricional para reducir el riesgo de aterosclerosis, y/o para mejorar un marcador de riesgo para la aterosclerosis, y/o para retardar la progresión de la aterosclerosis. En ciertos ejemplos descritos el marcador de riesgo es HDL/IDL, CRP, triglicéridos, SAA, actividad de paraoxonasa, Lp(a), LDL oxidado o anticuerpos para LDL oxidado, o sPLA₂. En ciertos ejemplos descritos la patología es degeneración macular. En ciertas realizaciones la patología es cáncer (por ejemplo, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de cerebro, y similares). En ciertos ejemplos descritos la planta, una parte de la planta y/o un extracto de la planta y/o el péptido descrito en el presente documento

se aplica tópicamente a un cáncer de piel (por ejemplo, un melanoma, un carcinoma, *etc.*). En ciertos ejemplos descritos la planta, parte de la planta, y/o extracto de la misma se administra solo, en combinación con un excipiente, o en combinación con otro agente anticáncer tópico (por ejemplo, 5FU, imiquimod). En ciertos ejemplos descritos la parte de la planta o la planta, y/o el péptido, y/o el alimento, y/o la proteína en polvo y/o el suplemento nutricional se administran en una cantidad suficiente para reducir los niveles de ácido liofosfatídico (LPA) en el mamífero. En ciertas realizaciones el mamífero es un ser humano. En ciertas realizaciones el mamífero es un mamífero no humano (por ejemplo, un canino, un felino, un equino, un porcino, un bovino, un largomorfo, y similares). En ciertos ejemplos descritos al mamífero se le administra al menos una parte de una planta transgénica que expresa un péptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la Tabla 1, la Tabla 2 o la Tabla 3. En ciertos ejemplos descritos la secuencia de aminoácidos comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en DWLKAFYDKFFEKFKFEFF (6F, SEQ ID NO: 17), FFEKFKFEFFKDYFAKLWD (rev6F, SEQ ID NO: 25), DWFKAFYDKVAEKFKKEAF (4F, SEQ ID NO: 15), FAEKFKKEAVKDYFAKFWD (rev4F, SEQ ID NO: 23), LLEQLNEQFNWVSRANL (SEQ ID NO:609), y LVGRQLEEF (SEQ ID NO: 612). En la invención reivindicada la secuencia de aminoácidos comprende la secuencia amino DWLKAFYDKFFEKFKFEFF (6F, SEQ ID NO: 17). En ciertos ejemplos descritos al mamífero se le administra al menos una parte de un tomate transgénico que comprende células que expresan un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos DWLKAFYDKFFEKFKFEFF (6F, SEQ ID NO: 17). En ciertos ejemplos descritos el péptido no se purifica sustancialmente a partir de tejido del tomate. En la invención reivindicada la planta (por ejemplo, el tomate) se seca y/o liofiliza.

En ciertos ejemplos descritos se proporciona un método para prevenir o reducir la absorción de uno o más componentes de microlípidos proinflamatorios de la dieta en un mamífero, en donde el método comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de al menos una parte de una planta transgénica como se describe y/o reivindica en el presente documento; y/o una apolipoproteína o un péptido mimético de apolipoproteína de acuerdo con lo descrito y/o reivindicado en el presente documento; y/o un alimento o ingrediente alimentario como se describe y/o se reivindica en el presente documento; y/o una proteína en polvo como se describe y/o se reivindica en el presente documento; y/o un suplemento nutricional como se describe y/o se reivindica en el presente documento. En ciertas realizaciones al mamífero se le administra al menos una parte de una planta transgénica como se describe y/o se reivindica en el presente documento. En ciertos ejemplos al mamífero se le administra una fruta o parte de una fruta de la planta transgénica. En ciertos ejemplos descritos la fruta se selecciona entre el grupo que consiste en un tomate, una manzana, una pera, una ciruela, un melocotón, una naranja, un kiwi, una payaya, una piña, una guayaba, un liliroi, una fruta de estrella, un lichi, un mango, una granada, y una ciruela. En la presente invención el fruto es un tomate. En ciertos ejemplos descritos al mamífero se le administra un péptido como se describe y/o se reivindica en el presente documento. En ciertos ejemplos descritos al mamífero se le administra un alimento como se describe y/o se reivindica en el presente documento. En ciertos ejemplos el mamífero tiene o está en riesgo de aterosclerosis. En ciertos ejemplos el mamífero es diagnosticado con aterosclerosis. En ciertos ejemplos se determina que el mamífero está en riesgo de aterosclerosis. En ciertos ejemplos se determina que el mamífero está en riesgo mediante la medición de un marcador seleccionado entre el grupo que consiste en HDL/IDL, CRP, triglicéridos, SAA, actividad de paraoxonasa, Lp(a), LDL oxidado o anticuerpos para LDL oxidado, o sPLA₂. En ciertos ejemplos descritos la parte de la planta o la planta, y/o el péptido, y/o el alimento, y/o la proteína en polvo y/o el suplemento nutricional se administran en una cantidad suficiente para reducir los niveles de ácido liofosfatídico (LPA) en el mamífero. En ciertos ejemplos descritos la planta o parte de la planta, y/o el péptido, y/o los alimentos, y/o la proteína en polvo y/o el suplemento nutricional se administran en una cantidad suficiente para reducir los niveles de ácido liofosfatídico (LPA) en el intestino (por ejemplo, en el intestino delgado) del mamífero. En ciertos ejemplos el mamífero es un ser humano. En ciertos ejemplos el mamífero es un mamífero no humano (por ejemplo, un canino, un felino, un equino, un porcino, un bovino, un largomorfo, *etc.*). En ciertos ejemplos descritos al mamífero se le administra al menos una parte de una planta transgénica que expresa un péptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la Tabla 1, la Tabla 2 o la Tabla 3. En ciertos ejemplos descritos la secuencia de aminoácidos comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en DWLKAFYDKFFEKFKFEFF (6F, SEQ ID NO: 17), FFEKFKFEFFKDYFAKLWD (rev6F, SEQ ID NO: 25), DWFKAFYDKVAEKFKKEAF (4F, SEQ ID NO: 15), FAEKFKKEAVKDYFAKFWD (rev4F, SEQ ID NO: 23), LLEQLNEQFNWVSRANL (SEQ ID NO:609), y LVGRQLEEF (SEQ ID NO: 612). En ciertos ejemplos descritos la secuencia de aminoácidos comprende la secuencia de aminoácidos DWLKAFYDKFFEKFKFEFF (6F, SEQ ID NO: 17) o su inversa. En ciertos ejemplos descritos al mamífero se le administra al menos una parte de un tomate transgénico que comprende células que expresan un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos DWLKAFYDKFFEKFKFEFF (6F, SEQ ID NO: 17) o su inversa. En ciertos ejemplos el péptido no se purifica sustancialmente a partir de tejido del tomate. En ciertos ejemplos descritos la planta (por ejemplo, el tomate) se seca y/o liofiliza.

También se describe un ácido nucleico aislado que codifica un péptido, uno o más dominios que comprenden la secuencia de aminoácidos de un péptido mimético de apolipoproteína, en donde los codones del ácido nucleico están optimizados para la expresión en una planta. En ciertos ejemplos descritos el ácido nucleico no codifica la secuencia de aminoácidos de ApoA-I y/o ApoA-I Milano. En ciertos ejemplos el péptido comprende un dominio que comprende la secuencia de aminoácidos del péptido mimético de la apolipoproteína. En ciertos ejemplos el péptido comprende al menos dos dominios que comprenden la secuencia de aminoácidos del péptido mimético de la apolipoproteína. En ciertos ejemplos descritos la secuencia de aminoácidos comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la Tabla 1, la Tabla 2 o la Tabla 3. En ciertos ejemplos descritos la secuencia de aminoácidos comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en DWLKAFYDKFFEKFKFEFF (6F, SEQ ID NO:

17), FFEKFKEFFKDYFAKLWD (rev6F, SEQ ID NO: 25), DWFKAFYDKVAEKFEAF (4F, SEQ ID NO: 15), FAEKFKEAVKDYFAKFWD (rev4F, SEQ ID NO: 23), LLEQLNEQFNWVSRANL (SEQ ID NO:609), y LVGRQLEEF (SEQ ID NO: 612). En ciertos ejemplos la secuencia de aminoácidos comprende la secuencia de aminoácidos DWLKAIFYDKFFEKFKEFF (6F, SEQ ID NO: 17) o su inversa. En ciertas realizaciones los codones están optimizados para la expresión en una planta de la cual al menos una parte es comestible. En ciertos ejemplos descritos al menos una parte de la planta, cuando se procesa es comestible. En ciertos ejemplos los codones optimizados para la expresión en una planta se seleccionan entre el grupo que consiste en tomate, arroz, tabaco, nabo, maíz, maíz, soja, uva, higo, ciruela, manzana, pera, melocotón, naranja, kiwi, payaya, piña, guayaba, lillikoi, fruta estrella, lichi, mango, granada, patata, zanahoria, granada, hojas de mostaza, acelga, kale, lechuga, brócoli, y semillas de cártamo. En ciertos ejemplos los codones están optimizados para la expresión en un tomate.

También se describe un vector que expresa un péptido mimético de apolipoproteína a una concentración/cantidad eficaz cuando se transfecta en una planta, el vector comprendiendo un ácido nucleico de acuerdo con la codificación de una apolipoproteína (o mimética) o un dominio de apoproteína (o mimética) como se describe en el presente documento. En ciertos ejemplos el vector no codifica un péptido ApoA-I o un péptido ApoA-I Milano. En ciertos ejemplos el vector cuando se transfecta en una planta expresa el péptido a niveles suficientes para que la planta o una parte de la misma tenga actividad biológica (por ejemplo, como se describe en el presente documento) cuando se alimenta a un mamífero. En ciertos ejemplos el vector comprende además un promotor eficaz en una célula vegetal. En ciertas realizaciones el vector comprende un promotor 35S de CaMV. En ciertos ejemplos el vector comprende además un terminador. En ciertos ejemplos el vector comprende un terminador de Nopalina sintasa (término NOS). En ciertos ejemplos el vector codifica además un péptido señal derivado de una planta. En ciertos ejemplos el péptido señal comprende la secuencia de aminoácidos M-I-M-A-S-S-K-L-L-S-L-A-L-F-L-A-L-L-S-H-A-N-S (SEQ ID NO: 2). En ciertos ejemplos el vector es un vector plásmido. En ciertos ejemplos el vector es un vector binario. En ciertos ejemplos el vector es un vector integrador. En ciertos ejemplos el vector está en un *Agrobacterium tumefaciens*.

También se describe una célula vegetal transfectada con un ácido nucleico como se describe en el presente documento en donde la célula vegetal expresa el péptido uno o más dominios de los cuales comprenden la secuencia de aminoácidos de un péptido mimético de apolipoproteína como se describe en el presente documento. En ciertos ejemplos descritos la célula vegetal no expresa un péptido ApoA-I o ApoA-I Milano. En ciertos ejemplos la célula vegetal es una célula de una planta de la cual al menos una parte es comestible. En ciertos ejemplos la célula vegetal es una célula de una planta al menos una parte de la cual, cuando se procesa, es comestible. En ciertos ejemplos la célula es una célula de una planta seleccionada entre el grupo que consiste en tomate, arroz, tabaco, nabo, maíz, maíz, soja, uva, higo, ciruela, manzana, pera, ciruela, melocotón, naranja, kiwi, payaya, piña, guayaba, lillikoi, fruta estrella, lichi, mango, granada, patata, zanahoria, granada, hojas de mostaza, acelga, kale, lechuga, brócoli, y semillas de cártamo. En ciertos ejemplos la célula es una célula de un protoplasto vegetal.

También se describen métodos para producir una planta transgénica que expresa un péptido que comprende al menos un dominio que codifica un mimético de apolipoproteína como se describe en el presente documento. El método implica típicamente proporcionar un vector o un ácido nucleico como se describe en el presente documento; transformar una célula vegetal con el vector o fragmento de ADN; y propagar una planta desde la célula. En ciertos ejemplos descritos el método comprende además recuperar la totalidad o una parte de la planta para usar en un método terapéutico o profiláctico. En ciertas realizaciones la recuperación comprende cosechar al menos una parte de la planta. En ciertos ejemplos la recuperación comprende obtener un extracto de una célula o tejido vegetal. En ciertos ejemplos la recuperación comprende secar y/o liofilizar al menos una parte de la planta. En ciertos ejemplos la célula vegetal se transforma utilizando un sistema *Agrobacterium*. En ciertas realizaciones la célula vegetal se transforma utilizando un método seleccionado entre el grupo que consiste en bombardeo con micropartículas, captación mediada por polietilenglicol, y electroporación. En ciertos ejemplos la célula vegetal es una célula de un dicotiledóneo. En ciertos ejemplos la célula es una célula de un monocotiledóneo. En ciertas realizaciones la célula es una célula de una planta alimenticia, por ejemplo, una planta de la que al menos una parte es comestible. En ciertos ejemplos la célula es una célula de una planta cuya al menos una parte de la cual, cuando se procesa es comestible. En ciertos ejemplos la célula es una célula de una planta seleccionada entre el grupo que consiste en tomate, arroz, tabaco, nabo, maíz, maíz, soja, uva, higo, ciruela, manzana, pera, melocotón, naranja, kiwi, payaya, piña, guayaba, lillikoi, fruta estrella, lichi, mango, granada, patata, zanahoria, granada, hojas de mostaza, acelga, kale, lechuga, brócoli, y semillas de cártamo. En ciertos ejemplos la célula es una célula de un tomate.

En ciertos ejemplos descritos se proporciona un alimento o ingrediente alimentario que comprende al menos una parte de una planta transgénica capaz de ser ingerida por su valor nutricional y/o sabor, en donde un tejido de la planta que comprende el alimento o el ingrediente alimentario comprende un péptido expresado de manera recombinante en células que comprenden el tejido en donde el péptido comprende o consiste en una o más copias de la secuencia de aminoácidos de una apolipoproteína o un péptido mimético de apolipoproteína (por ejemplo, un péptido como se muestra en la Tabla 1, la Tabla 2, o la Tabla 3) en donde la planta transgénica o una parte de la misma cuando se alimenta a un mamífero tiene actividad biológica (por ejemplo, disminuye los niveles plasmáticos de ácido liofosfatídico (LPA) y/o disminuye los niveles de SAA, y/o aumenta la actividad de la paraoxonasa plasmática y/o reduce las lesiones ateroscleróticas). En ciertos ejemplos descritos el péptido comprende o consiste en un dominio (por ejemplo, una copia de) la secuencia de aminoácidos de la apolipoproteína o el péptido mimético de la apolipoproteína. En ciertos ejemplos el péptido comprende al menos dos dominios que comprenden cada uno o consisten en la secuencia de aminoácidos

de la apolipoproteína o el péptido mimético de apolipoproteína (por ejemplo, el péptido comprende o consiste en al menos dos copias de la secuencia de aminoácidos de la apolipoproteína o mimético de apolipoproteína). En ciertas realizaciones el péptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos mimética de ApoA-I y/o una secuencia de aminoácidos de péptido G *, y/o una secuencia de péptido de ApoE. En ciertos ejemplos el péptido comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos DWLKAIFYDKFFFEKFKFEFF (6F, SEQ ID NO: 17). En ciertos ejemplos el péptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en DWLKAIFYDKFFFEKFKFEFF (6F, SEQ ID NO: 17), FFEKFKFEFFKDYFAKLWD (rev6F, SEQ ID NO: 25), DWFKAFYDKVAEKFKFEAF (4F, SEQ ID NO: 15), FAEKFKFEAVKDYFAKFW (rev4F, SEQ ID NO: 23), LLEQLNEQFNWVSRLANL (SEQ ID NO:609), y LVGRQLEEF (SEQ ID NO: 612). En ciertos ejemplos descritos el péptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en DWLKAIFYDKVAEKLKEAF (SEQ ID NO: 11), DWLKAIFYDKVAEKLKEAF (SEQ ID NO:12), DWFKAFYDKVAEKLKEAF (SEQ ID NO:13), DWLKAIFYDKVAEKFKFEAF (SEQ ID NO:14), DWFKAFYDKVAEKFKFEAF (SEQ ID NO:15), DWLKAIFYDKVFEKFKFEFF (SEQ ID NO:16), DWLKAIFYDKFFFEKFKFEFF (SEQ ID NO:17), DWFKAFYDKFFFEKFKFEFF (SEQ ID NO:18), DWLKAIFYDKVAEKFKFEFF (SEQ ID NO:19), FAEKFKFEAVKDYFAKLWD (SEQ ID NO:20), FAEKFKFEAVKDYFAKFW (SEQ ID NO:21), FAEKFKFEAVKDYFAKFW (SEQ ID NO:22), FAEKFKFEAVKDYFAKFW (SEQ ID NO:23), FFEKFKFEVVDYFAKLWD (SEQ ID NO:24), FFEKFKFEFFKDYFAKLWD (SEQ ID NO:25), FFEKFKFEFFKDYFAKFW (SEQ ID NO:26), DWLKAIFYDKVFEKFKFEAF (SEQ ID NO:27), DWLKAIFYDKVFEKFKFEFF (SEQ ID NO:28), DWLKAIFYDKVAEKFKFEFF (SEQ ID NO:29), DWLKAIFYDKVFEKFKFEFF (SEQ ID NO:30), EWLKLFYKVEKFKFEAF (SEQ ID NO:31), EWLKAIFYDKVAEKFKFEAF (SEQ ID NO:32), EWLKAIFYDKVAEKLKEFF (SEQ ID NO:33), EWLKAIFYDKVFEKFKFEAF (SEQ ID NO:34), EWLKAIFYDKVFEKFKFEFF (SEQ ID NO:35), EWLKAIFYDKVAEKFKFEFF (SEQ ID NO:36), EWLKAIFYDKVFEKFKFEFF (SEQ ID NO:37), AFYDKVAEKLKEAF (SEQ ID NO:38), AFYDKVAEKFKFEAF (SEQ ID NO:39), AFYDKVAEKFKFEAF (SEQ ID NO:40), AFYDKFFFEKFKFEFF (SEQ ID NO:41), AFYDKFFFEKFKFEFF (SEQ ID NO:42), AFYDKVAEKFKFEAF (SEQ ID NO:43), AFYDKVAEKLKEFF (SEQ ID NO:44), AFYDKVFEKFKFEAF (SEQ ID NO:45), AFYDKVFEKFKFEFF (SEQ ID NO:46), AFYDKVAEKFKFEFF (SEQ ID NO:47), KAFYDKVFEKFKFEAF (SEQ ID NO:48), LFYKVEKFKFEAF (SEQ ID NO:49), AFYDKVAEKFKFEAF (SEQ ID NO:50), AFYDKVAEKLKEFF (SEQ ID NO:51), AFYDKVFEKFKFEAF (SEQ ID NO:52), AFYDKVFEKFKFEFF (SEQ ID NO:53), AFYDKVAEKFKFEFF (SEQ ID NO:54), AFYDKVFEKFKFEFF (SEQ ID NO:55), DWLKALYDKVAEKLKEAL (SEQ ID NO:56), DWFKAFYKVAEKLKEFF (SEQ ID NO:57), DWFKAFYKFFFEKFKFEFF (SEQ ID NO:58), EWLKALYKVAEKLKEAL (SEQ ID NO:59), EWLKAFYKVAEKLKEAF (SEQ ID NO:60), EWLKAFYKVAEKLKEFF (SEQ ID NO:61), EWLKAFYKVEKFKFEFF (SEQ ID NO:62), EWLKAFYKFFFEKFKFEFF (SEQ ID NO:63), EWLKAFYKFFFEKFKFEFF (SEQ ID NO:64), DFLKAWYDKVAEKLKEAW (SEQ ID NO:65), EFLKAWYKVAEKLKEAW (SEQ ID NO:66), DFLKAWYDKVAEKLKEWW (SEQ ID NO:67), EFLKAWYKVAEKLKEWW (SEQ ID NO:68), DKLKAFYDKVFEWAKEAF (SEQ ID NO:69), DKWKAVYDKFAEAFKFEFL (SEQ ID NO:70), EKLKAFYKVEWAKEAF (SEQ ID NO:71), EKWKAVYKFAEAFKFEFL (SEQ ID NO:72), DWLKAIFYDKVAEKFKFEAF (SEQ ID NO:73), EKWKAVYKFAEAFKFEFL (SEQ ID NO:74), DWLKAIFYDKVFEKFKFEFF (SEQ ID NO:75), EWLKAFYKVEKFKFEFF (SEQ ID NO:76), DWLRAFYDKVAEKLKEAF (SEQ ID NO:77), EWLRAFYKVAEKLKEAF (SEQ ID NO:78), DWLKAIFYDRVAEKLKEAF (SEQ ID NO:79), EWLKAFYERVAEKLKEAF (SEQ ID NO:80), DWLKAIFYDKVAERLKEAF (SEQ ID NO:81), EWLKAFYKVAERLKEAF (SEQ ID NO:82), DWLKAIFYDKVAEKLREAF (SEQ ID NO:83), EWLKAFYKVAEKLREAF (SEQ ID NO:84), DWLKAIFYDRVAERLKEAF (SEQ ID NO:85), EWLKAFYERVAERLKEAF (SEQ ID NO:86), DWLRAFYDKVAEKLREAF (SEQ ID NO:87), EWLRAFYKVAEKLREAF (SEQ ID NO:88), DWLRAFYDRVAEKLKEAF (SEQ ID NO:89), EWLRAFYERVAEKLKEAF (SEQ ID NO:90), DWLKAIFYDKVAERLREAF (SEQ ID NO:91), EWLKAFYKVAERLREAF (SEQ ID NO:92), DWLRAFYDKVAERLKEAF (SEQ ID NO:93), EWLRAFYKVAERLKEAF (SEQ ID NO:94), DWLKAIFYDKVAEKLKEAFDPWLKAIFYDKVAEKLKEAF (SEQ ID NO:95), DWLKAIFYDKVAEKLKEFFDPWLKAIFYDKVAEKLKEFF (SEQ ID NO:96), DWFKAFYDKVAEKLKEAFDPDWFKAFYDKVAEKLKEAF (SEQ ID NO:97), DKLKAFYDKVFEWAKEAFDPDKLKAIFYDKVFEWLKEAF (SEQ ID NO:98), DKWKAVYDKFAEAFKFEFLDPDKWKAVYDKFAEAFKFEFL (SEQ ID NO:99), DWFKAFYDKVAEKFKFEAFDPDWFKAFYDKVAEKFKFEAF (SEQ ID NO:100), DWLKAIFYDKVFEKFKFEFFDPDWLKAIFYDKVFEKFKFEFF (SEQ ID NO:101), DWLKAIFYDKFAEKFKFEFFDPWLKAIFYDKFAEKFKFEFF (SEQ ID NO:102), EWLKAFYKVAEKFKFEAF (SEQ ID NO:103), DWFKAFYDKVAEKFKFEAF (SEQ ID NO:104), FKAFYDKVAEKFKFE (SEQ ID NO:105), FKAFYKVAEKFKFE (SEQ ID NO:106), FKAFYDKVAEKFKFE (SEQ ID NO:107), FKAFYKVAEKFKFE (SEQ ID NO:108), DWFKAFYDKVAEKFKFEAF (SEQ ID NO:109), EWLKAFYKVAEKFKFEAF (SEQ ID NO:110), AFYDKVAEKFKFEAF (SEQ ID NO:111), DWFKAFYDKVAEKFKFEAF (SEQ ID NO:112), DWLKAIFYDKVFEKFKFEFF (SEQ ID NO:113), EWLKAFYKVEKFKFEFF (SEQ ID NO:114), AFYDKVFEKFKFEFF (SEQ ID NO:115), AFYKVEKFKFEFF (SEQ ID NO:116), DWLKAIFYDKVFEKFKFE (SEQ ID NO:117), EWLKAFYKVEKFKFE (SEQ ID NO:118), LKAFYDKVFEKFKFE (SEQ ID NO:119), LKAFYKVEKFKFE (SEQ ID NO:120), EWLKAFYKVAEKFKFEAF (SEQ ID NO:121), EWLKAFYDKVADKFKFEAF (SEQ ID NO:122), DWFKAFYKVAEKFKFEAF (SEQ ID NO:123), DWFKAFYKVAEKFKDAF (SEQ ID NO:124), DFLKAFYDKVAEKFKFEAF (SEQ ID NO:125), EFLKAFYKVAEKFKDAF (SEQ ID NO:126), EFLKAFYDKVADKFKFEAF (SEQ ID NO:127), DFLKAFYKVAEKFKFEAF (SEQ ID NO:128), DFLKAFYKVAEKFKDAF (SEQ ID NO:129), DFLKAFYDKVAEKFKFEAF (SEQ ID NO:130), DFLKAFYKVAEKFKDAF (SEQ ID NO:131), EWLKAFYDKVADKFKFEAF (SEQ ID NO:132), DFLKAFYKVAEKFKFEAF (SEQ ID NO:133), DWFKAFYKVAEKFKDAF (SEQ ID NO:134), DWFKAFYDKVAEKFKFEAF (SEQ ID NO:135), EWLKAFYKVAEKFKDAF (SEQ ID NO:136), EWLKAFYDKVADKFKFEAF (SEQ ID NO:137),

	DWFKAFVEKYADKFKEAF	(SEQ	ID	NO:138),	DWFKAFVEKYAEKFKDAF	(SEQ	ID	NO:139),
	DWFKAFYDKAVEKFKDAF	(SEQ	ID	NO:140),	EWFKAFYEKAVDKFKDAF	(SEQ	ID	NO:141),
	EWFKAFYDKAVDKFKDAF	(SEQ	ID	NO:142),	DWFKAFYEKAVDKFKDAF	(SEQ	ID	NO:143),
	DWFKAFYDKAVEKFKDAF	(SEQ	ID	NO:144),	DWFKAFYDKVFEKAKEAF	(SEQ	ID	NO:145),
5	EWFKAFYDKVFDKAKDAF	(SEQ	ID	NO:146),	EWFKAFYDKVFDKAKEAF	(SEQ	ID	NO:147),
	DWFKAFYDKVFDKAKEAF	(SEQ	ID	NO:148),	DWFKAFYDKVFEKAKDAF	(SEQ	ID	NO:149),
	DWFKAFYDKVAEKAKEFF	(SEQ	ID	NO:150),	EWFKAFYDKVADKAKDFF	(SEQ	ID	NO:151),
	EWFKAFYDKVADKAKEFF	(SEQ	ID	NO:152),	DWFKAFYDKVADKAKEFF	(SEQ	ID	NO:153),
	DWFKAFYDKVAEKAKDFF	(SEQ	ID	NO:154),	DWFKAFYDKVAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:155),
10	EWFKAFYDKVADKFKDFA	(SEQ	ID	NO:156),	EWFKAFYDKVADKFKDFA	(SEQ	ID	NO:157),
	DWFKAFYDKVADKFKDFA	(SEQ	ID	NO:158),	DWFKAFYDKVAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:159),
	DAFKAFYDKVAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:160),	EAFKAFYDKVADKFKDFA	(SEQ	ID	NO:161),
	EAFKAFYDKVADKFKDFA	(SEQ	ID	NO:162),	DAFKAFYDKVADKFKDFA	(SEQ	ID	NO:163),
	DAFKAFYDKVADKFKDFA	(SEQ	ID	NO:164),	DAFKAFYDKVADKFKDFA	(SEQ	ID	NO:165),
15	EAFKAFYDKVADKFKDFA	(SEQ	ID	NO:166),	EAFKAFYDKVADKFKDFA	(SEQ	ID	NO:167),
	DAFKAFYDKVADKFKDFA	(SEQ	ID	NO:168),	DAFKAFYDKVADKFKDFA	(SEQ	ID	NO:169),
	DYFKAFYDKVADKFKDFA	(SEQ	ID	NO:170),	EYFKAFYDKVADKFKDFA	(SEQ	ID	NO:171),
	EYFKAFYDKVADKFKDFA	(SEQ	ID	NO:172),	DYFKAFYDKVADKFKDFA	(SEQ	ID	NO:173),
	DYFKAFYDKVADKFKDFA	(SEQ	ID	NO:174),	DWAKAFYDKVADKFKDFA	(SEQ	ID	NO:175),
20	EWAKAFYDKVADKFKDFA	(SEQ	ID	NO:176),	EWAKAFYDKVADKFKDFA	(SEQ	ID	NO:177),
	DWAKAFYDKVADKFKDFA	(SEQ	ID	NO:178),	DWAKAFYDKVADKFKDFA	(SEQ	ID	NO:179),
	DWFKAAAYDKVADKFKDFA	(SEQ	ID	NO:180),	EWFKAAAYDKVADKFKDFA	(SEQ	ID	NO:181),
	EWFKAAAYDKVADKFKDFA	(SEQ	ID	NO:182),	DWFKAAAYDKVADKFKDFA	(SEQ	ID	NO:183),
	DWFKAAAYDKVADKFKDFA	(SEQ	ID	NO:184),	DWFKAFADKVAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:185),
25	EWFKAFADKVAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:186),	EWFKAFADKVAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:187),
	DWFKAFADKVAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:188),	DWFKAFADKVAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:189),
	DWFKAFYDKAAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:190),	EWFKAFYDKAAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:191),
	EWFKAFYDKAAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:192),	DWFKAFYDKAAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:193),
	DWFKAFYDKAAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:194),	DWYKAFYDKAAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:195),
30	EWYKAFYDKAAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:196),	EWYKAFYDKAAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:197),
	DWYKAFYDKAAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:198),	DWYKAFYDKAAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:199),
	DWVKAFYDKAAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:200),	EWVKAFYDKAAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:201),
	EWVKAFYDKAAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:202),	DWVKAFYDKAAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:203),
	DWVKAFYDKAAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:204),	DWFKAFFDKVAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:205),
35	EWFKAFFDKVAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:206),	EWFKAFFDKVAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:207),
	DWFKAFFDKVAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:208),	DWFKAFFDKVAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:209),
	DWFKAFFDKVAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:210),	EWFKAFFDKVAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:211),
	EWFKAFFDKVAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:212),	DWFKAFFDKVAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:213),
	DWFKAFFDKVAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:214),	DWFKAFYDKFAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:215),
40	EWFKAFYDKFAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:216),	EWFKAFYDKFAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:217),
	DWFKAFYDKFAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:218),	DWFKAFYDKFAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:219),
	DKFKAFYDKFAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:220),	EKFKAFYDKFAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:221),
	EKFKAFYDKFAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:222),	DKFKAFYDKFAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:223),
	DKFKAFYDKFAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:224),	DKWKAFYDKVAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:225),
45	EKWKAFYDKVAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:226),	EKWKAFYDKVAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:227),
	DKWKAFYDKVAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:228),	DKWKAFYDKVAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:229),
	DKFKAFYDKVAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:230),	EKFKAFYDKVAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:231),
	EKFKAFYDKVAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:232),	DKFKAFYDKVAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:233),
	DKFKAFYDKVAEKFKDFA	(SEQ	ID	NO:234),	DKFKAFYDKVAEFWKDFA	(SEQ	ID	NO:235),
50	EKFKAFYDKVAEFWKDFA	(SEQ	ID	NO:236),	EKFKAFYDKVAEFWKDFA	(SEQ	ID	NO:237),
	DKFKAFYDKVAEFWKDFA	(SEQ	ID	NO:238),	DKFKAFYDKVAEFWKDFA	(SEQ	ID	NO:239),
	FAEKFKDAVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:240),	FADKFKDAVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:241),
	FADKFKDAVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:242),	FAEKFKDAVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:243),
	FAEKFKDAVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:244),	FWEKFKDAVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:245),
55	FWDKFKDAVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:246),	FADKFKDAVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:247),
	FAEKFKDAVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:248),	FAEKFKDAVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:249),
	FFEKFKDAVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:250),	FFDKFKDAVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:251),
	FFDKFKDAVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:252),	FFEKFKDAVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:253),
	FFEKFKDAVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:254),	FAEKAKEFVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:255),
60	FADKAKEFVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:256),	FADKAKEFVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:257),
	FAEKAKDFVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:258),	FAEKAKDFVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:259),
	FAEKFKDAVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:260),	FADKFKDAVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:261),
	FADKFKDAVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:262),	FAEKFKDAVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:263),
	FAEKFKDAVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:264),	FAEKFKDAVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:265),
65	FADKFKDAVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:266),	FADKFKDAVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:267),
	FAEKFKDAVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:268),	FAEKFKDAVKDYFAKFD	(SEQ	ID	NO:269),

ES 2 741 359 T3

	FAEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:270),	FADKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:271),
	FADKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:272),	FAEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:273),
	FAEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:274),	FAEKFWDAVKEYFAKFKD	(SEQ ID NO:275),
	FADKFWDAVKEYFAKFK	(SEQ ID NO:276),	FADKFWDAVKEYFAKFK	(SEQ ID NO:277),
5	FAEKFWDAVKEYFAKFKD	(SEQ ID NO:278),	FAEKFWDAVKEYFAKFK	(SEQ ID NO:279),
	AFEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:280),	AFDKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:281),
	AFDKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:282),	AFEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:283),
	AFEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:284),	VAEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:285),
10	VADKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:286),	VADKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:287),
	VAEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:288),	VAEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:289),
	YAEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:290),	YADKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:291),
	YADKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:292),	YAEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:293),
	YAEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:294),	AAEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:295),
15	AADKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:296),	AADKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:297),
	AAEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:298),	AAEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:299),
	FFEKAKEAVKDYFAKFW	(SEQ ID NO:300),	FFDKAKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:301),
	FFDKAKEAVKDYFAKFW	(SEQ ID NO:302),	FFEKAKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:303),
	FFEKAKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:304),	FYEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:305),
20	FYDKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:306),	FYDKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:307),
	FYEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:308),	FYEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:309),
	FVEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:310),	FVDKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:311),
	FVDKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:312),	FVEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:313),
	FVEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:314),	FAEKYKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:315),
25	FADKYKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:316),	FADKYKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:317),
	FAEKYKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:318),	FAEKYKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:319),
	FAEKVKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:320),	FADKVKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:321),
	FADKVKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:322),	FAEKVKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:323),
	FAEKVKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:324),	FAEKVKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:325),
30	FADKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:326),	FADKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:327),
	FAEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:328),	FAEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:329),
	FAEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:330),	FADKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:331),
	FADKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:332),	FAEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:333),
	FAEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:334),	FAEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:335),
35	FADKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:336),	FADKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:337),
	FAEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:338),	FAEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:339),
	FAEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:340),	FADKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:341),
	FADKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:342),	FAEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:343),
	FAEKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ ID NO:344),	WAEKFFEAVKDYFAKFKD	(SEQ ID NO:345),
40	WADKFFDAVKEYFAKFK	(SEQ ID NO:346),	WADKFFEAVKDYFAKFK	(SEQ ID NO:347),
	WAEKFFDAVKEYFAKFKD	(SEQ ID NO:348),	WAEKFFDAVKEYFAKFK	(SEQ ID NO:349),
	FAEKWFDAVKEYFAKFKD	(SEQ ID NO:350),	FADKWFDAVKEYFAKFK	(SEQ ID NO:351),
	FADKWFDAVKEYFAKFK	(SEQ ID NO:352),	FAEKWFDAVKEYFAKFKD	(SEQ ID NO:353),
45	FAEKWFDAVKEYFAKFK	(SEQ ID NO:354),	FAEKWFDAVKEYFAKFK	(SEQ ID NO:355),
	FADKWFDAVKEYFAKFK	(SEQ ID NO:356),	FADKWFDAVKEYFAKFK	(SEQ ID NO:357),
	FAEKWFDAVKEYFAKFK	(SEQ ID NO:358),	FAEKWFDAVKEYFAKFK	(SEQ ID NO:359),
	FYEKFAEAVKDWFAKFKD	(SEQ ID NO:360),	FYDKFADAVKEYFAKFK	(SEQ ID NO:361),
	FYDKFAEAVKDWFAKFK	(SEQ ID NO:362),	FYEKFAEAVKDWFAKFK	(SEQ ID NO:363),
	FYEKFAEAVKDWFAKFK	(SEQ ID NO:364),	DWFKHFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:365),
50	EWFKHFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:366),	EWFKHFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:367),
	DWFKHFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:368),	DWFKHFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:369),
	DWFKHFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:370),	DWFKHFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:371),
	EWFKHFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:372),	EWFKHFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:373),
	DWFKHFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:374),	DWFKHFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:375),
55	DWFKHFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:376),	DWFKHFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:377),
	EWFKHFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:378),	EWFKHFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:379),
	DWFKHFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:380),	DWFKHFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:381),
	DWFKHFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:382),	DWFKHFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:383),
	EWFKVFYDKHAEKFKDAF	(SEQ ID NO:384),	EWFKVFYDKHAEKFKDAF	(SEQ ID NO:385),
	DWFKVFYDKHAEKFKDAF	(SEQ ID NO:386),	DWFKVFYDKHAEKFKDAF	(SEQ ID NO:387),
60	DWFKVFYDKHAEKFKDAF	(SEQ ID NO:388),	DWFKVFYDKHAEKFKDAF	(SEQ ID NO:389),
	EWFKAFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:390),	EWFKAFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:391),
	DWFKAFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:392),	DWFKAFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:393),
	DWFKAFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:394),	DWFKAFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:395),
	EWFKAFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:396),	EWFKAFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:397),
65	DWFKAFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:398),	DWFKAFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:399),
	DWFKAFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:400),	DWFKAFYDKVAEKFKDAF	(SEQ ID NO:401),

ES 2 741 359 T3

	FAEKFKAVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:402),	FHEKFKAVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:403),
	FHEKFKAVKEYFAKFW	(SEQ	ID	NO:404),	FHDKFKDAVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:405),
	FHDKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ	ID	NO:406),	FHDKFKAVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:407),
	FHEKFKDAVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:408),	FHEKFKAVKEYFAKFW	(SEQ	ID	NO:409),
5	FHEKFKAVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:410),	HFEKFKAVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:411),
	HFDKFKDAVKEYFAKFW	(SEQ	ID	NO:412),	HFEKFKAVKEYFAKFW	(SEQ	ID	NO:413),
	HFDKFKDAVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:414),	HFEKFKAVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:415),
	HFEKFKAVKEYFAKFW	(SEQ	ID	NO:416),	HFEKFKAVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:417),
	FFEKHKEAVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:418),	FFDKHKDAVKEYFAKFW	(SEQ	ID	NO:419),
10	FFEKHKEAVKEYFAKFW	(SEQ	ID	NO:420),	FFDKHKDAVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:421),
	FFDKHKAVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:422),	FFEKHKEAVKEYFAKFW	(SEQ	ID	NO:423),
	FFEKHKEAVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:424),	FVEKFKEAHKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:425),
	FVDKFKDAHKEYFAKFW	(SEQ	ID	NO:426),	FVEKFKEAHKEYFAKFW	(SEQ	ID	NO:427),
	FVDKFKDAHVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:428),	FVDKFKEAHKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:429),
15	FVEKFKDAHVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:430),	FVEKFKEAHKEYFAKFW	(SEQ	ID	NO:431),
	FVEKFKEAHKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:432),	FAEKFKEHVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:433),
	FADKFKDHVKEYFAKFW	(SEQ	ID	NO:434),	FAEKFKEHVKEYFAKFW	(SEQ	ID	NO:435),
	FADKFKDHVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:436),	FADKFKEHVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:437),
	FAEKFKDHVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:438),	FAEKFKEHVKEYFAKFW	(SEQ	ID	NO:439),
20	FAEKFKEHVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:440),	FAEKFKFVKDYHAKFW	(SEQ	ID	NO:441),
	FADKFKDFVKEYHAKFW	(SEQ	ID	NO:442),	FADKFKDFVKDYHAKFW	(SEQ	ID	NO:443),
	FAEKFKDFVKDYHAKFW	(SEQ	ID	NO:444),	FADKFKDFVKDYHAKFW	(SEQ	ID	NO:445),
	FAEKFKFVKDYHAKFW	(SEQ	ID	NO:446),	FAEKFKFVKDYHAKFW	(SEQ	ID	NO:447),
	FAEKFKFVKDYHAKFW	(SEQ	ID	NO:448),	FAEKFKFVKDYFAKHWD	(SEQ	ID	NO:449),
25	FADKFKDFVKEYFAKHWE	(SEQ	ID	NO:450),	FAEKFKFVKDYFAKHWE	(SEQ	ID	NO:451),
	FADKFKDFVKDYFAKHWD	(SEQ	ID	NO:452),	FADKFKFVKDYFAKHWD	(SEQ	ID	NO:453),
	FAEKFKDFVKDYFAKHWD	(SEQ	ID	NO:454),	FAEKFKFVKDYFAKHWD	(SEQ	ID	NO:455),
	FAEKFKFVKDYFAKHWE	(SEQ	ID	NO:456),	FAEKFKAVKEYFAKFW	(SEQ	ID	NO:457),
	FADKFKDAVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:458),	FAERFREAVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:459),
30	FAERFREAVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:460),	FAEKFKAVRDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:461),
	FAEKFKAVKDYFARFWD	(SEQ	ID	NO:462),	FAEKFKAVKEYFAKFW	(SEQ	ID	NO:463),
	FADKFKDAVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:464),	FAERFREAVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:465),
	FAEKFREAVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:466),	FAEKFKAVRDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:467),
	FAEKFKAVKDYFARFWD	(SEQ	ID	NO:468),	FAEKFKAVKEYFAKFW	(SEQ	ID	NO:469),
35	FADKFKDAVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:470),	FAERFREAVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:471),
	FAEKFREAVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:472),	FAEKFKAVRDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:473),
	FAEKFKAVKDYFARFWD	(SEQ	ID	NO:474),	FAERFREAVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:475),
	FAEKFREAVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:476),	FAEKFKAVRDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:477),
	FAEKFKAVKDYFARFWD	(SEQ	ID	NO:478),	FAEKFKAVKEYFAKFW	(SEQ	ID	NO:479),
40	FADKFKDAVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:480),	FAERFREAVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:481),
	FAEKFREAVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:482),	FAEKFKAVRDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:483),
	FAEKFKAVKDYFARFWD	(SEQ	ID	NO:484),	LFEKFAEAFKDYVAKWKD	(SEQ	ID	NO:485),
	LFERFAEAFKDYVAKWKD	(SEQ	ID	NO:486),	LFEKFAEAFRDYVAKWKD	(SEQ	ID	NO:487),
	LFEKFAEAFKDYVARWKD	(SEQ	ID	NO:488),	LFEKFAEAFKDYVAKWRD	(SEQ	ID	NO:489),
45	LFEKFAEAFKEYVAKWKE	(SEQ	ID	NO:490),	LFDKFAEAFKDYVAKWKD	(SEQ	ID	NO:491),
	LFDKFAEAFKDYVAKWKD	(SEQ	ID	NO:492),	LFEKFAEAFKDYVAKWKD	(SEQ	ID	NO:493),
	LFEKFAEAFKEYVAKWKD	(SEQ	ID	NO:494),	LFEKFAEAFKDYVAKWKE	(SEQ	ID	NO:495),
	FAEKAWFVKDYFAKLKD	(SEQ	ID	NO:496),	FAERAWFVKDYFAKLKD	(SEQ	ID	NO:497),
	FAEKAWFVKDYFAKLKD	(SEQ	ID	NO:498),	FAEKAWFVKDYFAKLKD	(SEQ	ID	NO:499),
50	FAEKAWFVKDYFAKLKD	(SEQ	ID	NO:500),	FAEKAWFVKEYFAKLKE	(SEQ	ID	NO:501),
	FADKAWDFVKDYFAKLKD	(SEQ	ID	NO:502),	FADKAWFVKDYFAKLKD	(SEQ	ID	NO:503),
	FAEKAWDFVKDYFAKLKD	(SEQ	ID	NO:504),	FAEKAWFVKEYFAKLKD	(SEQ	ID	NO:505),
	FAEKAWFVKDYFAKLKE	(SEQ	ID	NO:506),	FFEKFKFVKDYFAKLWD	(SEQ	ID	NO:507),
	FFEKFKFVKDYFAKLWE	(SEQ	ID	NO:508),	FFDKFKDFVKDYFAKLWD	(SEQ	ID	NO:509),
55	FFERFKFVKDYFAKLWD	(SEQ	ID	NO:510),	FFEKFKFVKDYFAKLWD	(SEQ	ID	NO:511),
	FFEKFKFVRDYFAKLWD	(SEQ	ID	NO:512),	FFEKFKFVKDYFARLWD	(SEQ	ID	NO:513),
	FFDKFKDFVKDYFAKLWD	(SEQ	ID	NO:514),	FFEKFKFVKDYFAKLWD	(SEQ	ID	NO:515),
	FFEKFKFVKDYFAKLWD	(SEQ	ID	NO:516),	FFEKFKFVKDYFAKLWE	(SEQ	ID	NO:517),
	FLEKFKFVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:518),	FLEKFKFVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:519),
60	FLDKFKFVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:520),	FLDKFKFVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:521),
	FLEKFKDFVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:522),	FLEKFKFVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:523),
	FLEKFKFVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:524),	FLERFKFVKDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:525),
	FLEKFKFVRDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:526),	FLEKFKFVRDYFAKFW	(SEQ	ID	NO:527),
	FLEKFKFVKDYFARFWD	(SEQ	ID	NO:528),	FFEKFKFVKDYFAKLWD	(SEQ	ID	NO:529),
65	FFEKFKFVKDYFAKLWE	(SEQ	ID	NO:530),	FFDKFKDFVKDYFAKLWD	(SEQ	ID	NO:531),
	FFERFKFVKDYFAKLWD	(SEQ	ID	NO:532),	FFEKFKFVKDYFAKLWD	(SEQ	ID	NO:533),

FFEKFKEFFRDYFAKLWD (SEQ ID NO:534), FFERFKEFFKDYFARLWD (SEQ ID NO:535),
 FFDKFKEFFKDYFAKLWD (SEQ ID NO:536), FFEKFKDFFKDYFAKLWD (SEQ ID NO:537),
 FFEKFKEFFKEYFAKLWD (SEQ ID NO:538), FFEKFKEFFKDYFAKLWE (SEQ ID NO:539),
 5 FAEKFKAEVKDYFAKFW (SEQ ID NO:540), FAEKFKAEVKDYFAKFW (SEQ ID NO:541),
 FADKFKDAVKDYFAKFW (SEQ ID NO:542), FAERFREAVKDYFAKFW (SEQ ID NO:543),
 FAEKFKAEVKDYFAKFW (SEQ ID NO:544), FAEKFKAEVRDYFAKFW (SEQ ID NO:545),
 FAEKFKAEVKDYFAKFW (SEQ ID NO:546), DKWKAVYDKFAEAFKEFF (SEQ ID NO:547),
 EKWKAVYDKFAEAFKEFF (SEQ ID NO:548), DKWKAVYDKFADAFKDF (SEQ ID NO:549),
 DRWKAVYDKFAEAFKEFF (SEQ ID NO:550), DKWRAVYDKFAEAFKEFF (SEQ ID NO:551),
 10 DKWKAVYDRFAEAFKEFF (SEQ ID NO:552), DKWKAVYDKFAEAFREFF (SEQ ID NO:553),
 FFEKFAEAFKDYVAKWKD (SEQ ID NO:554), FFEKFAEAFKEYVAKWKE (SEQ ID NO:555),
 FFDKFAEAFKDYVAKWKD (SEQ ID NO:556), FFERFAEAFKDYVAKWKD (SEQ ID NO:557),
 FFERFAEAFRDYVAKWKD (SEQ ID NO:558), FFEKFAEAFKDYVARWKD (SEQ ID NO:559),
 15 FFEKFAEAFKDYVAKWKD (SEQ ID NO:562), FFERFAEAFKDYVAKWKD (SEQ ID NO:563),
 FFERFAEAFKDYVAKWKE (SEQ ID NO:564), FFEKFKEFFKDYFAKFW (SEQ ID NO:565),
 FFDKFKDFFKDYFAKFW (SEQ ID NO:566), FFEKFKEFFKEYFAKFW (SEQ ID NO:567),
 FFERFKEFFKDYFAKFW (SEQ ID NO:568), FFEKFRFFKDYFAKFW (SEQ ID NO:569),
 FFEKFKEFFRDYFAKFW (SEQ ID NO:570), FFEKFKEFFKDYFARFWD (SEQ ID NO:571),
 20 FFDKFKEFFKDYFAKFW (SEQ ID NO:572), FFEKFKEFFKDYFAKFW (SEQ ID NO:573),
 FFEKFKEFFKEYFAKFW (SEQ ID NO:574), FFEKFKEFFKDYFAKFW (SEQ ID NO:575),
 EVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWEPLVE (SEQ ID NO:576), EVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWE
 (SEQ ID NO:577), EVRSKLEEWFAAFREFAEEFLARLKS (SEQ ID NO:578), PVLDFRELLNELLEALKQK (SEQ ID
 NO:579), DWLKAFYDKVAEKLKEAFP-DWAKAAYDKAAEKAKEAA (SEQ ID NO:580), EELKEKLEELKEKLEELK-P-
 25 EELKEKLEELKEKLEEL (SEQ ID NO:581), EELKAKLEELKAKLEELK-PEELKAKLEELKAKLEELK (SEQ ID NO:582),
 EKLKALLEKLLAKLKELL P-EKLKALLEKLLAKLKELL (SEQ ID NO:583), EWLKELLEKLEKLEKELL-P-
 EWLKELLEKLEKLEKELL (SEQ ID NO:584), EKFKELLEKLEKLEKELL-P-EKFKELLEKLEKLEKELL (SEQ ID NO:585),
 EKLKELLEKLEKLEKLL-P-EKLKELLEKLEKLEKLL (SEQ ID NO:586), EKLKELLEKLEKLEKLELL-P-
 EKLKELLEKLEKLEKLELL (SEQ ID NO:587), EKLKELLEKLLAKLKELL-P-EKLKELLEKLLAKLKELL (SEQ ID NO:588),
 30 EKFKELLEKLEKLEKELL-P-EKFKELLEKLEKLEKELL (SEQ ID NO:589), EKLKAKLEELKAKLEELL-P-
 EKLKAKLEELKAKLEELL (SEQ ID NO:590), EELKELLKELLKLEKLL-P-ELKELLKELLKLEKLL (SEQ ID NO:591),
 EELKLLLEELLKLLKELL-P-EELKLLLEELLKLLKELL (SEQ ID NO:592), EKLKELLEKLEKLEKELL-A-
 EKLKELLEKLEKLEKELL (SEQ ID NO:593), EKLKELLEKLEKLEKELL-AA-EKLKELLEKLEKLEKELL (SEQ ID NO:594),
 EKLKAKLEELKAKLEELL-P-EKAKAALAEKAKAEELA (SEQ ID NO:595), EKLKAKLEELKAKLEELL-P-
 35 EHAKAALAEKAKAEELA (SEQ ID NO:596), DHLKAFYDKVACKLKEAF-P-DWAKAAYDKAAEKAKEAA (SEQ ID
 NO:597), DWLKAFYDKVAEKLKEAFP-P-DHAKAAYDKAAEKAKEAA (SEQ ID NO:598), DWLKAFYDKVACKLKEAF-
 PDWAKAAYDKAAEKAKEAA (SEQ ID NO:599), DHLKAFYDKVAEKLKEAFP-P-DWAKAAYDKAAEKAKEAA (SEQ ID
 NO:600), VLESFVSVLSALEEYTKLNTQ (SEQ ID NO:601), DKWKAVYDKFAEAFKEFL (SEQ ID NO:602),
 DKLKAFYDKVFEWAKEAF (SEQ ID NO:603), DQYYLRVTTVA (SEQ ID NO:605), ECKPCLKQTCMKFYARVCR (SEQ
 40 ID NO:606), FSRASSIDELFD (SEQ ID NO:607), IQNAVNGVKQIKTLIEKTNEE (SEQ ID NO:608),
 LLEQLNEQFNWVSRLANL (SEQ ID NO:609), LLEQLNEQFNWVSRLANLTEGE (SEQ ID NO:610),
 LLEQLNEQFNWVSRLANLTQGE (SEQ ID NO:611), LVGRQLEEF (SEQ ID NO:612), MNGDRIDSLLEN (SEQ ID
 NO:613), NELQEMSNQSGSKYVNKEIQNAVNGV (SEQ ID NO:614), PCLKQTCMKFYARVCR (SEQ ID NO:615),
 PFLEMIHEAQQAMD (SEQ ID NO:616), PGVCNETMMALWEECK (SEQ ID NO:617),
 45 PKFMETVAEKALQEYRKKHRE (SEQ ID NO:618), PSGVTEVVVKLFDS (SEQ ID NO:619),
 PSQAKLRRELDLQVAERLTRKYNELLKSYQ (SEQ ID NO:620), PTEFIREGDDD (SEQ ID NO:621),
 QQTHMLDVMQD (SEQ ID NO:622), RKTLLSNLEEAKKKKEDALNETRESETKLEL (SEQ ID NO:623),
 RMKDQCDKCREILSV (SEQ ID NO:624), GIKKFLGSIWKFIAFVG (SEQ ID NO:626), GFKKFLGSWAKIYKAFVG
 (SEQ ID NO:627), GFRRLGWSWARIYRAFG (SEQ ID NO:628), TEELRVRLASHLRKLRKRL (SEQ ID NO:629),
 50 TEELRVRLASHLRKLRK (SEQ ID NO:630), LRVRLASHLRKLRKRL (SEQ ID NO:631), RLASHLRKLRKRL (SEQ ID
 NO:632), SHLRKLRKRL (SEQ ID NO:633), LRKLRKRL (SEQ ID NO:634), LRKLRKRLRLRKLKRL (SEQ ID
 NO:635), LRKLRKRLRLRKLKRLRLRKLKRL (SEQ ID NO:636),
 RQIKIWFQNRMMKWKCLRVRLASHLRKLRKRL (SEQ ID NO:637), LRVRLASHLRKLRKRL (SEQ ID NO:638),
 EELRVRLASHLRKLRKRLRDADDLQKRLAVYEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWEPLVE DM (SEQ ID NO:639),
 55 CEELRVRLASHLRKLRKRLRLRDADDLQKRLAVY (SEQ ID NO:640), LRKLRKRLRLRDADDLRLKLRKRLRLRDADDL
 (SEQ ID NO:641), TEELRVRLASHLRKLRKRL (SEQ ID NO:642), TEELRVRLASHLEKLRKRL (SEQ ID NO:643),
 TEELRVRLASHLRKLRKRL (SEQ ID NO:644), LREKLRVLSALRTHRLELRL (SEQ ID NO:645),
 LRKLRKRLRLDWLKAFYDKVAEKLKEAF (SEQ ID NO:646), LRRLRRRLRLDWLKAFYDKVAEKLKEAF (SEQ ID NO:
 60 647), y RRRRRRRRRRLDWLKAFYDKVAEKLKEAF (SEQ ID NO: 648). En ciertos ejemplos descritos el alimento o
 ingrediente alimentario es eficaz para disminuir los niveles plasmáticos de ácido liofosfatídico (LPA) en un mamífero
 y/o para disminuir los niveles de SAA en dicho mamífero, y/o para aumentar la actividad de la paraoxonasa en plasma
 en dicho mamífero cuando dicho alimento o ingrediente alimentario se alimenta a dicho mamífero. En ciertos ejemplos
 el alimento o ingrediente alimentario es eficaz para disminuir los niveles en plasma de ácido liofosfatídico (LPA) en un
 mamífero cuando dicho alimento o ingrediente alimentario se alimenta a dicho mamífero. En ciertos ejemplos el
 65 alimento o ingrediente alimentario es eficaz para disminuir significativamente los niveles de SAA en un modelo de
 aterosclerosis en ratones cuando dicho alimento o ingrediente alimentario se alimenta a dicho ratón. En ciertos

ejemplos el alimento o ingrediente alimentario es eficaz para aumentar la actividad de la paraoxonasa en plasma en un mamífero, cuando dicho alimento o ingrediente alimentario se alimenta a dicho mamífero. En ciertos ejemplos el péptido en la planta transgénica que comprende el alimento o el ingrediente alimentario se expresa mediante un constructo de ácido nucleico integrado de manera estable en el genoma de dicha planta. En ciertas realizaciones la planta es una planta transformada por un agrobacterium que comprende un constructo que codifica el péptido. En ciertos ejemplos al menos una parte de la planta es comestible sin procesamiento. En ciertos ejemplos al menos una parte de la planta, cuando se procesa, es comestible. En ciertos ejemplos la planta que comprende el alimento o ingrediente alimentario es un tomate. En ciertos ejemplos la planta que comprende el alimento o ingrediente alimentario se selecciona entre el grupo que consiste en tomates, zanahorias, patatas, manzanas, peras, ciruelas, melocotones, naranjas, kiwis, papayas, piñas, guayaba, lilikoi, fruta estrella, lichi, mango, uva, granada, hojas de mostaza, kale, acelga, lechuga, soja, arroz, maíz y otros granos (por ejemplo, trigo, arroz, cebada, bulgur, farro, kamut, kaniwa, mijo, avena, quinoa, arroz, centeno, sorgo, espelta, teff, tritical, y similares), bayas como fresas, arándanos, moras, bayas de goji, y frambuesas, plátano, arroz, nabo, maíz, uva, higo, ciruela, patata, semillas de cártamo, nueces (por ejemplo, almendras, nogal, nueces pecanas, cacahuete, anacardo, macadamia, avellana, etc.), legumbres (por ejemplo, alfalfa, trébol, guisantes, judías (incluyendo judías negras), lentejas, altramuces, mezquite, algarroba, sojas, y similares). En ciertas realizaciones la planta que comprende el alimento o ingrediente alimentario se selecciona entre el grupo que consiste en tomate, arroz, tabaco, nabo, maíz, soja, uva, higo, ciruela, patata, zanahoria, granada, hojas de mostaza, acelga, kale, lechuga, brócoli, y semillas de cártamo. En ciertos ejemplos la parte de una planta transgénica que comprende el alimento o ingrediente alimentario comprende una o más partes de la planta seleccionadas entre el grupo que consiste en una fruta, una semilla, una nuez, una verdura de hoja, un tubérculo, un tallo, una flor, y una raíz. En ciertos ejemplos el péptido expresado en la planta se expresa bajo el control de un promotor CaMV o un promotor E8, o un promotor híbrido E4/E8. En ciertos ejemplos al menos una parte de la planta que comprende el alimento o ingrediente alimentario se seca y/o liofiliza, y/o se muele. En ciertas realizaciones toda la planta que comprende el alimento o ingrediente alimentario se seca y/o liofiliza, y/o se muele. En ciertos ejemplos el alimento o ingrediente alimentario es un componente de una dieta optimizada para un mamífero para el tratamiento y/o profilaxis de la aterosclerosis. En ciertos ejemplos el alimento o ingrediente alimentario es un componente de una dieta optimizada para un mamífero para el tratamiento y/o profilaxis de una patología caracterizada por una respuesta inflamatoria. En ciertos ejemplos el alimento o ingrediente alimentario es un componente de una dieta optimizada para un mamífero para el tratamiento y/o profilaxis de un cáncer. En ciertos ejemplos la dieta proporciona los requisitos nutricionales de un ser humano. En ciertos ejemplos la dieta es una dieta fija preparada para un ser humano. En ciertos ejemplos la dieta proporciona los requisitos nutricionales de un mamífero no humano. En ciertos ejemplos la dieta proporciona los requisitos nutricionales de un mamífero no humano seleccionado entre el grupo que consiste en un canino, un felino, un equino, un porcino, un bovino, y un lagomorfo. En ciertos ejemplos la dieta es una dieta fija preparada para el mamífero no humano. En ciertos ejemplos el alimento o ingrediente alimentario está formulado como un suplemento nutricional. En ciertos ejemplos el alimento o ingrediente alimentario comprende una fruta seca. En ciertos ejemplos el alimento o ingrediente alimentario comprende una fruta seca o liofilizada y en polvo. En ciertos ejemplos el alimento o ingrediente alimentario comprende un tomate. En ciertos ejemplos el alimento o ingrediente alimentario comprende una fruta seleccionada entre el grupo que consiste en una manzana, una pera, un melocotón, y una ciruela.

En ciertos ejemplos descritos los constructos descritos en el presente documento excluyen expresamente ApoA-^{Milano}. En ciertos ejemplos descritos los constructos descritos en el presente documento excluyen expresamente las semillas de cártamo.

Definiciones.

El índice inflamatorio de HDL se refiere a la capacidad de HDL para inhibir la actividad quimiotáctica de monocitos inducida por LDL. En ciertas realizaciones el índice inflamatorio de HDL se calcula comparando la actividad quimiotáctica de los monocitos generada por una LDL de control estándar en ausencia y presencia del ensayo de HDL. En ausencia del ensayo de HDL la actividad quimiotáctica de los monocitos se normaliza a 1,0. Si la actividad quimiotáctica de los monocitos aumenta con la adición de la HDL de ensayo el índice inflamatorio de HDL es > 1,0 y el HDL de ensayo se clasifica como proinflamatorio. Si la actividad quimiotáctica de los monocitos disminuye al agregar el HDL de ensayo el índice inflamatorio de HDL es < 1,0 y el HDL se clasifica como antiinflamatorio. Una reducción del índice inflamatorio de HDL se considera una mejora en el índice inflamatorio de HDL.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácido. Los términos se aplican a los polímeros de aminoácidos en donde uno o más restos de aminoácido son un análogo químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural, sin embargo un péptido expresado de manera recombinante consiste generalmente en aminoácidos que se encuentran todos en el organismo hospedador (por ejemplo, aminoácidos naturales).

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 contemplados en el presente documento pueden comprender dos o más (por ejemplo, 3, 4, 5, etc.) hélices anfipáticas.

La expresión "hélice anfipática de clase A" se refiere a una estructura proteica que forma una hélice α que produce una segregación de caras polares y no polares con los restos cargados positivamente que residen en la interfaz polar-no polar y los restos cargados negativamente que residen en el centro de la cara polar (ver, por ejemplo, Segrest *et al.* (1990) *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 8: 103-117).

La "apolipoproteína J" (apo J) se conoce con una variedad de nombres que incluyen clusterina, TRPM2, GP80, y SP 40 (ver, por ejemplo, Fritz (1995) Pp 112 En: *Clusterin: Role in Vertebrate Development, Function, and Adaptation* (Harmony JAK Ed.), R.G. Landes, Georgetown, TX.). Se describió por primera vez como una glicoproteína heterodimérica y un componente de las proteínas secretadas de células de Sertoli de rata cultivadas (ver, por ejemplo, Kissinger *et al.* (1982) *Biol. Reprod.*; 27: 233240). El producto traducido es una proteína precursora de una sola cadena que sufre escisión intracelular en una subunidad α de 34 kDa unida por disulfuro y una subunidad β de 47 kDa (ver, por ejemplo, Collard y Griswold (1987) *Biochem.*, 26: 3297-3303). Se ha asociado con lesión celular, transporte de lípidos, apoptosis y puede estar involucrado en la eliminación de los desechos celulares causados por lesión o muerte celulares. Se ha demostrado que la clusterina se une a una variedad de moléculas con alta afinidad incluyendo lípidos, péptidos, y proteínas y la sonda hidrófoba 1-anilino-8-naftalenosulfonato (Bailey *et al.* (2001) *Biochem.*, 40: 11828-11840).

La hélice anfipática de clase G se encuentra en proteínas globulares, y por tanto, la clase G nombrada. La característica de esta clase de hélice anfipática es que posee una distribución aleatoria de restos cargados positivamente y cargados negativamente en la cara polar con una cara estrecha no polar. Debido a la cara no polar estrecha esta clase no se asocia fácilmente con fosfolípidos (ver, por ejemplo, Segrest *et al.* (1990) *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. 8: 103-117; Erratum (1991) *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 9: 79). Varias apolipoproteínas intercambiables poseen características similares pero no idénticas a las de la hélice anfipática G. Similar a la hélice anfipática de clase G, esta otra clase posee una distribución aleatoria de restos cargados positiva y negativamente en la cara polar. Sin embargo, en contraste con la hélice anfipática de clase G que tiene una cara estrecha no polar, esta clase tiene una cara ancha no polar que le permite a esta clase unirse fácilmente a fosfolípido y la clase se denomina G' para diferenciarla de la clase G de la hélice anfipática (ver, por ejemplo, Segrest *et al.* (1992) *J. Lipid Res.*, 33: 141-166; Anantharamaiah *et al.* (1993) Pp. 109-142 En: *The Amphipathic Helix*, Epanand R. M. Ed CRC Press, Boca Raton, Florida). Los programas informáticos para identificar y clasificar los dominios helicoidales anfipáticos han sido descritos por Jones *et al.* (1992) *J. Lipid Res.* 33: 287-296) e incluyen, pero no se limitan al programa de rueda helicoidal (WHEEL o WHEEL/SNORKEL), programa de red helicoidal (HELNET, HELNET/SNORKEL, HELNET/Angle), programa para la adición de ruedas helicoidales (COMBO o COMBO/SNORKEL), programa para la adición de redes helicoidales (COMNET, COMNET/SNORKEL, COMBO/SELECT, COMBO/NET), programa de la rueda de consenso (CONSENSUS, CONSENSUS/SNORKEL), y similares.

El término "tratar" cuando se usa con referencia al tratamiento, por ejemplo una patología o enfermedad se refiere a la mitigación y/o eliminación de uno o más síntomas de esa patología o enfermedad, y/o una reducción en la tasa de aparición o gravedad de uno o más síntomas de esa patología o enfermedad, y/o la prevención de esa patología o enfermedad.

El término "mejorar" cuando se usa con respecto a "mejorar uno o más síntomas de aterosclerosis" se refiere a una reducción, prevención, o eliminación de uno o más síntomas característicos de la aterosclerosis y/o patologías asociadas. Tal reducción incluye, pero no se limita a una reducción o eliminación de fosfolípidos oxidados, una reducción de la formación y ruptura de placa aterosclerótica, una reducción de los sucesos clínicos como el ataque al corazón, angina, o apoplejía, una disminución de la hipertensión, una disminución de la biosíntesis de proteínas inflamatorias, reducción del colesterol plasmático, y similares.

Una "planta transgénica" es una planta que expresa en al menos algunas de las células de la planta un péptido heterólogo. En ciertas realizaciones el péptido heterólogo consiste en, o comprende la secuencia de aminoácidos de una o más apolipoproteínas o miméticos de apolipoproteína, por ejemplo, un mimético de apoA-I, y/o un péptido G *, y/o un péptido de apoE, por ejemplo, como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones la planta transgénica es una planta de la cual al menos una parte es comestible por un ser humano y/o por un mamífero no humano.

El término "actividad biológica" cuando se usa con respecto a un péptido de apolipoproteína, un péptido de apolipoproteína mimético, un péptido/proteína que comprende uno o más dominios miméticos de apolipoproteína y/o apolipoproteína indica que el péptido, cuando se alimenta a un mamífero disminuye los niveles plasmáticos de SAA, y/o aumenta la actividad de la paraoxonasa, y/o reduce los niveles de ácido lisofosfatídico, y/o reduce los niveles de metabolitos de los ácidos araquidónico y linoleico. Una planta transgénica o una parte de la misma que tiene actividad biológica indica que la planta o una parte de la misma cuando se alimenta a un mamífero reduce los niveles de SAA en plasma, y/o aumenta la actividad de paraoxonasa, y/o reduce los niveles de ácido lisofosfatídico, y/o reduce los niveles de metabolitos de los ácidos araquidónico y linoleico.

El término "ácido nucleico recombinante" como se usa en el presente documento se refiere a ácido nucleico, formado originalmente *in vitro*, en general, En una forma que no se encuentra normalmente en la naturaleza.

Una secuencia de codificación de ADN "heteróloga" es una secuencia de codificación estructural que no es nativa para la planta que se está transformando, o una secuencia de codificación que se ha diseñado para mejorar las características de su producto proteico. Heteróloga, con respecto al promotor, se refiere a una secuencia de codificación que no existe en la naturaleza en el mismo gen con el promotor al que está vinculado actualmente.

5 Un "promotor heterólogo" es un promotor manipulado de manera que controla la transcripción de un ácido nucleico que no es un ácido nucleico típicamente bajo la regulación de ese promotor.

10 Un "promotor regulable" es cualquier promotor cuya actividad se ve afectada por un factor de acción cis o trans (por ejemplo, un promotor inducible por etileno como el promotor E8 de tomate).

Un "promotor constitutivo" es cualquier promotor que dirige la transcripción del ARN en muchos o todos los tejidos de una planta transformante en la mayoría de los casos.

15 Un "promotor específico de tejido" es cualquier promotor que dirige la transcripción de ARN a niveles más altos en tipos particulares de células y tejidos (por ejemplo, un promotor específico de fruta).

20 Por "promotor" o "segmento promotor" (por ejemplo, un promotor E8 o un promotor E4 o un promotor E4/E8 híbrido de tomate) se entiende una secuencia de ADN que funciona solo como promotor o como componente de un promotor en el presente documento para dirigir la transcripción de un gen corriente abajo, y puede incluir segmentos promotores o promotores derivados mediante ligación con regiones operadoras, mutagénesis aleatoria o controlada, adición o duplicación de secuencias potenciadoras, adición o modificación con conectores sintéticos, y similares.

25 Por un promotor génico E8 o E4 se entiende un promotor obtenido a partir de un gen E8 o E4 que se considera que comparte la identidad de secuencia con las secuencias del gen E8 o E4 del tomate (por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 6.118.049), o una región particular o regiones de la misma, o de un gen que tiene al menos aproximadamente el 70 %, preferentemente al menos aproximadamente el 80 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 85 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente el 90 % de identidad de secuencia, o al menos aproximadamente el 95 % de identidad de secuencia, o al menos aproximadamente el 98 % de identidad de secuencia a lo largo de una secuencia de polinucleótidos correspondiente a las secuencias génicas de E8 de tomate o E4 de tomate.

35 La expresión "sustitución conservativa" se utiliza en referencia a proteínas o péptidos para reflejar sustituciones de aminoácidos que no alteran sustancialmente la actividad (por ejemplo, la capacidad para reducir la SAA, y/o la capacidad para aumentar la paroxonasa en un mamífero. Normalmente las sustituciones de aminoácidos conservativas implican la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). Los siguientes seis grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas típicas entre sí: 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

45 Un "componente macro-lipídico de la dieta" se refiere a un componente lipídico de la dieta de un mamífero que suele estar presente en miligramos por gramo de dieta. En una dieta occidental tales componentes de macro-lipídicos incluyen típicamente, pero no se limitan a fosfolípidos como fosfatidilcolina y esteroides como colesterol. Incluso es posible que la lisofosfatidilcolina esté presente en cantidades de miligramos después de que actúe sobre la fosfatidilcolina en el Duodeno mediante PLA₂ y por lo tanto, en diversas realizaciones, se puede considerar un componente macro-lipídico.

50 Un "componente micro-lipídico de la dieta" se refiere a un componente lipídico de la dieta de un mamífero que suele estar presente en microgramos (o menos) cantidades por gramo de dieta. Los componentes microlipídicos ilustrativos incluyen típicamente, pero no se limitan a ácido lisofosfatídico, ácido fosfatídico, y similares.

Breve descripción de los dibujos

55 La Figura 1 muestra la actividad de varios péptidos en la inhibición de la actividad quimiotáctica de los monocitos, una medida de actividad peptídica. Esta figura se ha adaptado a partir de sido adaptada de la Figura 5 en Datta *et al.* (2001) J. Lipid Res. 42: 1096-1104, y demuestra la eficacia equivalente de los péptidos 4F, 5F y 6F en un ensayo *in vitro*.

60 La Figura 2 muestra diagramas de rueda helicoidal de péptidos α -helicoidales 4F (SEQ ID NO: 15), 5F (SEQ ID NO: 3), y 6F (SEQ ID NO: 17).

65 La Figura 3 muestra que L-6F dietético (sin grupos bloqueadores) reduce SAA en ratones con deficiencia de ApoE. Grupos de ratones hembra nulos para apoE (n = 20) de 16 a 18 meses de edad, se mantuvieron con pienso para roedores que no contenía péptido (Pienso) o que contenían 1,2 mg de L-6F sin grupos terminales bloqueados por 4 gramos de pienso (Pienso + L-6F), proporcionando una dosis de ~60 mg/kg/día de L-6F sin grupos finales

bloqueados. Los ratones de ambos grupos consumieron aproximadamente 4 gramos de pienso al día. Así, L-6F solo constituía ~0,03 % de la dieta en peso. El día 10 se extrajo sangre, el plasma se separó y el suero amiloide A (SAA) se determinó mediante ELISA.

5 La Figura 4 ilustra la expresión del péptido 6F en plantas. Básicamente se produce un ácido nucleico (SEQ ID NO: 4) que codifica el péptido 6F (SEQ ID NO: 17) unido a un péptido señal (SEQ ID NO: 2). El ácido nucleico es optimizado con codón para la expresión en una planta de tomate.

10 Figura 5. La cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* se transformó con el vector que se muestra en la Figura 15 con o sin la secuencia para 6F que se muestra en la Figura 4. El plásmido p6F se sometió a electroporación en la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*, y se verificaron secuencialmente cuatro colonias que albergan el vector binario (UCLA GeneSeq Core) y se usaron adicionalmente para la transformación de plantas.

15 La Figura 6 muestra el NPT II que confiere resistencia a kanamicina y que se incluyó en el vector descrito en la Figura 15 y se expresó en algunas de las plantas transformadas (+) pero no en todas (-).

20 La figura 7 muestra selección y análisis de plantas transgénicas. El panel superior muestra imágenes de plantas ejemplo seleccionadas en kanamicina. El panel inferior muestra ejemplos de plantas con PCR positiva de las 33 plantas positivas que figuran en la parte inferior del panel inferior. Aproximadamente 120 plantas fueron finalmente sometidas a ensayo.

25 La Figura 8 muestra que la expresión transgénica de 6F aumenta dramáticamente con la oxidación asociada con la maduración (es decir, cuando los tomates verdes se vuelven rojos). se desarrollaron geles SDS después de cargar 2 µg de L-6F sintético sin grupos bloqueadores, o 100 µg de extracto de proteína de un tomate de tipo silvestre de control (Tomate Wt) o 100 µg de extracto de proteína de tomates 17A transgénicos que se recolectaron Verdes (G) o Rojos (R). La flecha apunta al área del gel donde se desarrolló el péptido L-6F. Los círculos indican las bandas en cada calle que contienen el péptido L-6F sintético auténtico (primera calle a la izquierda en la parte inferior del gel) o el péptido 6F supuesto que solo se vio en los extractos de proteínas de los tomates rojos madurados (R)

30 La Figura 9 muestra tomates liofilizados de la línea 17a-4 transgénica 6F y los tomates de tipo silvestre de control.

La Figura 10 muestra diferentes partes de los tomates liofilizados que se muestran en la Figura 9.

35 Figura 11. Cinco gramos (5 g) de material liofilizado se mezclaron completamente con 14 gramos (14 g) de Dieta Occidental en polvo para obtener el material que se muestra en el panel superior. La escala en la parte inferior indica que el peso total fue de 19 gramos.

40 Figura 12. El material liofilizado que se muestra en la Figura 11 se mezcló en una cantidad mucho mayor de Dieta Occidental en polvo que se muestra en el recipiente de mezcla. Después de la mezcla, la dieta contenía 2,2 % de tomates madurados liofilizados. Como se muestra en la Figura 13 a continuación no hubo diferencia en el aspecto de la dieta preparada a partir del control de tipo silvestre (WT) o los tomates transgénicos 6F (17a-4).

45 La Figura 13 muestra la apariencia de la Dieta Occidental que contiene material liofilizado de tomates maduros de tipo silvestre o transgénicos 6F.

50 Figura 14. Los tomates liofilizados madurados que expresan el péptido 6F (Tomate Transgénico, 17A) disminuyeron significativamente los niveles de amiloide A sérico (SAA) en ratones sin LDLR en una dieta occidental. Se proporcionaron dieciséis gramos de dieta occidental compacta que no contenía tomates liofilizados (n = 20) o que contenía tomates de control liofilizados (tipo silvestre) (n = 8), o que contenían tomates 6F transgénicos liofilizados de la línea 17A (n = 8) para cada jaula de 4 ratones hembras nulos para LDLR (10 semanas de edad) cada noche durante 2 semanas. El tomate liofilizado agregado a la dieta occidental representó el 2,2 % de la dieta total en peso tanto para el control como para los tomates transgénicos 6F. Los ratones en todas las jaulas comieron toda la dieta cada noche. Los ratones que recibieron los tomates transgénicos 6F recibieron 800 µg de 6F por ratón por día (40 mg/kg/ratón/día) según se determinó mediante análisis LC-ESI-MS/MS. Después de dos semanas se extrajo sangre a los ratones y los niveles plasmáticos de amiloide A (SAA) se determinaron mediante ELISA.

60 La Figura 15 proporciona un diagrama esquemático del casete pBI 121 -p6F de longitud completa. El panel superior muestra el vector pBI121, que se menciona en los ejemplos como vector vacío (EV). El panel inferior muestra el vector para expresar el péptido 6F en donde el gen *GLUS* ha sido reemplazado en el sitio XbaI/SacI por el péptido señal derivado de la planta (SP) y el gen que codifica 6F bajo el promotor CaMV35S y el terminador de la nopalina sintasa (término NOS) como se describe en el Ejemplo 3.

65 Las Figuras 16A-16C muestran que el péptido 6F sintetizado a partir de todos los L-aminoácidos sin grupos de bloqueo terminal cuando se alimentaron a ratones apoE^{-/-} redujeron significativamente los niveles plasmáticos de

amiloides A (SAA) y disminuyeron el porcentaje de aorta con lesiones ateroscleróticas. Figura 16A: Los grupos de ratones hembras apoE^{-/-} (n = 20) de 16 a 18 meses de edad se mantuvieron con pienso para roedores que no contenía péptido (Pienso) o que contenía 1,2 mg del péptido 6F sin grupos de bloqueo terminales por 4 gramos de pienso (Pienso + L-6F) que proporciona una dosis de ~60 mg/kg/día de péptido. Los ratones de ambos grupos consumieron aproximadamente 4 gramos de pienso por ratón por día. El péptido constituía ~0,03 % de la dieta en peso. Después de 10 días se extrajo sangre a los ratones y los niveles de SAA se determinaron mediante ELISA como se describe en los Materiales y Métodos en el Ejemplo 3. Figura 16B: Grupos de ratones hembra apoE^{-/-} de 4 a 6 meses de edad fueron alimentados con una dieta occidental (WD) que no contenía o que contenía L-6F sin grupos de bloqueo terminal (WD + 6F) a una dosis de 60 mg/kg/día del péptido. Después de 6 semanas a los ratones se les extrajo sangre y los niveles de SAA en plasma se determinaron mediante ELISA como se describe en Materiales y Métodos en el Ejemplo 3. Figura 16C: Grupos de ratones hembras apoE^{-/-} de 6 a 8 meses de edad (n = 30 por grupo) recibieron WD que no contenía péptido (sin péptido) o contenían L-6F sin grupos de bloqueo terminal (L-6F) en una dosis de 60 mg/kg/día de péptido. Después de 7 semanas el porcentaje de aorta con lesiones ateroscleróticas se determinó por análisis facial como se describe en Materiales y Métodos en el Ejemplo 3.

La Figura 17 muestra que los geles SDS PAGE en la mayoría de las líneas de tomate (pero no en todas) que fueron positivos para el gen 6F contenían una banda que migró con los 6F auténticos sintetizados químicamente sin grupos finales de bloqueo. Las proteínas se extrajeron de los tomates derivados de líneas de plantas que se muestran en la Figura. Todos excepto los de tipo silvestre (WT) fueron positivos para PCR para el gen 6F. Se agregaron 100 µg de proteína de cada línea de tomate a cada calle y se desarrollaron en geles SDS PAGE utilizando el protocolo descrito en los Materiales y Métodos en el Ejemplo 3. La línea 95 fue positiva para el gen 6F pero no expresó el péptido lo que sugiere que el gen se insertó en el genoma en una ubicación que no permitía la expresión a nivel de proteína.

Las Figuras 18A y 18B muestran que las regiones de geles SDS PAGE que contienen una banda que migra con 6F auténtico demostraron la firma de LC-ESI-MS de 6F (Fig. 18A) mientras que la misma región en geles sin banda no lo hizo (Fig. 18B). Después de HPLC y SDS PAGE, la región en cada calle correspondiente a 6F en el recuadro se escindió y la tripsina en gel se sometió a digestión y se sometió a un análisis LCESI-MS utilizando un espectrómetro de masas con trampa de iones LCQ Advantage Max (ThermoElectron, Inc.) equipado con una fuente de ionización por electrospray como se describe en Materiales y Métodos en el Ejemplo 3. La Figura 18A demuestra que las bandas que migran de forma similar a la 6F auténtica (flecha en el recuadro) exhibieron la firma ESI-MS para 6F mientras que la misma región de aquellas calles sin bandas en esta región del gel (flecha en el recuadro) no lo hacían (Figura 18B). En el recuadro EV = una línea de tomate de vector vacío (el tomate de control); 1A = una línea de tomate transgénica para 6F; M = marcadores moleculares.

Las Figuras 19A-19K muestran que la alimentación de tomates 6F transgénicos a ratones LDLR^{-/-} durante dos semanas mejoró un número de biomarcadores plasmáticos. Los ratones hembra LDLR^{-/-} de 10 semanas de edad se alojaron cuatro en cada jaula y a cada jaula se le administró cada noche WD compactado que no contenía tomates liofilizados (n = 20), o WD compactado que contenía 2,2 % en peso de tipo silvestre liofilizado molido (WT) tomate (n = 8), o WD compactado que contenía 2,2 % en peso de tomate 6F transgénico liofilizado molido (Tg6F). Los ratones en todas las jaulas comieron toda la dieta cada noche. Los ratones que recibieron los tomates Tg6F recibieron 800 µg de 6F por ratón por día (40 mg/kg/día). Después de dos semanas a los ratones se les extrajo sangre y se midieron los siguientes biomarcadores de plasma: Fig. 19A: Suero Amiloide A (SAA); Fig. 19B: actividad de paraoxonasa-1 (PON); Fig. 19C: ácido lisofosfatídico 16:0 (LPA 16:0); Fig. 19D: ácido lisofosfatídico 18:0 (LPA 18:0); Fig. 19E: ácido lisofosfatídico 18:1 (LPA 18:1); Fig. 19F: ácido lisofosfatídico 20:4 (LPA 20:4); Fig. 19G: niveles de 5-HETE libre; Fig. 19H: niveles de 15-HETE libre; Fig. 19I: Niveles de PGD2 libre; Fig. 19J: Niveles de PGE2 libre; Fig. 19K: colesterol-HDL. Las mediciones se realizaron como se describe en Materiales y Métodos en el Ejemplo 3 (los niveles de LPA se determinaron por LC-ESI-MS/MS).

La Figura 20 muestra que el contenido de licopeno de los tomates transgénicos 6F es un poco pero significativamente menor que el de los tomates de tipo silvestre o de vectores vacíos. El contenido de licopeno de los tomates maduros que eran de tipo silvestre (WT), transgénicos para 6F (1A; 17A), o vector vacío (108; 110) se determinó como se describe en Materiales y Métodos en el Ejemplo 3.

Las Figuras 21A-21I muestran que la alimentación de tomates transgénicos 6F a ratones LDLR^{-/-} durante 13 semanas mejoró varios biomarcadores plasmáticos. Se alojaron cuatro ratones LDLR^{-/-} de 7 a 9 meses de edad en cada jaula y cada jaula recibió cada noche WD compactado que no contenía tomates liofilizados (n = 28), o WD compactado que contenía 2,2 % en peso de tomate vector vacío liofilizado molido (EV) (de la línea 110) (n = 20), o WD compactado que contenía 2,2% en peso de tomate 6F transgénico liofilizado molido (Tg6F) (de la línea 17A) para proporcionar 900 µg de 6F por ratón por día (45 mg/kg/día). Los ratones en todas las jaulas comieron toda la dieta cada noche. Después de 13 semanas a los ratones se les extrajo sangre y se realizaron las siguientes mediciones como se describe en Materiales y Métodos en el Ejemplo 3. Fig. 21A: Suero Amiloide A (SAA); Fig. 21B: Colesterol Total; Fig. 21C: Triglicéridos; Fig. 21D: actividad de Paraoxonasa-1 (PON); Fig. 21E: colesterol-HDL; Fig. 21F: Ácido lisofosfatídico (LPA) 18:1; Fig. 21G: LPA 18:2; Fig. 21H: LPA 20:4; Fig. 21I: Peso corporal.

Las Figuras 22A-22E muestran que la alimentación de tomates vector vacío (EV) y transgénicos 6F disminuyó algunos biomarcadores y aumentó otros. El plasma de los ratones descritos en la Figura 21 se analizó como se describe en Materiales y Métodos para la Figura 22A: Ácido araquidónico libre; Figura 22B: 5-HETE libre; Figura 22C: 15-HETE libre; Figura 22D: DHA libre; Figura 22E: EPA libre.

La Figura 23 muestra que la alimentación de tomates transgénicos 6F pero no de EV disminuyó significativamente el porcentaje de aorta con lesiones ateroscleróticas. La aorta de los ratones descritos en la Figura 21 se recolectó y analizó para determinar el porcentaje de aorta con lesiones ateroscleróticas como se describe en Materiales y Métodos en el Ejemplo 3. La aorta de uno de los ratones alimentados con transgénicos 6F se dañó gravemente durante la recolección y no se procesó. Las aortas de todos los otros ratones fueron cosechadas, procesadas y analizadas exitosamente.

Las Figuras 24A-24E muestran que el porcentaje de aorta con lesiones ateroscleróticas en ratones que recibieron WD y tomates transgénicos 6F se correlacionó positiva y significativamente con el colesterol total en plasma y los triglicéridos y se correlacionó de manera significativa e inversa con la actividad de PON y el colesterol HDL. No hubo correlación con el peso corporal. La regresión lineal de datos de ratones individuales descritos en las Figuras 21-23 que recibieron WD y tomates transgénicos 6F se muestra para el porcentaje de aorta con lesiones ateroscleróticas y en la Figura 24A: Colesterol Total en Plasma; Figura 24B: Triglicéridos en Plasma; Figura 24C: Niveles de colesterol HDL en plasma; Figura 24D: Actividad de PON en plasma; Figura 24E: Peso corporal.

Las Figuras 25A-25F muestran que la adición de tomates transgénicos 6F (Tg6F) a la Dieta Occidental (WD) redujo significativamente los niveles de ácido lisofosfatídico (LPA) en el intestino delgado, mientras que la adición de los tomates vector vacío (EV) no lo hizo. Los niveles de LPA 18:2 y LPA 20:4 se determinaron por LC-ESI-MS/MS en un subconjunto aleatorio de los ratones descritos en las Figuras 21-23 como se describe en Materiales y Métodos en el Ejemplo 3. Fig. 25A: LPA 18:2 en el duodeno. Fig. 25B: LPA 20:4 en el duodeno. Fig. 25C: LPA 18:2 en el yeyuno. Fig. 25D: LPA 20:4 en el yeyuno. Fig. 25E: LPA 18:2 en el íleon. Fig. 25F: LPA 20:4 en el íleon.

Las figuras 26A-26F muestran que los niveles de LPA en el intestino delgado se correlacionaron significativamente con el porcentaje de aorta con lesiones ateroscleróticas. Los niveles de LPA en el intestino delgado de los ratones descritos en las Figuras 25A-25F se representaron en función del porcentaje de aorta con lesiones para cada ratón, y se realizó una regresión lineal como se describe en Materiales y Métodos en el Ejemplo 3. Fig. 26A: LPA 18:2 duodeno. Fig. 26B: LPA 20:4 duodeno. Fig. 26C: LPA 18:2 yeyuno. Fig. 26D: LPA 20:4 yeyuno. Fig. 26E: LPA 18:2 íleon. Fig. 26F: LPA 20:4 íleon.

Figura 27. Se proporcionó Dieta Occidental Compacta (DW) que no contenía tomates liofilizados o que contenía tomates de control liofilizados molidos o que contenía tomates transgénicos 6F liofilizados molidos para cada jaula de 4 ratones hembras LDLR^{-/-} cada noche. El ejemplo que se muestra es de ratones que recibieron tomate 6F transgénico al 2,2 % en peso de WD.

Figura 28A. Los ratones hembra apoE^{-/-} de 6 a 7 meses de edad (n = 19 por grupo) se colocaron en WD durante una semana. Posteriormente, se continuó con WD y no recibieron péptido o WD más L-6F sin grupos de bloqueo final en una dosis de 60 mg/kg/día o recibieron la misma dosis de péptido, pero que primero se agregó a un tomate madurado homogeneizado y luego se mezcló en WD para que el tomate homogeneizado constituyera el 20 % en peso de la dieta. Después de una semana a los ratones se les extrajo sangre y los niveles de SAA en plasma se determinaron como se describe en Materiales y Métodos en el Ejemplo 3. Figura 28B. Grupos de ratones hembra apoE^{-/-} (ApoE Nulo) de 12 meses de edad recibieron WD que contenían un 10 % de tomate madurado homogeneizado durante 3 semanas sin o con L-6F sin grupos terminales de bloqueo a una dosis de 60 mg/kg/día (n = 14 por grupo). Los ratones hembra LDLR^{-/-} (LDLR Nulo) de 7 a 8 meses de edad fueron tratados de manera similar (n = 14). Después de 3 semanas a los ratones se les extrajo sangre y se determinaron los niveles de ácido lisofosfatídico en plasma mediante ELISA como se describe en Materiales y Métodos en el Ejemplo 3.

La Figura 29 muestra un gel SDS de una línea homocigótica de control y de dos líneas homocigotas (1A y 17A) que expresan 6F. Las proteínas se extrajeron de una línea de tomates homocigotos de control y se identificaron dos líneas homocigotas que expresaban el péptido 6F (1A y 17A) y las proteínas se sometieron a SDS PAGE como se describe en Materiales y Métodos del Ejemplo 3. La calle que contiene el 6F sintetizado químicamente auténtico no se muestra en la figura.

Figura 30A: Se alojaron cuatro ratones LDLR^{-/-} de 4 a 5 meses de edad en cada jaula y cada jaula recibió cada noche WD compactado que no contenía tomates liofilizados (n = 20), o WD compactado que contenía 2,2 % en peso de vector vacío liofilizado molido (EV) tomate (n = 8), o WD compactado que contenía 2,2 % en peso de tomate transgénico liofilizado molido 6F (Tg6F). Los ratones en todas las jaulas comieron toda la dieta cada noche. Los ratones que recibieron los tomates Tg6F recibieron 800 µg de 6F por ratón por día (40 mg/kg/día). Después de dos semanas a los ratones se les extrajo sangre y se determinó el suero de plasma amiloide A (SAA) por ELISA como se describe en Materiales y Métodos del Ejemplo 3. Figura 30B: La actividad de paraoxonasa-1 (PON) se determinó en el plasma de los ratones descritos en la Fig. 30A como se describe en Materiales y Métodos del Ejemplo 3. Fig. 30C: Los niveles de 5-HETE se determinaron en el plasma de los ratones descritos en la Fig. 30A

como se describe en Materiales y Métodos del Ejemplo 3. Figura 30D: Los niveles de 15-HETE se determinaron en el plasma de los ratones descritos en la Fig. 30A como se describe en Materiales y Métodos del Ejemplo 3. Figura 30E: Los niveles de PGD2 se determinaron en el plasma de los ratones descritos en la Fig. 30A como se describe en Materiales y Métodos del Ejemplo 3. Figura 30F: Los niveles de PGE2 se determinaron en el plasma de los ratones descritos en la Fig. 30A como se describe en Materiales y Métodos del Ejemplo 3. Figura 30G: Los niveles de colesterol HDL se determinaron en el plasma de los ratones descritos en la Fig. 30A como se describe en Materiales y Métodos del Ejemplo 3.

Figura 31 A: La regresión lineal de los datos de ratones individuales descritos en las Figuras 21-23 se muestra para el porcentaje de aorta con lesiones ateroscleróticas y niveles plasmáticos de ácido lisofosfatídico (LPA) 16:0. Figura 31B: La regresión lineal de los datos de ratones individuales descritos en las Figuras 21-23 se muestra para el porcentaje de aorta con lesiones ateroscleróticas y niveles plasmáticos de LPA 18:0. Figura 31C: La regresión lineal de los datos de ratones individuales descritos en las Figuras 21-23 se muestra para el porcentaje de aorta con lesiones ateroscleróticas y niveles plasmáticos de LPA 18:1. Figura 31D: La regresión lineal de los datos de ratones individuales descritos en las Figuras 21-23 se muestra para el porcentaje de aorta con lesiones ateroscleróticas y niveles plasmáticos de LPA 18:2. Figura 31E: La regresión lineal de los datos de ratones individuales descritos en las Figuras 21-23 se muestra para el porcentaje de aorta con lesiones ateroscleróticas y niveles plasmáticos de LPA 20:4.

Figura 32A: El contenido de colesterol del duodeno se midió en un subconjunto aleatorio de ratones en las Figuras 21-23 como se describe en Materiales y Métodos del Ejemplo 3. Figura 32B: El contenido de colesterol del yeyuno se midió en los ratones descritos en la Figura 32A como se describe en Materiales y Métodos del Ejemplo 3. Figura 32C: El contenido de colesterol del íleon se midió en los ratones que se muestran en la Figura 32A como se describe en Materiales y Métodos del Ejemplo 3. Figura 32D: El contenido de colesterol del duodeno de los ratones descritos en la Figura 32A se representó en función del porcentaje de aorta con lesiones para cada ratón y se realizó una regresión lineal como se describe en Materiales y Métodos del Ejemplo 3. Figura 32E: El contenido de colesterol del yeyuno de los ratones descritos en la Figura 32B se representó en función del porcentaje de aorta con lesiones para cada ratón y se realizó una regresión lineal como se describe en Materiales y Métodos del Ejemplo 3. Figura 32F: El contenido de colesterol en el íleon de los ratones descritos en la Figura 32C se representó en función del porcentaje de aorta con lesiones para cada ratón y se realizó una regresión lineal como se describe en Materiales y Métodos del Ejemplo 3.

La Figura 33 muestra que el péptido 6F intacto se identifica en el intestino delgado pero no en el plasma. Ratones hembra LDLR^{-/-} de 8 a 9 meses de edad (n = 6) se mantuvieron en ayunas durante la noche y se alimentaron con WD con polvo de tomate liofilizado transgénico 6F agregado a WD para proporcionar 900 µg de 6F en 2 gramos de dieta. Durante un período de 30 - 90 minutos, cada ratón comió los 2 gramos de dieta. Aproximadamente 2 horas después de terminar el alimento a los ratones se les extrajo sangre y se obtuvo el intestino delgado (incluyendo contenidos), se homogenizó en acetonitrilo: agua (1:1), cromatografiada por HPLC y sometido a SDS PAGE como se describe en Materiales y Métodos del Ejemplo 3. El plasma se liofilizó y se resuspendió en acetonitrilo: agua (1:1), cromatografiada por HPLC y sometido a SDS PAGE como se describe en Materiales y Métodos del Ejemplo 3. Se aplicaron 12,5, 25 y 37,5 µg, de 6F sintetizado químicamente sin grupos de bloqueo terminal en las calles 1, 2 y 3, respectivamente. Se aplicó plasma después de HPLC de 4 de los 6 ratones a las calles 5, 6, 7 y 8. Se aplicó el intestino delgado después de HPLC de los cuatro ratones mostrados en las calles 5, 6, 7 y 8 a las calles 10, 11, 12 y 13, respectivamente. La calle de la derecha contiene marcadores de peso molecular. Las calles se escanearon para su cuantificación como se describe en Materiales y Métodos del Ejemplo 3.

La Figura 34 ilustra la estructura del vector plásmido pBI 121.

La Figura 35 muestra la secuencia de ácidos nucleicos del promotor E8 y la secuencia parcial 5'UTR (ADN de 2191 pb, SEQ ID NO: 5) del gen de maduración de la fruta sensible al etileno de *Lycopersicon esculentum*.

La Figura 36 muestra un gel de SDS PAGE que ilustra el aislamiento del hueso pBI121 del vector después de la digestión en H_{ind}III/BamHI.

La Figura 37 ilustra la amplificación por PCR del fragmento del promotor E8.

La Figura 38 ilustra la confirmación de PCR de las colonias +ve.

La Figura 39 muestra los resultados de una digestión con *Hin* D III/*Bam* HI.

Descripción detallada

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones. Cualquier materia objeto descrita en el presente documento que se encuentre fuera del alcance de las reclamaciones se proporciona solo con fines informativos. Fue un descubrimiento sorprendente que el intestino delgado fuera un importante sitio de acción para varios péptidos

miméticos de apoA-I, como 4F, 6F, y similares. También se determinó que las dosis altas de tales péptidos son deseables para lograr una eficacia óptima. Sin embargo, debido a que estos péptidos se administran normalmente a diario y el coste diario de producción costaría miles de dólares por día por persona, antes de los descubrimientos descritos en el presente documento, estos péptidos no tienen probabilidades de encontrar un uso terapéutico.

Fue un descubrimiento sorprendente que fuera posible producir líneas de plantas transgénicas estables que expresan péptidos terapéuticos (por ejemplo, péptidos de apolipoproteína y péptidos miméticos de apolipoproteína), especialmente los péptidos miméticos de ApoA-I, y los péptidos relacionados descritos en el presente documento, que tienen actividades biológicas deseadas (por ejemplo, una reducción de SAA, un aumento de la actividad de paraoxonasa plasmática, y similares). También fue un descubrimiento sorprendente que las plantas transfectedas con éxito (o partes de las mismas) pudieran simplemente incorporarse a la dieta del sujeto a "tratar" y al péptido(s) expresado(s), cuando se consume como aditivo alimentario, muestran actividad terapéutica y/o profiláctica en el sujeto (por ejemplo, como se evidencia utilizando biomarcadores apropiados, por ejemplo, disminución de los niveles de SAA y/o aumento de la actividad de la paraoxonasa en plasma, *etc.*). Se cree que tal descubrimiento es contrario al dogma prevalente de que los péptidos terapéuticos expresados en plantas deben ser purificados (por ejemplo, aislados del tejido de la planta) para ser utilizados como un agente terapéutico y/o profiláctico relevante.

En particular, se demostró que los ratones alimentados con tejido liofilizado de un tomate transgénico que expresaba el péptido 6F mostraron una disminución en los niveles de SAA y un aumento en la actividad de la paraoxonasa en plasma. También, se demostró que aproximadamente 2 horas después de que los ratones terminaran de comer una dieta occidental rica en grasas y alta en grasas complementada con la planta transgénica que expresa 6F, el péptido 6F intacto se detectó en el intestino delgado de los ratones, pero no fue encontrado en su sangre. Esto sugiere fuertemente que el péptido actúa en el intestino delgado y luego se degrada antes de ser absorbido como componente de aminoácidos. Esto indica que los péptidos actúan en el intestino y no deberían tener efectos directos en otros órganos además del intestino y sugiere que la administración de las plantas transgénicas descritas en el presente documento (o partes/tejidos de los mismos) tiene un alto grado de seguridad. También se observó que el contenido de tejido del ácido lisofosfatídico (18:2 y 20:4) disminuyó significativamente en el intestino delgado después de alimentar los tomates transgénicos 6F pero no después de alimentar a los tomates de control. Los niveles tisulares de ácido lisofosfatídico en el intestino delgado (pero no los niveles de colesterol en el intestino delgado) se correlacionaron significativamente con el porcentaje de aorta con lesiones ateroscleróticas lo que sugiere que un efecto beneficioso importante de los tomates transgénicos 6F está mediado por la disminución de los niveles de ácido lisofosfatídico en el intestino delgado. Nuevamente es un descubrimiento sorprendente que el consumo de la planta transgénica (o parte/tejido(s) de la misma) pudieran producir efectos tales como el enfoque predominante es purificar (por ejemplo, aislar del tejido vegetal) el péptido(s) deseado(s) a utilizar como un agente terapéutico y/o profiláctico relevante.

Por consiguiente, en diversas realizaciones, se proporcionan plantas transgénicas que comprenden células que expresan un péptido que consiste en o que comprende, uno o más dominios que comprenden la secuencia de aminoácidos de una apolipoproteína o mimético de apolipoproteína, por ejemplo, un péptido mimético ApoA-I y/o un péptido G*, y/o un péptido apoE, y/o cualquier otro péptido terapéutico descrito en el presente documento. En diversas realizaciones el péptido se expresa en niveles suficientes para disminuir los niveles de SAA en un mamífero y/o para disminuir el contenido de tejido de ácido lisofosfatídico (18:2 y 20:4) en el intestino delgado, cuando la planta o una porción/parte de la misma se alimenta al mamífero (por ejemplo, a un modelo de aterosclerosis de ratón), y/o para aumentar la actividad de la paraoxonasa en plasma cuando la planta, o una parte de la misma, se alimenta al mamífero. Las plantas transgénicas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a tomates transgénicos, zanahoria transgénica, patata transgénica, manzana transgénica, pera transgénica, ciruela transgénica, melocotón transgénico, naranja transgénica, kiwi transgénico, payaya transgénica, piña transgénica, guayaba transgénica, lilikoi transgénico, fruta estrella transgénica, lichi transgénico, mango transgénico, uva transgénica, granada transgénica, hojas de mostaza transgénicas, kale transgénica acelgas transgénicas, lechuga transgénica, soja transgénica, arroz transgénico, maíz transgénico y otros granos (por ejemplo, trigo, arroz, cebada, bulgur, farro, kamut, kaniwa, mijo, avena, quinoa, arroz, centeno, sorgo, espelta, teff, tritical, y similares), bayas transgénicas como fresas, arándanos, moras, bayas de goji, y frambuesas, plátano transgénico, arroz transgénico, nabo transgénico, maíz transgénico, uva transgénica, higo transgénico, ciruela transgénica, patata transgénica, semillas de cártamo transgénicas, nueces transgénicas (por ejemplo, almendras, nogal, nueces pecanas, cacahuete, anacardo, macadamia, avellana, *etc.*), leguminosas transgénicas (por ejemplo, alfalfa, trébol, guisantes, judías (incluyendo judías negras), lentejas, altramuces, mezquite, algarroba, sojas, y similares), y tabaco transgénico.

En ciertas realizaciones el péptido que se expresa comprende una única secuencia de apolipoproteína o secuencia mimética de apolipoproteína, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos del péptido mimético ApoA-I (ver, por ejemplo, Tabla 1), o una sola secuencia de aminoácidos del péptido G* (verpor ejemplo, Tabla 2), y/o una única secuencia de aminoácidos del péptido ApoE (ver, por ejemplo, Tabla 3), o un único péptido terapéutico descrito en el presente documento. En diversas realizaciones el péptido comprende dos o más dominios cada uno de los cuales comprende o consiste en una secuencia mimética de apolipoproteína o apolipoproteína, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos del péptido mimético ApoA-I (verpor ejemplo, Tabla 1), y/o una secuencia de aminoácidos del péptido G* (ver, por ejemplo, Tabla 2), y/o una secuencia de aminoácidos del péptido apoE (verpor ejemplo, Tabla 3), y/u otro péptido terapéutico descrito en el presente documento. En ciertas realizaciones el péptido que se expresa comprende al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al

5 menos 15, al menos 20, al menos 25, de tales dominios. Los dominios pueden ser iguales o diferentes de una
 secuencia de aminoácidos del péptido mimético de ApoA-I (ver, por ejemplo, Tabla 1), y/o una secuencia de
 aminoácidos del péptido G* (verpor ejemplo,Tabla 2), y/o una secuencia de aminoácidos del péptido apoE (ver, por
 ejemplo, Tabla 3), y/u otro péptido terapéutico descrito en el presente documento. Los diversos dominios pueden estar
 10 directamente vinculados entre sí o pueden estar separados por uno o más aminoácidos. En ciertas realizaciones los
 dominios están separados por una sola prolina (P), o por dos prolinas (PP), o por tres prolinas (PPP), o por una sola
 alanina (A) o por dos alaninas (AA), o por tres alaninas (AAA). En ciertas realizaciones los dominios están separados
 por una región conectora KVEPLRA (SEQ ID NO: 6), recién conectora GGG, o por una región conectora GGGG (SEQ
 ID NO: 7), o por una región conectora GGGGS (SEQ ID NO: 8) o una región conectora (GGGGS)₂ (SEQ ID NO: 9), o
 15 por una región conectora (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 10). En ciertas realizaciones los dominios están separados entre
 sí por 1 aminoácido, o por 2 aminoácidos, o por 3 aminoácidos, o por 4 aminoácidos, o por 5 aminoácidos, o por 6
 aminoácidos, o por 7 aminoácidos, o por 8 aminoácidos, o por 9 aminoácidos, o por 10 o más aminoácidos, o por 15
 o más aminoácidos, o por 20 o más aminoácidos, o por 25 o más aminoácidos, o por 30 o más aminoácidos, o por 35
 20 o más aminoácidos, o por 40 o más aminoácidos, o por 45 o más aminoácidos, o por 55 o más aminoácidos. En ciertas
 realizaciones el péptido expresado varía en longitud de aproximadamente 5 aminoácidos, o aproximadamente 6
 aminoácidos, o aproximadamente 7 aminoácidos, o aproximadamente 8 aminoácidos, o aproximadamente 9
 aminoácidos, o aproximadamente 10 aminoácidos, o aproximadamente 12 aminoácidos, hasta una longitud de
 aproximadamente 15 aminoácidos, o hasta una longitud de aproximadamente 18, o hasta una longitud de
 aproximadamente 20 aminoácidos, o hasta una longitud de aproximadamente 30 aminoácidos, o hasta una longitud
 25 de aproximadamente 36 aminoácidos ácidos, o hasta una longitud de aproximadamente 37 aminoácidos, o hasta una
 longitud de aproximadamente 40 aminoácidos, o hasta una longitud de aproximadamente 50 aminoácidos, o hasta
 una longitud de aproximadamente 60 aminoácidos, o hasta una longitud de aproximadamente 70 aminoácidos, o hasta
 una longitud de aproximadamente 80 aminoácidos, o hasta una longitud de aproximadamente 90 aminoácidos, o hasta
 una longitud de aproximadamente 100 aminoácidos, o hasta una longitud de aproximadamente 110 aminoácidos, o
 30 hasta una longitud de aproximadamente 120 aminoácidos, o hasta una longitud de aproximadamente 130
 aminoácidos, o hasta una longitud de aproximadamente 140 aminoácidos, o hasta una longitud de aproximadamente
 150 aminoácidos, o hasta una longitud de aproximadamente 160 aminoácidos, o hasta una longitud de
 aproximadamente 170 aminoácidos, o hasta una longitud de aproximadamente 180 aminoácidos, o hasta una longitud
 de aproximadamente 190 aminoácidos, o hasta una longitud de aproximadamente 200 aminoácidos. En cualquier caso
 la composición peptídica se selecciona de tal manera que cuando se alimenta a un animal (como un péptido aislado,
 o más preferentemente cuando un mamífero se alimenta con el tejido de la planta) los niveles de SAA en el mamífero
 y/o la actividad de la paroxonasa en plasma aumentan.

35 Además de tales plantas transgénicas, en diversas realizaciones, también se proporcionan partes de tales plantas.
 Las partes ilustrativas de tales plantas transgénicas incluyen semillas de tales plantas, frutos de tales plantas, hojas
 de tales plantas, raíces de tales plantas, esquejes de tales plantas. Además de cortes, también se contemplan injertos,
 y clones de tales plantas. Con respecto a los injertos, se contempla que una planta de tipo silvestre (u otra planta)
 puede injertarse con elementos de una planta transgénica de modo que una parte de la planta comprenda células de
 40 la planta transgénica como se describió anteriormente.

En ciertas realizaciones, se proporciona un alimento y/o producto alimenticio que comprende al menos una parte de
 una planta transgénica (como se describe en el presente documento) que puede ingerirse por su sabor y/o valor
 nutricional. La planta transgénica expresa un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende
 una secuencia de aminoácidos del péptido mimético de ApoA-I, y/o una secuencia de aminoácidos del péptido G*, y/u
 45 otro agente terapéutico como se describe en el presente documento, y en ciertas realizaciones, el alimento y/o el
 producto alimenticio comprende una cantidad suficiente de la planta (y la planta comprende una cantidad suficiente
 del péptido activo) para que la ingestión del alimento proporcione una actividad profiláctica y/o terapéutica deseable
 (por ejemplo, disminución de SAA, y/o aumento de la actividad de paraoxonasa en plasma, *etc.*) como se describe en
 el presente documento.

50 Las plantas transgénicas descritas en el presente documento y/o los péptidos aislados de las mismas, también
 encuentran uso en la fabricación de proteínas en polvo y otros suplementos nutricionales. Por ejemplo, en ciertas
 realizaciones, se contempla una proteína en polvo cuando al menos una parte de la proteína en polvo comprende un
 péptido como se describe en el presente documento (por ejemplo, un péptido mimético de ApoA-I, y/o un péptido G*,
 55 y/o un péptido apoE, y otro péptido terapéutico como se describe en el presente documento) y/o una planta transgénica
 o parte de la misma que comprende tal péptido. De manera similar, en ciertas realizaciones, se contemplan
 suplementos nutricionales. Los suplementos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a los suplementos vitamínicos que
 comprenden un péptido como se describe en el presente documento (por ejemplo, un péptido mimético de ApoA-I, y/o
 un péptido G*, y/o un péptido apoE, y/u otro péptido terapéutico como se describe en el presente documento) y/o una
 60 planta transgénica o parte de la misma que comprende tal péptido.

También se contemplan "barras energéticas" u otros productos alimenticios que comprenden un péptido como se
 describe en el presente documento (por ejemplo, un péptido mimético de ApoA-I, y/o un péptido G*, y/o un péptido
 apoE, y/u otro péptido terapéutico como se describe en el presente documento) y/o una planta transgénica o parte
 65 (por ejemplo, tejido) del mismo que comprende dicho péptido. Tales barras energéticas incluyen por ejemplo, barras
 de suplemento dietético, barras de proteínas, barras energéticas, y otras barras deportivas y/o nutricionales.

En diversas realizaciones también se proporcionan métodos de profilaxis y/o tratamiento. Tales métodos incluyen un método para el tratamiento o la profilaxis de una patología caracterizada por una respuesta inflamatoria (por ejemplo, aterosclerosis). Los métodos típicamente implican administrar (o hacer que se administre) a un mamífero que lo necesite una cantidad eficaz de al menos una parte de una planta transgénica (por ejemplo, tejido de una planta transgénica) como se describe en el presente documento, y/o un péptido derivado de tal planta, y/o un alimento que comprende al menos una parte de dicha planta; y/o un suplemento nutricional de proteína en polvo, o barra energética (u otro producto alimenticio) como se describe en el presente documento. Las patologías ilustrativas incluyen, pero no se limitan a la enfermedad de Alzheimer, aterosclerosis, artritis, cáncer, diabetes, fibrosis hepática, degeneración macular, enfermedad renal, síndrome metabólico, obesidad, osteoporosis, esclerodermia, lupus eritematoso sistémico, vasculopatía por trasplante, y demencia vascular.

Péptidos miméticos de apoA-I, péptidos G*, péptidos apoE, y otros péptidos terapéuticos.

Actividad de los péptidos miméticos de apoA-I.

Para determinar si la dosis de péptido administrada o el nivel en plasma fue más importante, dosis de 0,15, 0,45, 4,5 o 45 mg/kg/día del péptido sintético D-4F se administraron por vía oral o subcutánea (SQ) a ratones nulos para apolipoproteína (apo)E. Los niveles plasmáticos de péptido fueron ~1.000 veces más altos cuando se administró SQ en comparación con la vía oral. Independientemente de la vía de administración, las dosis de 4,5 y 45 mg/kg redujeron significativamente los niveles plasmáticos de amiloide A (SAA) en suero y el índice inflamatorio de HDL ($P < 0,0001$), mientras que las dosis de 0,15 o 0,45 mg/kg no lo hicieron. Una dosis de 45 mg/kg/día administrada a ratones nulos con apoE en una dieta occidental redujo la aterosclerosis aórtica en aproximadamente ~50 % ($P < 0,0009$) si se administraba por vía oral o SQ y también redujo significativamente los niveles plasmáticos de SAA ($P < 0,002$) y ácido lisofosfatídico ($p < 0,0009$).

Los datos mostraron que la dosis del péptido mimético 4F de apoA-I administrada a ratones apoE nulos (apoE^{-/-}) determinó la eficacia, pero los niveles plasmáticos y hepáticos de péptido no lo hicieron (ver, por ejemplo, Navab *et al.* (2011) *J. Lipid Res.* 52: 1200-1210). Debido a que la eficacia fue similar a las mismas dosis, pero los niveles en plasma y hepáticos fueron dramáticamente más altos cuando el péptido se administró mediante inyección subcutánea (SQ) en comparación con la administración oral, se sospechó que podría haber un compartimento fuera del hígado o plasma donde el péptido la concentración podría ser similar. Se encontró que la concentración de D-4F en las heces era la misma independientemente de si el péptido se administraba por SQ o por vía oral lo que sugiere que el intestino podría ser una acción importante para el péptido, independientemente de la vía de administración (*Id.*).

La concentración de 15-HETE y 13-HODE libres en el plasma de los ratones apoE^{-/-} fue significativamente mayor que la de los ratones de tipo silvestre (Imaizumi *et al.* (2010) *Drug Metab. Lett.* 4:139-148). Después de la administración del péptido 4F, los niveles plasmáticos de ácidos grasos oxidados libres que se unen con mayor afinidad al péptido mimético en comparación con la apoA-I (por ejemplo, 5-HETE, 15-HETE, 9-HODE, 13-HODE) disminuyó significativamente pero los niveles de 20-HETE que se unieron con igual afinidad baja a apoA-I y 4F no disminuyeron (ver, por ejemplo, Imaizumi *et al. supra.*). Estos estudios se centraron en los niveles plasmáticos de ácidos grasos oxidados libres, que son solo una pequeña fracción (<10 %) del plasma total de ácidos grasos oxidados. Curiosamente, solo los niveles plasmáticos de ácidos grasos oxidados libres disminuyeron después de la administración del péptido mimético de la apoA-I; los niveles de ácidos grasos oxidados esterificados se mantuvieron sin cambios (*Id.*).

En otros estudios, los ratones apoE^{-/-} se hicieron diabéticos, dando como resultado un aumento significativo del contenido hepático de ácido araquidónico libre y 12-HETE libre, 15-HETE, 13-HODE, PGD2 y PGE2. Esto se asoció con un aumento significativo en la aterosclerosis aórtica. La administración oral de D-4F redujo significativamente el contenido hepático de ácido araquidónico libre y ácidos grasos oxidados libres derivados de ácidos araquidónicos y linoleicos, y disminuyó significativamente la aterosclerosis aórtica, sin afectar a otros niveles de lípidos o lipoproteínas en plasma (Morgantini *et al.* (2010) *Diabetes.* 59: 3223-3228).

También se determinó que HDL de diabéticos tipo 2 contenían significativamente más 5-HETE libres, 12-HETE, 15-HETE, 9-HODE y 13-HODE que HDL de voluntarios sanos. HDL diabético tipo 2 también fue proinflamatorio en un ensayo basado en células y fue anómalo en un ensayo libre de células. El contenido HDL de 5-HETE libre, 12-HETE, 15-HETE, 9-HODE y 13-HODE se correlacionaron significativamente con los valores obtenidos en el ensayo sin células (Morgantini *et al.* (2011) *Diabetes;* 60: 2617-2623).

Para probar la hipótesis de que el intestino es un sitio de acción importante para D-4F, Los ratones LDLR^{-/-} se alimentaron con una dieta occidental (WD) y se les administró el péptido por vía subcutánea (SQ) u oralmente a 900 µg de péptido/ratón/día (~45 mg/kg/día). Los niveles de D-4F en plasma e hígado fueron 298 veces y 96 veces más altos, respectivamente, después de la administración SQ, mientras que los niveles de péptidos en el intestino delgado solo variaron $1,66 \pm 0,33$ veces. Los niveles de metabolitos libres de ácidos araquidónico y linoleico que se sabe que se unen con alta afinidad a D-4F se redujeron significativamente en el intestino, hígado y bilis hepática en un grado similar ya sea administrado SQ o por vía oral. Sin embargo, los niveles de 20-HETE, que se sabe que se unen con baja afinidad, se mantuvieron sin cambios. El tratamiento con D-4F redujo los niveles de SAA y triglicéridos en plasma ($p < 0,03$) y aumentó el colesterol HDL ($p < 0,04$) de manera similar después de la SQ o la administración oral. Los

niveles plasmáticos de metabolitos de los ácidos araquidónico y linoleico se correlacionaron significativamente con los niveles de SAA ($p < 0,0001$). La alimentación de 15-HETE en pienso (sin WD) aumentó significativamente los niveles plasmáticos de SAA y triglicéridos y disminuyó la actividad de colesterol HDL y paroxonasa ($p < 0,05$), todos los cuales mejoraron significativamente con SQ D-4F ($p < 0,05$).

Sin pretender quedar ligado a una teoría particular, se cree que el péptido 4F, péptido 6F, (y otros péptidos miméticos de ApoA-I, y/u otros péptidos descritos en el presente documento) reducen los niveles de metabolitos de los ácidos araquidónicos y linoleicos en el intestino delgado y esto se asocia con una disminución de la inflamación en ratones LDLR-/- (Navab *et al.* (2012) *J. Lipid Res.* 53: 437-445). Además, como se indicó anteriormente se cree que tales péptidos encuentran uso en el tratamiento y/o profilaxis de la aterosclerosis. También se cree que tales péptidos son útiles en el tratamiento y/o prevención del cáncer, y/o en el tratamiento y/o prevención de una serie de otras patologías, por ejemplo, artritis, aterosclerosis, cáncer, diabetes, fibrosis hepática, degeneración macular, enfermedad renal, obesidad, osteoporosis, esclerodermia, lupus eritematoso sistémico, vasculopatía por trasplante, demencia vascular, y similares. Otras patologías incluyen, pero no se limitan a ninguna de las patologías descritas en PCT/US2006/014839 (WO/2006/118805) que se incorpora en el presente documento como referencia para las patologías y los péptidos descritos en las mismas. Las condiciones ilustrativas se muestran en la Tabla 5 a continuación.

Mientras que la discusión anterior se centra en los péptidos miméticos ApoA-I, se observa que se han demostrado actividades similares para G* (péptidos ApoJ), ApoE, péptidos, péptidos ApoA-ApoE combinados, y similares (verpor ejemplo, Patentes de Estados Unidos N.ºs 6.930.085, y 7.638.494, Publicación PCT PCT/US03/09988 (WO 2003/086326), Patente de Estados Unidos N.º: 7.148.197, Publicación PCT/US2004/026288 (WO/2005/016280), Patentes de Estados Unidos N.ºs: 6.933.279, 7.144.862, 7.166.578, 7.199.102, 7.531.514, 7.820.784, y 7.994.132, y las publicaciones de PCT PCT/US2001/026497 (WO 02/15923), PCT/US03/32442 (WO 2004/034977) y PCT/US2006/014839 (WO/2006/118805).

En vista de que en el presente documento se muestra que las plantas transgénicas que expresan el péptido 6F pueden proporcionar un efecto fisiológico deseable (terapéutico o profiláctico), por ejemplo, para disminuir los niveles de SAA y/o para aumentar la actividad de la paroxonasa en plasma cuando la planta, o una parte de la misma, se alimenta a un mamífero y la demostración de los perfiles de actividad similares de otros péptidos descritos en el presente documento, se cree que las plantas transgénicas que expresan un péptido que consiste en o que comprende uno o más dominios cuya secuencia de aminoácidos es un péptido ApoA-I (o mimético), y/o un péptido ApoJ (o mimético) y/o un péptido ApoE (o mimético de los mismos), o se combinan los péptidos ApoA-ApoE combinados y diversos concatámeros de los mismos.

Miméticos de ApoA-I y otros péptidos para expresión en plantas.

Tal como se ha indicado anteriormente, habiendo demostrado que el péptido 6F cuando se expresa en una planta (por ejemplo, un tomate) muestra una actividad biológica significativa cuando la planta o la parte de la planta se alimenta a un mamífero sin la purificación del péptido lejos del tejido de la planta, se cree que se puede obtener un resultado similar con cualquiera de una serie de otros péptidos o péptidos/proteínas terapéuticos que comprenden dominios que son secuencias de péptidos terapéuticos y estos resultados se pueden obtener mediante la expresión del péptido(s) en otras plantas, por ejemplo, como se describe en el presente documento.

En ciertas realizaciones estos péptidos incluyen, pero no se limitan a péptidos helicoidales anfipáticos de clase A, péptidos anfipáticos helicoidales de clase A de apoA-I que tienen restos aromáticos o alifáticos en la cara no polar, Apo-J (péptidos G'), péptidos apoE, y similares, y miméticos de péptidos, por ejemplo, como se describe a continuación.

Péptidos miméticos de ApoA-I.

En ciertas realizaciones los péptidos expresados en una planta transgénica comprenden o consisten en péptidos miméticos de apoA-I. En ciertas realizaciones tales péptidos incluyen, pero sin limitación, péptidos helicoidales anfipáticos de clase A, por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 6.664.230, y Publicaciones PCT WO 02/15923 y WO 2004/034977, que se incorporan en el presente documento por referencia para las secuencias peptídicas descritas en el mismo. Se descubrió que los péptidos que comprenden una hélice anfipática de clase A ("péptidos de clase A"), además de ser capaces de mitigar uno o más síntomas de aterosclerosis también son útiles en el tratamiento de una o más de las otras indicaciones descritas en el presente documento.

Los péptidos de clase A se caracterizan por la formación de una hélice α que produce una segregación de restos polares y no polares formando así una cara polar y una cara no polar con los restos cargados positivamente que residen en la interfaz polar-no polar y los restos cargados negativamente que residen en el centro de la cara polar (ver, por ejemplo, Anantharamaiah (1986) *Meth. Enzymol.* 128: 626-668). Cabe señalar que el cuarto exón de apo A-I, cuando se dobla en 3.667 restos/vuelta produce una estructura helicoidal anfipática de clase A.

Se ha demostrado una actividad biológica significativa para varios péptidos miméticos de apoA-I que incluyen, pero no se limitan a los péptidos designados 4F, retro (4F inverso), 5F, 6F, y similares. Varios péptidos de clase A inhibieron

ES 2 741 359 T3

el desarrollo de la lesión en ratones susceptibles a la aterosclerosis. Además, los péptidos muestran variables, pero importantes grados de eficacia en la mitigación de uno o más síntomas de las diversas patologías descritas en el presente documento. Algunos de esos péptidos se describen en las solicitudes de patente PCT N.ºs PCT/US2001/026497 (WO 02/15923), PCT/US03/32442 (WO 2004/034977), PCT/US2008/085409, y en Bielicki *et al.* (2010) J. Lipid Res. 51: 1496-1503, Zheng *et al.* (2011) Biochemistry 50: 4068-4076, Di Bartolo *et al.* (2011) Lipids in Health and Disease 10:224. En ciertas realizaciones los péptidos expresados en las plantas transgénicas comprenden uno o más dominios que tienen una secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 1 o la secuencia inversa.

5

10

Tabla 1. Ciertos péptidos miméticos de ApoA-I que pueden expresarse en plantas transgénicas, por ejemplo, como se describe en el presente documento. La tabla incluye varios análogos de péptidos de clase A y/o clase Y. Para cada secuencia enumerada en esta tabla, también se contempla la forma retro de la secuencia. Así, por ejemplo cuando se muestra la secuencia del péptido 6F DWLKAFYDKFFEKFKKEFF (SEQ ID NO: 17), también se contempla la secuencia de aminoácidos retro FFEKFKKEFFKDYFAKLWD (SEQ ID NO: 25).

Nombre del Péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
18A	DWLKAFYDKVAEKLKEAF	11
2F	DWLKAFYDKVAEKLKEAF	12
3F	DWFKAFYDKVAEKLKEAF	13
3F14	DWLKAFYDKVAEKFKKEAF	14
4F	DWFKAFYDKVAEKFKKEAF	15
5F	DWLKAFYDKVFEKFKKEFF	16
6F	DWLKAFYDKFFEKFKKEFF	17
7F	DWFKAFYDKFFEKFKKEFF	18
	DWLKAFYDKVAEKLKEEFF	19
Rev18A	FAEKLKEAVKDYFAKLWD	20
Rev2F	FAEKLKEAVKDYFAKLWD	21
Ref3F	FAEKLKEAVKDYFAKFW	22
Rev4F	FAEKFKKEAVKDYFAKFW	23
Rev5F	FFEKFKKEFVKDYFAKLWD	24
Rev6F	FFEKFKKEFFKDYFAKLWD	25
Rev7F	FFEKFKKEFFKDYFAKFW	26
	DWLKAFYDKVFEKFKKEAF	27
	DWLKAFYDKVFEKLKEEFF	28
	DWLKAFYDKVAEKFKKEFF	29
	DWLKAFYDKVFEKFKKEFF	30
	EWLKLFYEKVLKFKKEAF	31
	EWLKAFYDKVAEKFKKEAF	32
	EWLKAFYDKVAEKLKEEFF	33
	EWLKAFYDKVFEKFKKEAF	34
	EWLKAFYDKVFEKLKEEFF	35
	EWLKAFYDKVAEKFKKEFF	36
	EWLKAFYDKVFEKFKKEFF	37
	AFYDKVAEKLKEAF	38
	AFYDKVAEKFKKEAF	39

ES 2 741 359 T3

(continuación)

Nombre del Péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
	AFYDKVAEKFKKEAF	40
	AFYDKFFEKFKKEFF	41
	AFYDKFFEKFKKEFF	42
	AFYDKVAEKFKKEAF	43
	AFYDKVAEKLKEFF	44
	AFYDKVFEKFKKEAF	45
	AFYDKVFEKLKEFF	46
	AFYDKVAEKFKKEFF	47
	KAFYDKVFEKFKKEF	48
	LFYEKVLEKFKKEAF	49
	AFYDKVAEKFKKEAF	50
	AFYDKVAEKLKEFF	51
	AFYDKVFEKFKKEAF	52
	AFYDKVFEKLKEFF	53
	AFYDKVAEKFKKEFF	54
	AFYDKVFEKFKKEFF	55
	DWLKALYDKVAEKLKEAL	56
	DWFKAFYEKVAEKLKEFF	57
	DWFKAFYEKFFEKFKKEFF	58
	EWLKALYEKVAEKLKEAL	59
	EWLKAFYEKVAEKLKEAF	60
	EWFKAFYEKVAEKLKEFF	61
	EWLKAFYEKVFEKFKKEFF	62
	EWLKAFYEKFFEKFKKEFF	63
	EWFKAFYEKFFEKFKKEFF	64
	DFLKAWYDKVAEKLKEAW	65
	EFLKAWYEKVAEKLKEAW	66
	DFWKAWYDKVAEKLKEWW	67
	EFWKAWYEKVAEKLKEWW	68
	DKLKAFYDKVFEWAKEAF	69
	DKWKAVYDKFAEAFKEFL	70
	EKLKAFYEKVFEWAKEAF	71
	EKWKAVYEKFAEAFKEFL	72
	DWLKAFVDKFAEKFKKEAY	73
	EKWKAVYEKFAEAFKEFL	74
	DWLKAFVYDKVFKLKEFF	75
	EWLKAFVYEKVFVKLKEFF	76
	DWLRAFYDKVAEKLKEAF	77

ES 2 741 359 T3

(continuación)

Nombre del Péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
	EWLRAFYEKVAEKLKEAF	78
	DWLKAFYDRVAEKLKEAF	79
	EWLKAFYERVAEKLKEAF	80
	DWLKAFYDKVAERLKEAF	81
	EWLKAFYEKVAERLKEAF	82
	DWLKAFYDKVAEKLREAF	83
	EWLKAFYEKVAEKLREAF	84
	DWLKAFYDRVAERLKEAF	85
	EWLKAFYERVAERLKEAF	86
	DWLRAFYDKVAEKLREAF	87
	EWLRAFYEKVAEKLREAF	88
	DWLRAFYDRVAEKLKEAF	89
	EWLRAFYERVAEKLKEAF	90
	DWLKAFYDKVAERLREAF	91
	EWLKAFYEKVAERLREAF	92
	DWLRAFYDKVAERLKEAF	93
	EWLRAFYEKVAERLKEAF	94
	DWLKAFYDKVAEKLKEAF <u>P</u> DWLKAFYDKVAEKL KEAF	95
	DWLKAFYDKVAEKLKEFF <u>P</u> DWLKAFYDKVAEKL KEFF	96
	DWFKAFYDKVAEKLKEAF <u>P</u> DWFKAFYDKVAEKL KEAF	97
	DKLKAFYDKVFEWAKEAF <u>P</u> DKLKAFYDKVFEWL KEAF	98
	DKWKAVYDKFAEAFKEFL <u>P</u> DKWKAVYDKFAEAF KEFL	99
	DWFKAFYDKVAEKFKAEAF <u>P</u> DWFKAFYDKVAEKFK AEAF	100
	DWLKAFVYDKVFKLKEFF <u>P</u> DWLKAFVYDKVFKL KEFF	101
	DWLKAFYDKFAEKFKAEFF <u>P</u> DWLKAFYDKFAEKFK AEFF	102
	EWFKAFYEKVAEKFKAEAF	103
	DWFKAFYDKVAEKFK	104
	FKAFYDKVAEKFK	105
	FKAFYEKVAEKFK	106
	FKAFYDKVAEKFK	107
	FKAFYEKVAEKFK	108

ES 2 741 359 T3

(continuación)

Nombre del Péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
	DWFKAFYDKVAEKFK <u>E</u> AF	109
	EWFKAFYEKVAEKFK <u>E</u> AF	110
	AFYDKVAEKFK <u>E</u> AF	111
	DWFKAFYDKVAEK <u>F</u>	112
	DWLKAFYDKVFEKFK <u>E</u> FF	113
	EWLKAFYEKVF <u>E</u> KFK <u>E</u> FF	114
	AFYDKVF <u>E</u> KFK <u>E</u> FF	115
	AFYEKVF <u>E</u> KFK <u>E</u> FF	116
	DWLKAFYDKVFEK <u>F</u>	117
	EWLKAFYEKVF <u>E</u> K <u>F</u>	118
	LKAFYDKVF <u>E</u> KFK <u>E</u>	119
	LKAFYEKVF <u>E</u> KFK <u>E</u>	120
[Cambiar D-E] -1-4F	<u>E</u> WFKAFY <u>E</u> KVAD <u>K</u> FKD <u>A</u> F	121
[Cambiar D-E] -2-4F	<u>E</u> WFKAFYDKVAD <u>K</u> FK <u>E</u> A <u>F</u>	122
[Cambiar D-E] -3-4F	DWFKAFY <u>E</u> KVAD <u>K</u> FK <u>E</u> A <u>F</u>	123
[Cambiar D-E] -4-4F	DWFKAFY <u>E</u> KVAEKFK <u>D</u> A <u>F</u>	124
4F-2	<u>D</u> FWKAFYDKVAEKFK <u>E</u> AF	125
[Cambiar D-E] -1-4F-2	<u>E</u> FWKAFY <u>E</u> KVAD <u>K</u> FK <u>D</u> A <u>F</u>	126
[Cambiar D-E] -2-4F-2	<u>E</u> FWKAFYDKVAD <u>K</u> FK <u>E</u> A <u>F</u>	127
[Cambiar D-E] -3-4F-2	<u>D</u> FWKAFY <u>E</u> KVAD <u>K</u> FK <u>E</u> A <u>F</u>	128
[Cambiar D-E] -4-4F-2	<u>D</u> FWKAFY <u>E</u> KVAEKFK <u>E</u> AF	129
4F-3	DWFKAY <u>F</u> DKVAEKFK <u>D</u> A <u>F</u>	130
[Cambiar D-E] -1-4F-5	<u>E</u> WFKAY <u>F</u> EKVAD <u>K</u> FK <u>D</u> A <u>F</u>	131
[Cambiar D-E] -2-4F-5	<u>E</u> WFKAYFDKVAD <u>K</u> FK <u>E</u> A <u>F</u>	132
[Cambiar D-E] -3-4F-5	DWFKAY <u>F</u> EKVAD <u>K</u> FK <u>E</u> A <u>F</u>	133
[Cambiar D-E] -4-4F-5	DWFKAY <u>F</u> EKVAEKFK <u>D</u> A <u>F</u>	134
4F-4	DWFKAFV <u>D</u> KYAEKFK <u>E</u> AF	135
[Cambiar D-E] -1-4F-4	<u>E</u> WFKAFV <u>E</u> KYAD <u>K</u> FK <u>D</u> A <u>F</u>	136
[Cambiar D-E] -2-4F-4	<u>E</u> WFKAFVDKYAD <u>K</u> FK <u>E</u> A <u>F</u>	137
[Cambiar D-E] -3-4F-4	DWFKAFV <u>E</u> KYAD <u>K</u> FK <u>E</u> A <u>F</u>	138
[Cambiar D-E] -4-4F	DWFKAFV <u>E</u> KYAEKFK <u>D</u> A <u>F</u>	139
4-F-5	DWFKAFYDK <u>A</u> VEKFK <u>E</u> AF	140
[Cambiar D-E] -1-4F-5	<u>E</u> WFKAFY <u>E</u> KAVD <u>K</u> FK <u>D</u> A <u>F</u>	141
[Cambiar D-E] -2-4F-5	<u>E</u> WFKAFYDKAVD <u>K</u> FK <u>E</u> A <u>F</u>	142
[Cambiar D-E] -3-4F-5	DWFKAFY <u>E</u> KAVD <u>K</u> FK <u>E</u> A <u>F</u>	143
[Cambiar D-E] -4-4F-5	DWFKAFY <u>E</u> KAVEKFK <u>D</u> A <u>F</u>	144
4F-6	DWFKAFYDKVFEK <u>A</u> KEAF	145
[Cambiar D-E] -1-4F-6	<u>E</u> WFKAFY <u>E</u> KVFD <u>K</u> AK <u>D</u> A <u>F</u>	146

ES 2 741 359 T3

(continuación)

Nombre del Péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
[Cambiar D-E] -2-4F-6	<u>E</u> WFKAFYDKVFDKAKE <u>E</u> A <u>F</u>	147
[Cambiar D-E] -3-4F-6	DWFKAFY <u>E</u> KVFDKAKEAF	148
[Cambiar D-E] -4-4F-6	DWFKAFY <u>E</u> KVFEKAK <u>D</u> A <u>F</u>	149
4F-7	D <u>W</u> FKAFYDKVAEK <u>A</u> KE <u>F</u> F	150
[Cambiar D-E] -1-4F-7	<u>E</u> WFKAFY <u>E</u> KVADKAK <u>D</u> FF	151
[Cambiar D-E] -2-4F-7	<u>E</u> WFKAFYDKVADKAKE <u>F</u> F	152
[Cambiar D-E] -3-4F-7	DWFKAFY <u>E</u> KVADKAKE <u>F</u> F	153
[Cambiar D-E] -4-4F-7	DWFKAFY <u>E</u> KVAEKAK <u>D</u> FF	154
4F-8	DWFKAFYDKVAEK <u>F</u> KE <u>F</u> A	155
[Cambiar D-E] -1-4F-8	<u>E</u> WFKAFY <u>E</u> KVADKFK <u>D</u> FA	156
[Cambiar D-E] -2-4F-8	EWFKAFYDKVADK <u>F</u> KE <u>F</u> A	157
[Cambiar D-E] -3-4F-8	DWFKAFY <u>E</u> KVADK <u>F</u> KE <u>F</u> A	158
[Cambiar D-E] -4-4F-8	DWFKAFY <u>E</u> KVAEKFK <u>D</u> FA	159
4F-9	D <u>A</u> FKAFYDKVAEK <u>F</u> KE <u>W</u> F	160
[Cambiar D-E] -1-4F-9	<u>E</u> AFKAFY <u>E</u> KVADKFK <u>D</u> WF	161
[Cambiar D-E] -2-4F-9	<u>E</u> AFKAFYDKVADK <u>F</u> KE <u>W</u> F	162
[Cambiar D-E] -3-4F-9	DAFKAFY <u>E</u> KVADK <u>F</u> KE <u>W</u> F	163
[Cambiar D-E] -4-4F-9	DAFKAFY <u>E</u> KVAEKFK <u>D</u> WF	164
4F-10	D <u>A</u> FKAFYDKV <u>W</u> EK <u>F</u> KEAF	165
[Cambiar D-E] -1-4F-10	<u>E</u> AFKAFY <u>E</u> KVWDKFK <u>D</u> AF	166
[Cambiar D-E] -2-4F-10	<u>E</u> AFKAFYDKVWDK <u>F</u> KEAF	167
[Cambiar D-E] -3-4F-10	DAFKAFY <u>E</u> KVWDK <u>F</u> KEAF	168
[Cambiar D-E] -4-4F-10	DAFKAFY <u>E</u> KVWEKFK <u>D</u> AF	169
4F-11	D <u>Y</u> FKAF <u>W</u> DKVAEK <u>F</u> KEAF	170
[Cambiar D-E] -1-4F-11	<u>E</u> YFKAF <u>W</u> EKVADKFK <u>D</u> AF	171
[Cambiar D-E] -2-4F-11	<u>E</u> YFKAFWDKVADK <u>F</u> KEAF	172
[Cambiar D-E] -3-4F-11	DYFKAF <u>W</u> EKVADK <u>F</u> KEAF	173
[Cambiar D-E] -4-4F-11	DYFKAF <u>W</u> EKVAEKFK <u>D</u> AF	174
4F-12	D <u>W</u> A <u>K</u> AFYDKVAEK <u>F</u> KE <u>F</u> F	175
[Cambiar D-E] -1-4F-12	<u>E</u> WAKAFY <u>E</u> KVADKFK <u>D</u> FF	176
[Cambiar D-E] -2-4F-12	<u>E</u> WAKAFYDKVADK <u>F</u> KE <u>F</u> F	177
[Cambiar D-E] -3-4F-12	DWAKAFY <u>E</u> KVADK <u>F</u> KE <u>F</u> F	178
[Cambiar D-E] -4-4F-12	DWAKAFY <u>E</u> KVAEKFK <u>D</u> FF	179
4F-13	DWFKAA <u>A</u> YDKVAEK <u>F</u> KE <u>F</u> F	180
[Cambiar D-E] -1-4F-13	<u>E</u> WFKAA <u>A</u> Y <u>E</u> KVADKFK <u>D</u> FF	181
[Cambiar D-E] -2-4F-13	<u>E</u> WFKAA <u>A</u> YDKVADK <u>F</u> KE <u>F</u> F	182
[Cambiar D-E] -3-4F-13	DWFKAA <u>A</u> Y <u>E</u> KVADK <u>F</u> KE <u>F</u> F	183
[Cambiar D-E] -4-4F-13	DWFKAA <u>A</u> Y <u>E</u> KVAEKFK <u>D</u> FF	184

ES 2 741 359 T3

(continuación)

Nombre del Péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
4F-14	DWFKAF <u>A</u> DKVAEKFK <u>E</u> YF	185
[Cambiar D-E] -1-4F-14	<u>E</u> WFKAF <u>E</u> KVAD <u>K</u> FK <u>D</u> YF	186
[Cambiar D-E] -2-4F-14	<u>E</u> WFKAFADKVADKFK <u>E</u> YF	187
[Cambiar D-E] -3-4F-14	DWFKAF <u>A</u> EKVAD <u>K</u> FK <u>E</u> YF	188
[Cambiar D-E] -4-4F	DWFKAF <u>A</u> EKVAEKFK <u>D</u> YF	189
4F-15	DWFKAFYDK <u>A</u> AEKFK <u>E</u> VF	190
[Cambiar D-E] -1-4F-15	<u>E</u> WFKAFY <u>E</u> KAAD <u>K</u> FK <u>D</u> VF	191
[Cambiar D-E] -2-4F-15	<u>E</u> WFKAFYDKAADKFK <u>E</u> VF	192
[Cambiar D-E] -3-4F-15	DWFKAFY <u>E</u> KAAD <u>K</u> FK <u>E</u> VF	193
[Cambiar D-E] -4-4F-15	DWFKAFY <u>E</u> KAAEKFK <u>D</u> VF	194
4F-16	DWYKAF <u>F</u> DKVAEKFK <u>E</u> AF	195
[Cambiar D-E] -1-4F-16	<u>E</u> WYKAF <u>F</u> EKVAD <u>K</u> FK <u>D</u> AF	196
[Cambiar D-E] -2-4F-16	<u>E</u> WYKAF <u>F</u> DKVADKFK <u>E</u> AF	197
[Cambiar D-E] -3-4F-16	DWYKAF <u>F</u> EKVAD <u>K</u> FK <u>E</u> AF	198
[Cambiar D-E] -4-4F-16	DWYKAF <u>F</u> EKVAEKFK <u>D</u> AF	199
4F-17	DWV <u>K</u> AFYDK <u>F</u> AEKFK <u>E</u> AF	200
[Cambiar D-E] -1-4F-17	<u>E</u> WV <u>K</u> AFY <u>E</u> KFAD <u>K</u> FK <u>D</u> AF	201
[Cambiar D-E] -2-4F-17	<u>E</u> WV <u>K</u> AFYDKFADKFK <u>E</u> AF	202
[Cambiar D-E] -3-4F-17	DWV <u>K</u> AFY <u>E</u> KFAD <u>K</u> FK <u>E</u> AF	203
[Cambiar D-E] -4-4F-17	DWV <u>K</u> AFY <u>E</u> KFAEKFK <u>D</u> AF	204
4F-18	DWFKAF <u>F</u> DKVAEKY <u>K</u> EAF	205
[Cambiar D-E] -1-4F-18	<u>E</u> WFKAF <u>F</u> EKVAD <u>K</u> Y <u>K</u> DAF	206
[Cambiar D-E] -2-4F-18	<u>E</u> WFKAF <u>F</u> DKVADKY <u>K</u> EAF	207
[Cambiar D-E] -3-4F-18	DWFKAF <u>F</u> EKVAD <u>K</u> Y <u>K</u> EAF	208
[Cambiar D-E] -3-4F-18	DWFKAF <u>F</u> EKVAD <u>K</u> Y <u>K</u> EAF	209
4F-19	DWFKAF <u>F</u> DKVAEKFK <u>E</u> AY	210
[Cambiar D-E] -1-4F-19	<u>E</u> WFKAF <u>F</u> EKVAD <u>K</u> FK <u>D</u> AY	211
[Cambiar D-E] -2-4F-19	<u>E</u> WFKAF <u>F</u> DKVADKFK <u>E</u> AY	212
[Cambiar D-E] -3-4F-19	DWFKAF <u>F</u> EKVAD <u>K</u> FK <u>E</u> AY	213
[Cambiar D-E] -4-4F-19	DWFKAF <u>F</u> EKVAEKFK <u>D</u> AY	214
4F-20	DWFKAFYDK <u>F</u> AEKFK <u>E</u> AV	215
[Cambiar D-E] -1-4F-20	<u>E</u> WFKAFY <u>E</u> KFAD <u>K</u> FK <u>D</u> AV	216
[Cambiar D-E] -2-4F-20	<u>E</u> WFKAFYDKFADKFK <u>E</u> AV	217
[Cambiar D-E] -3-4F-20	DWFKAFY <u>E</u> KFAD <u>K</u> FK <u>E</u> AV	218
[Cambiar D-E] -4-4F-20	DWFKAFY <u>E</u> KFAEKFK <u>D</u> AV	219
4F-21	D <u>K</u> FKAFYDKVAEK <u>F</u> W <u>E</u> AF	220
[Cambiar D-E] -1-4F-21	<u>E</u> KFKAFY <u>E</u> KVAD <u>K</u> FW <u>D</u> AF	221
[Cambiar D-E] -2-4F-21	<u>E</u> KFKAFYDKVADKFW <u>E</u> AF	222

ES 2 741 359 T3

(continuación)

Nombre del Péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
[Cambiar D-E] -3-4F-21	DKFKAFY <u>E</u> KVAD <u>K</u> FW <u>E</u> AF	223
[Cambiar D-E] -4-4F-21	DKFKAFY <u>E</u> KVAEK <u>F</u> W <u>D</u> AF	224
4F-22	D <u>K</u> W <u>K</u> AFYDKVAEK <u>F</u> FEAF	225
[Cambiar D-E] -1-4F-22	<u>E</u> KWKA <u>F</u> Y <u>E</u> KVAD <u>K</u> FF <u>D</u> AF	226
[Cambiar D-E] -2-4F-22	<u>E</u> KWKA <u>F</u> YDKVAD <u>K</u> FF <u>E</u> AF	227
[Cambiar D-E] -3-4F-22	DKWKA <u>F</u> Y <u>E</u> KVAD <u>K</u> FF <u>E</u> AF	228
[Cambiar D-E] -4-4F-22	DKWKA <u>F</u> Y <u>E</u> KVAEK <u>F</u> W <u>D</u> AF	229
4F-23	D <u>K</u> FKAFYDK <u>W</u> AEV <u>F</u> KEAF	230
[Cambiar D-E] -1-4F-23	<u>E</u> KFKAFY <u>E</u> KWAD <u>V</u> FK <u>D</u> AF	231
[Cambiar D-E] -2-4F-23	<u>E</u> KFKAFYDKWAD <u>V</u> FK <u>E</u> AF	232
[Cambiar D-E] -3-4F-23	DKFKAFY <u>E</u> KWAD <u>V</u> FK <u>E</u> AF	233
[Cambiar D-E] -4-4F-23	DKFKAFY <u>E</u> KWAEV <u>F</u> K <u>D</u> AF	234
4F-24	D <u>K</u> FKAFYDKVAE <u>F</u> W <u>K</u> EAF	235
[Cambiar D-E] -1-4F-24	<u>E</u> KFKAFY <u>E</u> KVAD <u>F</u> W <u>K</u> DAF	236
[Cambiar D-E] -2-4F-24	<u>E</u> KFKAFYDKVAD <u>F</u> W <u>K</u> EAF	237
[Cambiar D-E] -3-4F-24	DKFKAFY <u>E</u> KVAD <u>F</u> W <u>K</u> EAF	238
[Cambiar D-E] -4-4F-24	DKFKAFY <u>E</u> KVAE <u>F</u> W <u>K</u> DAF	239
Rev-4F	FAEKFK <u>E</u> AVKD <u>Y</u> FAK <u>F</u> WD	240
[Interruptor DE] -1-Rev-4F	FAD <u>K</u> FKD <u>A</u> VK <u>E</u> YFAK <u>F</u> W <u>E</u>	241
[Interruptor DE] -2-Rev-4F	FAD <u>K</u> FK <u>E</u> AVKD <u>Y</u> FAK <u>F</u> W <u>E</u>	242
[Interruptor DE] -3-Rev-4F	FAEKFK <u>D</u> AVK <u>E</u> YFAK <u>F</u> WD	243
[Interruptor DE] -4-Rev-4F	FAEKFK <u>D</u> AVKD <u>Y</u> FAK <u>F</u> W <u>E</u>	244
Rev-4F-1	<u>F</u> W <u>E</u> KFK <u>E</u> AVKD <u>Y</u> FAK <u>F</u> AD	245
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-1	FW <u>D</u> KFKD <u>A</u> VK <u>E</u> YFAK <u>F</u> AE	246
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-1	FAD <u>K</u> FK <u>E</u> AVKD <u>Y</u> FAK <u>F</u> W <u>E</u>	247
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-1	FAEKFK <u>D</u> AVK <u>E</u> YFAK <u>F</u> WD	248
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-1	FAEKFK <u>D</u> AVKD <u>Y</u> FAK <u>F</u> W <u>E</u>	249
Rev-4F-2	FF <u>E</u> KFK <u>E</u> AVKD <u>Y</u> FAK <u>A</u> WD	250
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-2	FF <u>D</u> KFKD <u>A</u> VK <u>E</u> YFAK <u>A</u> W <u>E</u>	251
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-2	FF <u>D</u> KFK <u>E</u> AVKD <u>Y</u> FAK <u>A</u> W <u>E</u>	252
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-2	FFEKFK <u>D</u> AVK <u>E</u> YFAK <u>A</u> WD	253
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-2	FFEKFK <u>D</u> AVKD <u>Y</u> FAK <u>A</u> W <u>E</u>	254
Rev-4F-3	FAEK <u>A</u> KE <u>F</u> VKD <u>Y</u> FAK <u>F</u> WD	255
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-3	FAD <u>K</u> AKD <u>F</u> VK <u>E</u> YFAK <u>F</u> W <u>E</u>	256
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-3	FAD <u>K</u> AK <u>E</u> FVKD <u>Y</u> FAK <u>F</u> W <u>E</u>	257
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-3	FAEKAKD <u>F</u> VK <u>E</u> YFAK <u>F</u> WD	258
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-3	FAEKAKD <u>F</u> VKD <u>Y</u> FAK <u>F</u> W <u>E</u>	259
Rev-4F-4	FAEKFK <u>E</u> VA <u>K</u> D <u>Y</u> FAK <u>F</u> WD	260

ES 2 741 359 T3

(continuación)

Nombre del Péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-4	FADKFKD <u>VA</u> KE <u>Y</u> FAKFWE	261
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-4	FADKFK <u>E</u> VAKD <u>Y</u> FAKFWE	262
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-4	FAEKFKD <u>VA</u> KE <u>Y</u> FAKFWD	263
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-4	FAEKFKD <u>VA</u> KD <u>Y</u> FAKFWE	264
Rev-4F-5	FAEKFK <u>E</u> AYK <u>D</u> VFAKFWD	265
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-5	FADKFKD <u>AY</u> KE <u>V</u> FAKFWE	266
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-5	FADKFK <u>E</u> AYK <u>D</u> VFAKFWE	267
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-5	FAEKFKD <u>AY</u> KE <u>V</u> FAKFWD	268
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-5	FAEKFKD <u>AY</u> KD <u>V</u> FAKFWE	269
Rev-4F-6	FAEKFK <u>E</u> AVK <u>D</u> FYAKFWD	270
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-6	FADKFKD <u>AV</u> KE <u>F</u> YAKFWE	271
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-6	FADKFK <u>E</u> AVK <u>D</u> FYAKFWE	272
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-6	FAEKFKD <u>AV</u> KE <u>F</u> YAKFWD	273
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-6	FAEKFKD <u>AV</u> KD <u>F</u> YAKFWE	274
Rev-4F-7	FAEK <u>F</u> WEAVK <u>D</u> YFAKF <u>K</u> D	275
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-7	FADK <u>F</u> WD <u>AV</u> KE <u>Y</u> FAKF <u>K</u> E	276
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-7	FADK <u>F</u> WEAVK <u>D</u> YFAKF <u>K</u> E	277
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-7	FAEK <u>F</u> WD <u>AV</u> KE <u>Y</u> FAKF <u>K</u> D	278
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-7	FAEK <u>F</u> WD <u>AV</u> KD <u>Y</u> FAKF <u>K</u> E	279
Rev-4F-8	<u>A</u> FEKFKEAVK <u>D</u> YFAKFWD	280
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-8	AFD <u>K</u> FKD <u>AV</u> KE <u>Y</u> FAKFWE	281
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-8	AFD <u>K</u> FK <u>E</u> AVK <u>D</u> YFAKFWE	282
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-8	AFEKFKD <u>AV</u> KE <u>Y</u> FAKFWD	283
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-8	AFEKFKD <u>AV</u> KD <u>Y</u> FAKFWE	284
Rev-F-9	<u>V</u> AEKFKEAFK <u>D</u> YFAKFWD	285
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-9	VADKFKD <u>AF</u> KE <u>Y</u> FAKFWE	286
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-9	VADKFK <u>E</u> AFK <u>D</u> YFAKFWE	287
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-9	VAEKFKD <u>AF</u> KE <u>Y</u> FAKFWD	288
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-9	VAEKFKD <u>AF</u> KD <u>Y</u> FAKFWE	289
Rev-4F-10	<u>Y</u> AEKFKEAVK <u>D</u> FFAKFWD	290
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-10	YADKFKD <u>AV</u> KE <u>F</u> FAKFWE	291
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-10	YADKFK <u>E</u> AVK <u>D</u> FFAKFWE	292
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-10	YAEKFKD <u>AV</u> KE <u>F</u> FAKFWD	293
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-10	YAEKFKD <u>AV</u> KD <u>F</u> FAKFWE	294
Rev-4F-11	<u>A</u> AEKFKE <u>F</u> VK <u>D</u> YFAKFWD	295
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-11	AADKFKD <u>F</u> VKE <u>Y</u> FAKFWE	296
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-11	AADKFK <u>E</u> FVK <u>D</u> YFAKFWE	297
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-11	AAEKFKD <u>F</u> VKE <u>Y</u> FAKFWD	298

ES 2 741 359 T3

(continuación)

Nombre del Péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
Interruptor DE] -4-Rev-4F-11	AAEKFK <u>D</u> FVKDYFAKFW <u>E</u>	299
Rev-4F-12	FFEK <u>A</u> KEAVKDYFAKFW <u>D</u>	300
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-12	FF <u>D</u> KAK <u>D</u> AVK <u>E</u> YFAKFW <u>E</u>	301
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-12	FF <u>D</u> KAKEAVKDYFAKFW <u>E</u>	302
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-12	FFEKAK <u>D</u> AVK <u>E</u> YFAKFW <u>D</u>	303
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-12	FFEKAK <u>D</u> AVKDYFAKFW <u>E</u>	304
Rev-4F-13	F <u>Y</u> EKFKEAVK <u>D</u> AFAKFW <u>D</u>	305
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-13	F <u>Y</u> <u>D</u> KFK <u>D</u> AVK <u>E</u> AFAKFW <u>E</u>	306
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-13	F <u>Y</u> <u>D</u> KFKEAVKDAFAKFW <u>E</u>	307
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-13	F <u>Y</u> EKFK <u>D</u> AVK <u>E</u> AFAKFW <u>D</u>	308
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-13	F <u>Y</u> EKFK <u>D</u> AVKDAFAKFW <u>E</u>	309
Rev-4F-14	F <u>V</u> EKFKEA <u>A</u> KDYFAKFW <u>D</u>	310
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-14	F <u>V</u> <u>D</u> KFK <u>D</u> AAK <u>E</u> YFAKFW <u>E</u>	311
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-14	F <u>V</u> <u>D</u> KFKEAAKDYFAKFW <u>E</u>	312
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-14	F <u>V</u> EKFK <u>D</u> AAK <u>E</u> YFAKFW <u>D</u>	313
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-14	F <u>V</u> EKFK <u>D</u> AAKDYFAKFW <u>E</u>	314
Rev-4F-15	FAEK <u>Y</u> KEAVK <u>D</u> FFAKFW <u>D</u>	315
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-15	F <u>A</u> <u>D</u> K <u>Y</u> K <u>D</u> AVK <u>E</u> FFAKFW <u>E</u>	316
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-15	F <u>A</u> <u>D</u> K <u>Y</u> KEAVK <u>D</u> FFAKFW <u>E</u>	317
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-15	FAEK <u>Y</u> K <u>D</u> AVK <u>E</u> FFAKFW <u>D</u>	318
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-15	FAEK <u>Y</u> K <u>D</u> AVK <u>D</u> FFAKFW <u>E</u>	319
Rev-4F-16	FAEK <u>V</u> KEAFKDYFAKFW <u>D</u>	320
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-16	F <u>A</u> <u>D</u> K <u>V</u> K <u>D</u> AFK <u>E</u> YFAKFW <u>E</u>	321
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-16	F <u>A</u> <u>D</u> K <u>V</u> KEAFKDYFAKFW <u>E</u>	322
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-16	FAEK <u>V</u> K <u>D</u> AFK <u>E</u> YFAKFW <u>D</u>	323
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-16	FAEK <u>V</u> K <u>D</u> AFKDYFAKFW <u>E</u>	324
Rev-4F-17	FAEKFK <u>E</u> <u>Y</u> VK <u>D</u> AFAKFW <u>D</u>	325
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-17	F <u>A</u> <u>D</u> K <u>F</u> K <u>D</u> YV <u>K</u> EAFKFW <u>E</u>	326
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-17	F <u>A</u> <u>D</u> K <u>F</u> KEYV <u>K</u> DAFAKFW <u>E</u>	327
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-17	FAEKFK <u>D</u> YV <u>K</u> EAFKFW <u>D</u>	328
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-17	FAEKFK <u>D</u> YV <u>K</u> DAFAKFW <u>E</u>	329
Rev-4F-18	FAEKFK <u>E</u> AFKDY <u>V</u> AKFW <u>D</u>	330
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-18	F <u>A</u> <u>D</u> K <u>F</u> K <u>D</u> AFK <u>E</u> YVAKFW <u>E</u>	331
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-18	F <u>A</u> <u>D</u> K <u>F</u> KEAFKDY <u>V</u> AKFW <u>E</u>	332
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-18	FAEKFK <u>D</u> AFK <u>E</u> YVAKFW <u>D</u>	333
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-18	FAEKFK <u>D</u> AFKDY <u>V</u> AKFW <u>E</u>	334
Rev-4F-19	FAEKFK <u>E</u> AFKDYFAK <u>V</u> WD	335
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-19	F <u>A</u> <u>D</u> K <u>F</u> K <u>D</u> AFK <u>E</u> YFAK <u>V</u> <u>W</u> <u>E</u>	336

ES 2 741 359 T3

(continuación)

Nombre del Péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-19	FAD <u>K</u> FKEAFKDYFAKV <u>W</u> E	337
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-19	FAEKFKD <u>A</u> FK <u>E</u> YFAKVWD	338
Interruptor DE] -4-Rev-4F-19	FAEKFKD <u>A</u> FKDYFAKV <u>W</u> E	339
Rev-4F-20	FAEKFK <u>E</u> AVKDFFA <u>K</u> YWD	340
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-20	FAD <u>K</u> FKD <u>A</u> VK <u>E</u> FFA <u>K</u> Y <u>W</u> E	341
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-20	FAD <u>K</u> FK <u>E</u> AVKDFFA <u>K</u> Y <u>W</u> E	342
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-20	FAEKFKD <u>A</u> VK <u>E</u> FFA <u>K</u> YWD	343
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-20	FAEKFKD <u>A</u> VKDFFA <u>K</u> Y <u>W</u> E	344
Rev-4F-21	<u>W</u> A <u>E</u> KFF <u>E</u> AVKD <u>Y</u> FAK <u>F</u> KD	345
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-7	WAD <u>K</u> FFD <u>A</u> VK <u>E</u> YFAK <u>F</u> K <u>E</u>	346
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-7	WAD <u>K</u> FF <u>E</u> AVKD <u>Y</u> FAK <u>F</u> K <u>E</u>	347
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-7	W <u>A</u> EKFFD <u>A</u> VK <u>E</u> YFAK <u>F</u> KD	348
Interruptor DE] -4-Rev-4F-7	W <u>A</u> EKFFD <u>A</u> VKD <u>Y</u> FAK <u>F</u> K <u>E</u>	349
Rev-4F-22	FAEK <u>W</u> FEAVKD <u>Y</u> FAK <u>F</u> KD	350
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-22	FAD <u>K</u> WFD <u>A</u> VK <u>E</u> YFAK <u>F</u> K <u>E</u>	351
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-22	FAD <u>K</u> WFEAVKD <u>Y</u> FAK <u>F</u> K <u>E</u>	352
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-22	FAEKWFD <u>A</u> VK <u>E</u> YFAK <u>F</u> KD	353
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-22	FAEKWFD <u>A</u> VKD <u>Y</u> FAK <u>F</u> K <u>E</u>	354
Rev-4F-23	FAEK <u>F</u> VEA <u>W</u> KD <u>Y</u> FAK <u>F</u> KD	355
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-23	FAD <u>K</u> FVD <u>A</u> W <u>K</u> EYFAK <u>F</u> K <u>E</u>	356
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-23	FAD <u>K</u> FVEA <u>W</u> KD <u>Y</u> FAK <u>F</u> K <u>E</u>	357
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-23	FAEK <u>F</u> VD <u>A</u> W <u>K</u> EYFAK <u>F</u> KD	358
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-23	FAEK <u>F</u> VD <u>A</u> WKD <u>Y</u> FAK <u>F</u> K <u>E</u>	359
Rev-4F-24	F <u>Y</u> E <u>K</u> FA <u>E</u> AVKD <u>W</u> FAK <u>F</u> KD	360
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-24	F <u>Y</u> D <u>K</u> FAD <u>A</u> VK <u>E</u> WFAK <u>F</u> K <u>E</u>	361
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-24	F <u>Y</u> D <u>K</u> FA <u>E</u> AVKD <u>W</u> FAK <u>F</u> K <u>E</u>	362
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-24	F <u>Y</u> E <u>K</u> FAD <u>A</u> VK <u>E</u> WFAK <u>F</u> KD	363
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-24	F <u>Y</u> E <u>K</u> FAD <u>A</u> VKD <u>W</u> FAK <u>F</u> K <u>E</u>	364
[A-5>H] 4F	D <u>W</u> F <u>K</u> H <u>F</u> YDKVAEK <u>F</u> KEAF	365
[A-5>H, D-E cambiado] 4F	<u>E</u> W <u>F</u> K <u>H</u> F <u>Y</u> E <u>K</u> VAD <u>K</u> F <u>K</u> D <u>A</u> F	366
[A-5>H, D-1>E]4F	<u>E</u> W <u>F</u> K <u>H</u> F <u>Y</u> DKVAEK <u>F</u> KEAF	367
[A-5>H, D-8>E]4-F	D <u>W</u> F <u>K</u> H <u>F</u> Y <u>E</u> KVAEK <u>F</u> KEAF	368
[A-5>H, E-12>D] 4F	D <u>W</u> F <u>K</u> H <u>F</u> YDKVAD <u>K</u> FKEAF	369
[A-5>H, E-16>D] 4F	D <u>W</u> F <u>K</u> H <u>F</u> YDKVAEK <u>F</u> KD <u>A</u> F	370
[F-3>H,A-5>F] -4F	D <u>W</u> H <u>K</u> FF <u>Y</u> DKVAEK <u>F</u> KEAF	371
[F-3>H,A-5>F, D-E cambiado] -4F	<u>E</u> W <u>H</u> K <u>F</u> F <u>Y</u> E <u>K</u> VAD <u>K</u> F <u>K</u> D <u>A</u> F	372
[F-3>H, A-5>F, D-1>E] -4F	<u>E</u> W <u>H</u> K <u>F</u> F <u>Y</u> DKVAEK <u>F</u> KEAF	373
[F-3>H, A-5>F, D-8>E] -4F	D <u>W</u> H <u>K</u> FF <u>Y</u> E <u>K</u> VAEK <u>F</u> KEAF	374

ES 2 741 359 T3

(continuación)

Nombre del Péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
[F-3>H, A-5>F, E-12>D] -4F	DW <u>H</u> K <u>F</u> FYDKVAD <u>K</u> FKEAF	375
[F-3>H,A-5>F, E-16>D] -4F	DW <u>H</u> K <u>F</u> FYDKVAEK <u>F</u> K <u>D</u> AF	376
[A-5>F, F-6>H]4F	DWFK <u>F</u> H <u>Y</u> DKVAEK <u>F</u> KEAF	377
[A-5>F, F-6>H, D-E cambiado]4F	<u>E</u> WFK <u>F</u> H <u>Y</u> E <u>K</u> VAD <u>K</u> F <u>K</u> D <u>A</u> F	378
[[A-5>F, F-6>H, D-1>E]4F	<u>E</u> WFK <u>F</u> H <u>Y</u> DKVAEK <u>F</u> KEAF	379
[A-5>F, F-6>H, D-8>E]4F	DWFK <u>F</u> H <u>Y</u> E <u>K</u> VAEK <u>F</u> KEAF	380
[A-5>F, F-6>H, E-12>D]4F	DWFK <u>F</u> H <u>Y</u> DKVAD <u>K</u> FKEAF	381
[A-5>F, F-6>H, E-16>D]4F	DWFK <u>F</u> H <u>Y</u> DKVAEK <u>F</u> K <u>D</u> AF	382
[A-5>V, V-10>H]4F	DWFK <u>V</u> F <u>Y</u> DK <u>H</u> AEK <u>F</u> KEAF	383
[A-5>V, V-10>H, D-E cambiado]4F	<u>E</u> WFK <u>V</u> F <u>Y</u> E <u>K</u> H <u>A</u> D <u>K</u> F <u>K</u> D <u>A</u> F	384
[A-5>V, V-10>H, D-1>E]4F	<u>E</u> WFK <u>V</u> F <u>Y</u> DK <u>H</u> AEK <u>F</u> KEAF	385
[A-5>V, V-10>H, D-8>E] 4F	DWFK <u>V</u> F <u>Y</u> E <u>K</u> H <u>A</u> EK <u>F</u> KEAF	386
[A-5>V, V-10>H, E-12>D] 4F	DWFK <u>V</u> F <u>Y</u> DK <u>H</u> A <u>D</u> K <u>F</u> KEAF	387
[A-5>V, V-10>H, E16>D] 4F	DWFK <u>V</u> F <u>Y</u> DK <u>H</u> AEK <u>F</u> K <u>D</u> AF	388
[[A-17>H]4F	DWFKAFYDKVAEK <u>F</u> KE <u>H</u> F	389
[A-17>H, D-E cambiado] 4F	<u>E</u> WFKAF <u>Y</u> E <u>K</u> VAD <u>K</u> F <u>K</u> D <u>H</u> F	390
[[A-17>H, D-1 >E]4F	<u>E</u> WFKAFYDKVAEK <u>F</u> KE <u>H</u> F	391
[[A-17>H, D-8>E]4F	DWFKAF <u>Y</u> E <u>K</u> VAEK <u>F</u> KE <u>H</u> F	392
[[A-17>H, E-12>D]4F	DWFKAFYDKVAD <u>K</u> FKE <u>H</u> F	393
[[A-17>H, E16>D]4F	DWFKAFYDKVAEK <u>F</u> K <u>D</u> H <u>F</u>	394
[A-17>F, F-18>H] 4F	DWFKAFYDKVAEK <u>F</u> KE <u>F</u> H	395
[A-17>F, F-18>H, D-E cambiado] 4F	<u>E</u> WFKAF <u>Y</u> E <u>K</u> VAD <u>K</u> F <u>K</u> D <u>F</u> H	396
[A-17>F, F-18>H, D-1>E] -4F	<u>E</u> WFKAFYDKVAEK <u>F</u> KE <u>F</u> H	397
[A-17>F, F-18>H]4F	DWFKAFYDKVAEK <u>F</u> KE <u>F</u> H	398
[A-17>F, F-18>H, D-8>E] -4F	DWFKAF <u>Y</u> E <u>K</u> VAEK <u>F</u> KE <u>F</u> H	399
[A-17>F, F-18>H, E-12>D] 4F	DWFKAFYDKVAEK <u>F</u> KE <u>F</u> H	400
[A-17>F, F-18>H], E-16>D]-4F	DWFKAFYDKVAEK <u>F</u> K <u>D</u> F <u>H</u>	401
Rev-4F	FAEK <u>F</u> KEAVKDYFAK <u>F</u> WD	402
[A-2>H]Rev4F	<u>F</u> HEK <u>F</u> KEAVKDYFAK <u>F</u> WD	403
Rev-[A-2>H, D>E]-4F	<u>F</u> HEK <u>F</u> KEAV <u>K</u> E <u>Y</u> FAK <u>F</u> W <u>E</u>	404
Rev-[A-2>H, E>D]4F	<u>F</u> H <u>D</u> K <u>F</u> K <u>D</u> AVKDYFAK <u>F</u> WD	405
[A-2>H, D-E cambiado] Rev-4F	<u>F</u> H <u>D</u> K <u>F</u> K <u>D</u> AV <u>K</u> E <u>Y</u> FAK <u>F</u> W <u>E</u>	406
[A-2>H, E-3>D]Rev-4F	<u>F</u> H <u>D</u> K <u>F</u> KEAVKDYFAK <u>F</u> WD	407
[A-2>H, E-7>D]Rev-4F	<u>F</u> HEK <u>F</u> K <u>D</u> AVKDYFAK <u>F</u> WD	408
[A-2>H, D-11>E]Rev-4F	<u>F</u> HEK <u>F</u> KEAV <u>K</u> E <u>Y</u> FAK <u>F</u> WD	409
[A-2>H, D-18>E]Rev-4F	<u>F</u> HEK <u>F</u> KEAVKDYFAK <u>F</u> W <u>E</u>	410
[F-1>H, A-2>F]Rev-4F	<u>H</u> FEK <u>F</u> KEAVKDYFAK <u>F</u> WD	411
[F-1>H, A-2>F, D-E cambiado] Rev-4F	<u>H</u> F <u>D</u> K <u>F</u> K <u>D</u> AV <u>K</u> E <u>Y</u> FAK <u>F</u> W <u>E</u>	412

ES 2 741 359 T3

(continuación)

Nombre del Péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
[F-1>H, A-2>F, D>E]Rev-4F	<u>H</u> FEKFKEAV <u>K</u> EYFAK <u>F</u> W <u>E</u>	413
[F-1>H, A-2>F, E-3>D] Rev-4F	<u>H</u> FDKFK <u>E</u> AVKDYFAK <u>F</u> WD	414
[F-1>H, A-2>F, E-7>D] Rev-4F	<u>H</u> FEKFK <u>D</u> AVKDYFAK <u>F</u> WD	415
[F-1>H, A-2>F, D-11>E] Rev-4F	<u>H</u> FEKFKEAV <u>K</u> EYFAK <u>F</u> WD	416
[F-1>H, A-2>F, D-18>E] Rev-4F	<u>H</u> FEKFKEAVKDYFAK <u>F</u> W <u>E</u>	417
[A-2>F, F-5>H] Rev D-4F	<u>F</u> FEKH <u>H</u> KEAVKDYFAK <u>F</u> WD	418
[A-2>F, F-5>H, D-E cambiado] Rev D-4F	<u>F</u> FDKH <u>H</u> K <u>D</u> AV <u>K</u> EYFAK <u>F</u> W <u>E</u>	419
[A-2>F, F-5>H, D>E] Rev D-4F	<u>F</u> FEKH <u>H</u> KEAV <u>K</u> EYFAK <u>F</u> W <u>E</u>	420
[A-2>F, F-5>H, E>D] Rev D-4F	<u>F</u> FDKH <u>H</u> K <u>D</u> AVKDYFAK <u>F</u> WD	421
[A-2>F, F-5>H, E-3>D] Rev D-4F	<u>F</u> FDKH <u>H</u> KEAVKDYFAK <u>F</u> WD	422
[A-2>F, F-5>H, D-11>E] Rev D-4F	<u>F</u> FEKH <u>H</u> KEAV <u>K</u> EYFAK <u>F</u> WD	423
[A-2>F, F-5>H, D-18>E] Rev D-4F	<u>F</u> FEKH <u>H</u> KEAVKDYFAK <u>F</u> W <u>E</u>	424
[A-2>V, V-9>H] Rev D-4F	<u>F</u> VEKFKEA <u>H</u> KDYFAK <u>F</u> WD	425
[A-2>V, V-9>H, D-E cambiado] Rev D-4F	<u>F</u> VDKFK <u>D</u> A <u>H</u> K <u>E</u> YFAK <u>F</u> W <u>E</u>	426
[A-2>V, V-9>H, D>E] Rev D-4F	<u>F</u> VEKFKEA <u>H</u> K <u>E</u> YFAK <u>F</u> W <u>E</u>	427
[A-2>V, V-9>H, E>D] Rev D-4F	<u>F</u> VDKFK <u>D</u> A <u>H</u> KDYFAK <u>F</u> WD	428
[A-2>V, V-9>H, E-3>D] Rev D-4F	<u>F</u> VDKFK <u>E</u> A <u>H</u> KDYFAK <u>F</u> WD	429
[A-2>V, V-9>H, E-7>D] Rev D-4F	<u>F</u> VEKFK <u>D</u> A <u>H</u> KDYFAK <u>F</u> WD	430
[A-2>V, V-9>H, D-11>E] Rev D-4F	<u>F</u> VEKFKEA <u>H</u> K <u>E</u> YFAK <u>F</u> WD	431
[A-2>V, V-9>H, D-18>E] Rev D-4F	<u>F</u> VEKFKEA <u>H</u> KDYFAK <u>F</u> W <u>E</u>	432
[A-8>H]Rev-4F	FAEKFK <u>E</u> H <u>V</u> KDYFAK <u>F</u> WD	433
[A-8>H, D-E cambiado]Rev-4F	FADKFK <u>D</u> H <u>V</u> K <u>E</u> YFAK <u>F</u> W <u>E</u>	434
[A-8>H, D>E] Rev-4F	FAEKFK <u>E</u> H <u>V</u> K <u>E</u> YFAK <u>F</u> W <u>E</u>	435
[A-8>H, E>D]Rev-4F	FADKFK <u>D</u> H <u>V</u> KDYFAK <u>F</u> WD	436
[A-8>H, E-3>D]Rev-4F	FADKFK <u>E</u> H <u>V</u> KDYFAK <u>F</u> WD	437
[A-8>H, E-7>D]Rev-4F	FAEKFK <u>D</u> H <u>V</u> KDYFAK <u>F</u> WD	438
[A-8>H, D-11>E]Rev-4F	FAEKFK <u>E</u> H <u>V</u> K <u>E</u> YFAK <u>F</u> WD	439
[A-8>H, D-18>E]Rev-4F	FAEKFK <u>E</u> H <u>V</u> KDYFAK <u>F</u> W <u>E</u>	440
[A-8>F, F-13>H]Rev-4F	FAEKFK <u>E</u> F <u>V</u> KDY <u>H</u> AK <u>F</u> WD	441
[A-8>F, F-13>H, D-E cambiado] Rev-4F	FADKFK <u>D</u> F <u>V</u> K <u>E</u> Y <u>H</u> AK <u>F</u> W <u>E</u>	442
[A-8>F, F-13>H, E-3>D] Rev-4F	FADKFK <u>E</u> F <u>V</u> KDY <u>H</u> AK <u>F</u> WD	443
[A-8>F, F-13>H, E-7>D] Rev-4F	FAEKFK <u>D</u> F <u>V</u> KDY <u>H</u> AK <u>F</u> WD	444
[A-8>F, F-13>H, E>D]Rev-4F	FADKFK <u>D</u> F <u>V</u> KDY <u>H</u> AK <u>F</u> WD	445
[A-8>F, F-13>H, D>E]Rev-4F	FAEKFK <u>E</u> F <u>V</u> K <u>E</u> Y <u>H</u> AK <u>F</u> W <u>E</u>	446
[A-8>F, F-13>H, D-11>E] Rev-4F	FAEKFK <u>E</u> F <u>V</u> K <u>E</u> Y <u>H</u> AK <u>F</u> WD	447
[A-8>F, F-13>H, D-18>E] Rev-4F	FAEKFK <u>E</u> F <u>V</u> KDY <u>H</u> AK <u>F</u> W <u>E</u>	448
[A-8>F, F16>H]Rev.-4F	FAEKFK <u>E</u> F <u>V</u> KDYFAK <u>H</u> W <u>D</u>	449

ES 2 741 359 T3

(continuación)

Nombre del Péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
[A-8>F, F16>H, D-E cambiado]Rev.-4F	FADKFK <u>D</u> FVK <u>E</u> YFAKH <u>W</u> <u>E</u>	450
[A-8>F, F16>H, D>E]Rev.-4F	FAEKFK <u>E</u> FVK <u>E</u> YFAKH <u>W</u> <u>E</u>	451
[A-8>F, F16>H, E>D]Rev.-4F	FADKFK <u>D</u> FVKDYFAKH <u>W</u> <u>D</u>	452
[A-8>F, F16>H, E-3>D] Rev.-4F	FADKFK <u>E</u> FVKDYFAKH <u>W</u> <u>D</u>	453
[A-8>F, F16>H, E-7>D] Rev.-4F	FAEKFK <u>D</u> FVKDYFAKH <u>W</u> <u>D</u>	454
[A-8>F, F16>H, D-11>E] Rev.-4F	FAEKFK <u>E</u> FVK <u>E</u> YFAKH <u>W</u> <u>D</u>	455
[A-8>F, F16>H, D-18>E] Rev.-4F	FAEKFK <u>E</u> FVKDYFAKH <u>W</u> <u>E</u>	456
Rev-[D>E]-4F	FAEKFK <u>E</u> AV <u>K</u> <u>E</u> YFAK <u>F</u> <u>W</u> <u>E</u>	457
Rev-[E>D]4F	FADKFK <u>D</u> AVKDYFAK <u>F</u> <u>W</u> <u>D</u>	458
Rev-R4-4F	FA <u>E</u> <u>R</u> FREAVKDYFAK <u>F</u> <u>W</u> <u>D</u>	459
Rev-R6-4F	FAEK <u>F</u> REAVKDYFAK <u>F</u> <u>W</u> <u>D</u>	460
Rev-R10-4F	FAEKFK <u>E</u> AV <u>R</u> DYFAK <u>F</u> <u>W</u> <u>D</u>	461
Rev-R14 -4F	FAEKFK <u>E</u> AVKDYFA <u>R</u> <u>F</u> <u>W</u> <u>D</u>	462
Rev-[D>E]-4F	FAEKFK <u>E</u> AV <u>K</u> <u>E</u> YFAK <u>F</u> <u>W</u> <u>E</u>	463
Rev-[E>D]4F	FADKFK <u>D</u> AVKDYFAK <u>F</u> <u>W</u> <u>D</u>	464
Rev-R4-4F	FA <u>E</u> <u>R</u> FREAVKDYFAK <u>F</u> <u>W</u> <u>D</u>	465
Rev-R6-4F	FAEK <u>F</u> REAVKDYFAK <u>F</u> <u>W</u> <u>D</u>	466
Rev-R10-4F	FAEKFK <u>E</u> AV <u>R</u> DYFAK <u>F</u> <u>W</u> <u>D</u>	467
Rev-R14 -4F	FAEKFK <u>E</u> AVKDYFA <u>R</u> <u>F</u> <u>W</u> <u>D</u>	468
Rev-[D>E]-4F	FAEKFK <u>E</u> AV <u>K</u> <u>E</u> YFAK <u>F</u> <u>W</u> <u>E</u>	469
Rev-[E>D]4F	FADKFK <u>D</u> AVKDYFAK <u>F</u> <u>W</u> <u>D</u>	470
Rev-R4-4F	FA <u>E</u> <u>R</u> FREAVKDYFAK <u>F</u> <u>W</u> <u>D</u>	471
Rev-R6-4F	FAEK <u>F</u> REAVKDYFAK <u>F</u> <u>W</u> <u>D</u>	472
Rev-R10-4F	FAEKFK <u>E</u> AV <u>R</u> DYFAK <u>F</u> <u>W</u> <u>D</u>	473
Rev-R14 -4F	FAEKFK <u>E</u> AVKDYFA <u>R</u> <u>F</u> <u>W</u> <u>D</u>	474
Rev-R4-4F	FA <u>E</u> <u>R</u> FREAVKDYFAK <u>F</u> <u>W</u> <u>D</u>	475
Rev-R6-4F	FAEK <u>F</u> REAVKDYFAK <u>F</u> <u>W</u> <u>D</u>	476
Rev-R10-4F	FAEKFK <u>E</u> AV <u>R</u> DYFAK <u>F</u> <u>W</u> <u>D</u>	477
Rev-R14 -4F	FAEKFK <u>E</u> AVKDYFA <u>R</u> <u>F</u> <u>W</u> <u>D</u>	478
Rev-[D>E]-4F	FAEKFK <u>E</u> AV <u>K</u> <u>E</u> YFAK <u>F</u> <u>W</u> <u>E</u>	479
Rev-[E>D]4F	FADKFK <u>D</u> AVKDYFAK <u>F</u> <u>W</u> <u>D</u>	480
Rev-R4-4F	FA <u>E</u> <u>R</u> FREAVKDYFAK <u>F</u> <u>W</u> <u>D</u>	481
Rev-R6-4F	FAEK <u>F</u> REAVKDYFAK <u>F</u> <u>W</u> <u>D</u>	482
Rev-R10-4F	FAEKFK <u>E</u> AV <u>R</u> DYFAK <u>F</u> <u>W</u> <u>D</u>	483
Rev-R14 -4F	FAEKFK <u>E</u> AVKDYFA <u>R</u> <u>F</u> <u>W</u> <u>D</u>	484
Rev3F-2	LF <u>E</u> KF <u>A</u> EAFKDYVAKW <u>K</u> <u>D</u>	485
RevR4-3F-2	LF <u>E</u> RF <u>A</u> EAFKDYVAKW <u>K</u> <u>D</u>	486
RevR10-3F2	LF <u>E</u> KF <u>A</u> EAFRDYVAKW <u>K</u> <u>D</u>	487

ES 2 741 359 T3

(continuación)

Nombre del Péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
RevR15-3F-2	LFEKFAEAFKDYVARWKD	488
Rev R17-3F-2	LFEKFAEAFKDYVAKWRD	489
Rev[D>E]3F2	LFEKFAEAFKEYVAKWKE	490
Rev[E>D]3F-2	LFDKFADAFKDYVAKWKD	491
Rev-[E3>D]-3F-2	LFDKFAEAFKDYVAKWKD	492
Rev-[E7>D]-3F-2	LFEKFADAFKDYVAKWKD	493
Rev[D 11 >E]3F-2	LFEKFAEAFKEYVAKWKD	494
Rev-[D 18>E]3F-2	LFEKFAEAFKDYVAKWKE	495
Rev3F-1	FAEKAWEFVKDYFAKLKD	496
RevR4-3F-1	FAERAWEFVKDYFAKLKD	497
RevRI0-3F-1	FAEKAWEFVKDYFAKLKD	498
RevR15-3F-1	FAEKAWEFVKDYFAKLKD	499
RevR17-3F-1	FAEKAWEFVKDYFAKLKD	500
Rev[D>E]3F-1	FAEKAWEFVKEYFAKLKE	501
Rev[E>D]3F-1	FADKAWDFVKDYFAKLKD	502
Rev[E3>D]-3F-1	FADKAWEFVKDYFAKLKD	503
Rev[E7>D]3F-1	FAEKAWDFVKDYFAKLKD	504
Rev-[D11>E]3F-1	FAEKAWEFVKEYFAKLKD	505
Rev-[D 18>E]3F-1	FAEKAWEFVKDYFAKLKE	506
Rev-5 F	FFEKFKEFVKDYFAKLWD	507
Rev-[D>E]5F	FFEKFKEFVKE ^u YFAKLWE	508
Rev-[E>D]5F	FFDKFKDFVKDYFAKLWD	509
Rev-R4-5F	FFERFKEFVKDYFAKLWD	510
Rev-R6-5F	FFEKFREFVKDYFAKLWD	511
Rev-R10-5F	FFEKFKEFVRDYFAKLWD	512
Rev-R15-5F	FFEKFKEFVKDYFARLWD	513
Rev-[E3>D]-5F	FFDKFKDFVKDYFAKLWD	514
Rev-[E7>D]5F	FFEKFKDFVKDYFAKLWD	515
Rev-[D 11 >E]-5F	FFEKFKEFVKE ^u YFAKLWD	516
Rev-[D 18>E]-5F	FFEKFKEFVKDYFAKLWE	517
Rev-5F-2	FLEKFKEFVKDYFAKFWD	518
Rev-[D>E]-5F-2	FLEKFKEFVKE ^u YFAKFWE	519
Rev-[E>D]-5F-2	FLDKFKDFVKDYFAKFWD	520
Rev-[E3>D]-5F-2	FLDKFKDFVKDYFAKFWD	521
Rev-[E7>D]-5F-2	FLEKFKDFVKDYFAKFWD	522
Rev-[D 11 >E]-5F-2	FLEKFKEFVKE ^u YFAKFWD	523
Rev-[D18>E]-5F-2	FLEKFKEFVKDYFAKFWE	524
Rev-R4-5F-2	FLERFKEFVKDYFAKFWD	525

ES 2 741 359 T3

(continuación)

Nombre del Péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
Rev-R6-5F-2	FLEKFREFVKDYFAKFWD	526
RevR10-5F-2	FLEKFKEFVRDYFAKFWD	527
Rev-R16-5F-2	FLEKFKEFVKDYFARFWD	528
Rev-6 F	FFEKFKEFFKDYFAKLWD	529
Rev-[D>E]-6F	FFEKFKEFFKE \underline{E} YFAKLW \underline{E}	530
Rev-[E>D]-6F	FFDKFKDFFKDYFAKLWD	531
Rev-R4-6F	FFERFKEFFKDYFAKLWD	532
Rev-R6-6F	FFEKFREFFKDYFAKLWD	533
Rev-R10-6F	FFEKFKEFFRDYFAKLWD	534
Rev-R14-6F	FFERFKEFFKDYFARLWD	535
Rev-[E3>D]-6F	FFDKFKEFFKDYFAKLWD	536
Rev-[E7>D]-6F	FFEKFKDFFKDYFAKLWD	537
Rev-[D 11 >E]-6F	FFEKFKEFFKE \underline{E} YFAKLWD	538
Rev-[D 18>E]-6F	FFEKFKEFFKDYFAKLW \underline{E}	539
Rev-4F	FAEKFKEAVKDYFAKFWD	540
Rev-[D>E]-4F	FAEKFKEAVKE \underline{E} YFAKFWE \underline{E}	541
Rev-[E>D]4F	FADKFKDAVKDYFAKFWD	542
Rev-R4-4F	FAERFREAVKDYFAKFWD	543
Rev-R6-4F	FAEKFREAVKDYFAKFWD	544
Rev-R10-4F	FAEKFKEAVRDYFAKFWD	545
Rev-R14 -4F	FAEKFKEAVKDYFARFWD	546
4F-2	DKWKAVYDKFAEAFKEFF	547
[D>E]-4F-2	EKWKAVYEKFAEAFKEFF	548
[E>D]-4F-2	DKWKAVYDKFADAFK \underline{D} FF	549
R2-4F-2	DRWKAVYDKFAEAFKEFF	550
R4-4F-2	DKWR \underline{R} AVYDKFAEAFKEFF	551
R9-4F-2	DKWKAVYDRFAEAFKEFF	552
R14-4F-2	DKWKAVYDKFAEAFREFF	553
Rev4F-2	FFEKF \underline{E} AEAFKDYVAKWKD	554
Rev-[D>E]-4F-2	FFEKF \underline{E} AEAFKE \underline{E} YVAKWKE \underline{E}	555
Rev-[E>D]-3F-2	FFDKFADAFKDYVAKWKD	556
Rev-R4-4F-2	FFERFAEAFKDYVAKWKD	557
Rev-R10-4F-2	FFERFAEAFRDYVAKWKD	558
Rev-R15-4F-2	FFEKF \underline{E} AEAFKDYVARW \underline{R} KD	559
Rev-R17-4F-2	FFERFAEAFKDYVAKWR \underline{D}	560
Rev-[E3>D]-4F-2	FFDKFAEAFKDYVAKWKD	561
Rev-[E7>D]-4F-2	FFEKFADAFKDYVAKWKD	562
Rev-[D 11 >E]-4F-2	FFERFAEAFKE \underline{E} YVAKWKD	563

ES 2 741 359 T3

(continuación)

Nombre del Péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
Rev-[D18>E]-4F-2	FFERFAEAFKDYVAKWKE	564
Rev-7 F	FFEKFKEFFKDYFAKFW	565
Rev-[E>D]-7F	FFDKFKDFFKDYFAKFW	566
Rev-[D>E]-7F	FFEKFKEFFKE E YFAKFW	567
Rev-R4-7F	FFERFKEFFKDYFAKFW	568
Rev-R6-7F	FFEKFREFFKDYFAKFW	569
Rev-R10-7F	FFEKFKEFFRDYFAKFW	570
Rev-R14-7F	FFEKFKEFFKDYFARFW	571
Rev-[E3>D]-7F	FFDKFKEFFKDYFAKFW	572
Rev-[E7>D]7F	FFEKFKDFFKDYFAKFW	573
Rev-[D 11 >E]-7F	FFEKFKEFFKE E YFAKFW	574
Rev-[D 18>E]-7F	FFEKFKEFFKDYFAKFW	575
	EVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFEPLVE	576
	EVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFE	577
	EVRSKLEEWFAAFREFAEEFLARLKS	578
	PVLDLFRELLNELLEALKQKLK	579
	DWLKAFYDKVAEKLKEAF- P- DWAKAAYDKAAEKAKEAA	580
	EELKEKLEELKEKLEEKL-P- EELKEKLEELKEKLEEKL	581
	EELKAKLEELKAKLEEKL-P- EELKAKLEELKAKLEEKL	582
	EKLKALLEKLLAKLKELL P- EKLKALLEKLLAKLKELL	583
	EWLKELLEKLEKLEKLEKLL-P- EWLKELLEKLEKLEKLEKLL	584
	EKFKEELLEKFLEKFKELL-P- EKFKEELLEKFLEKFKELL	585
	EKLKELLEKLELLELLKLL-P- EKLKELLEKLELLELLKLL	586
	EKLKELLEKLEKLEKLEKLL-P- EKLKELLEKLEKLEKLEKLL	587
	EKLKELLEKLLAKLKELL-P- EKLKELLEKLLAKLKELL	588
	EKFKEELLEKLEKLEKLEKLL-P- EKFKEELLEKLEKLEKLEKLL	589
	EKLKAKLEELKAKLEELL-P- EKLKAKLEELKAKLEELL	590

(continuación)

Nombre del Péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
	EELKELLKELLKKLEKLL-P- ELKELLKELLKKLEKLL	591
	EELKKLLEELLKKLKELL-P- EELKKLLEELLKKLKELL	592
	EKLKELLEKLEKLEKLL-A- EKLKELLEKLEKLEKLL	593
	EKLKELLEKLEKLEKLL-AA- EKLKELLEKLEKLEKLL	594
	EKLKAKLEELKAKLEELL-P- EKAKAALEEAkakAEELA	595
	EKLKAKLEELKAKLEELL-P- EHAKAALEEAkckAEELA	596
	DHLKAFYDKVACKLKEAF-P- DWAKAAYDKAAEKAKEAA	597
	DWLKAFYDKVAEKLKEAF-P- DHAKAAYDKAAckAKEAA	598
	DWLKAFYDKVACKLKEAF-P- DWAKAAYNKAaEKAKEAA	599
	DHLKAFYDKVAEKLKEAF-P- DWAKAAYDKAAEKAKEAA	600
	VLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQ	601
(3F ^{Crr})	DKWKAVYDKFAEAFKEFL	602
(3F ^{rr})	DKLKAFYDKVFEWAKEAF	603

Apo-J (péptidos G*).

También se descubrió que los péptidos que imitan los dominios helicoidales anfipáticos de apoJ también son capaces de mitigar uno o más síntomas de aterosclerosis y/u otras patologías descritas en el presente documento. La apolipoproteína J posee una cara ancha no polar denominada tipo de proteína globular, o dominios helicoidales anfipáticos G*. La hélice anfipática de clase G se encuentra en proteínas globulares, y por tanto, la clase G nombrada. Esta clase de hélice anfipática se caracteriza por una distribución aleatoria de restos cargados positivamente y cargados negativamente en la cara polar con una cara estrecha no polar. Debido a la cara no polar estrecha esta clase no se asocia fácilmente con los fosfolípidos. El G* de hélice anfipática posee características similares, pero no idénticas, de la hélice anfipática G. Similar a la hélice anfipática de clase G, Los péptidos de la clase G* poseen una distribución aleatoria de restos cargados positiva y negativamente en la cara polar. Sin embargo, en contraste con la hélice anfipática de clase G que tiene una cara estrecha no polar, esta clase tiene una cara no polar ancha que le permite a esta clase unirse fácilmente a fosfolípido y la clase se denomina G* para diferenciarla de la clase G de la hélice anfipática.

Varios péptidos anfipáticos G* adecuados se describen en los documentos de patente de Estados Unidos N.ºs: 6.930.085 y 7.638.494, y en la Publicación PCT N.º: PCT/US03/09988 (documento WO 2003/086326) que se incorporan en el presente documento como referencia para los péptidos descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones los péptidos G' (apoJ) expresados en las plantas transgénicas comprenden uno o más dominios que tienen una secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 2 o la secuencia inversa.

Tabla 2. Ciertos péptidos relacionados con los dominios helicoidales anfipáticos G* de apo J que pueden expresarse en plantas transgénicas, por ejemplo, como se describe en el presente documento. Para cada secuencia enumerada en esta tabla, también se contempla la forma retro de la secuencia. Así, por ejemplo donde se muestra la secuencia DQYYLRVTTVA (SEQ ID NO: 605), también se contempla la secuencia de aminoácidos AVTTVRLYYQD (SEQ ID NO: 604).

Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
DQYYLRVTTVA	605
ECKPCLKQTCMKFYARVCR	606
FSRASSIIDELFQD	607
IQNAVNGVKQIKTLIEKTNEE	608
LLEQLNEQFNWVSRLANL	609
LLEQLNEQFNWVSRLANLTEGE	610
LLEQLNEQFNWVSRLANLTQGE	611
LVGRQLEEF	612
MNGDRIDSLLEN	613
NELQEMSNQGSKYVNKEIQNAVNGV	614
PCLKQTCMKFYARVCR	615
PFLEMIHEAQQAMDI	616
PGVCNETMMALWEECK	617
PKFMETVAEKALQEYRKKHRE	618
PSGVTEVWKLFD	619
PSQAKLRREDES LQVAERLTRKYNELLKSYQ	620
PTEFIREGDDD	621
QQTHMLDVMQD	622
RKTLLSNLEEAKKKKEDALNETRESETKLKL	623
RMKDQCDKCREILSV	624

Péptidos miméticos de ApoE

5 Los péptidos miméticos de ApoE también han demostrado tener actividades similares a las descritas anteriormente para los péptidos miméticos de ApoA-I, particularmente con respecto a la disfunción neurológica y/u ocular (ver, por ejemplo, Handattu *et al.* (2010) *J. Lipid Res.* 51: 3491-3499; Laskowitz *et al.* (2001) *Experimental Neurology* 167: 74-85; Minami *et al.* (2010) *Molecular Neurodegeneration*, 5:16; Bhattacharjee *et al.* (2008) *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49: 4263-4268; Li *et al.* (2010) *J. Pharmacol. and Experimental Therapeutics* 334: 106-115; Klein y Yakel (2004) *Neurosci.*, 127: 563-567; Laskowitz *et al.* (2007) *J. of Neurotrauma* 24: 1093-1107; Christensen *et al.* (2011) *J. Immunol.*, 186: 2535-2542; Cray *et al.* (2004) *Biochemistry* 43: 7328-7335). En ciertas realizaciones los péptidos expresados en las plantas transgénicas comprenden uno o más dominios que tienen una secuencia de aminoácidos apoE o una secuencia dual de ApoE/ApoA-I mostrada en la Tabla 3 o la secuencia inversa.

15 Tabla 3. Ciertos péptidos ApoE que pueden expresarse en plantas transgénicas, por ejemplo, como se describe en el presente documento. Para cada secuencia enumerada en esta tabla, también se contempla la forma retro de la secuencia. Así, por ejemplo donde se muestra la secuencia GIKKFLGSIWKFIKAFVG (SEQ ID NO: 626), también se contempla la secuencia de aminoácidos GVFAKIFKWISGLFKKIG (SEQ ID NO: 625).

Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
Péptidos apoE:	
GIKKFLGSIWKFIKAFVG	626
GFKKFLGSWAKIYKAFVG	627
GFRRFLGSWARIYRAFVG	628
TEELRVRLASHLRKLRKRL	629
TEELRVRLASHLRKLRK	630
LRVRLASHLRKLRKRL	631
RLASHLRKLRKRL	632
SHLRKLRKRL	633
LRKLRKRL	634
LRKLRKRLLRKLRKRL	635
LRKLRKRLLRKLRKRLLRKLRKRL	636
RQIKIWFQNRMMKWKKCLRVLASHLRKLRKRL	637
LRVRLASHLRKLRKRL	638
EEELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKRLAVYEEQAQQIIRLQAEAFQARL KSWFEPLVEDM	639
CEELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKRLAVY	640
LRKLRKRLLRDADDLRLKLRKRLLRDADDL	641
TEELRVRLASHLRKLRKRL	642
TEELRVRLASHLEKLRKRL	643
TEELRVRLASHLRELKLRKRL	644

LREKKLRVSALRTHRLELRL	645
Péptidos miméticos duales de ApoE y ApoA-I:	
LRKLRKRLLRDWLKAFYDKVAEKLKEAF	646
LRRLRRLLLRDWLKAFYDKVAEKLKEAF	647
RRRRRRRRRRRDWLKAFYDKVAEKLKEAF	648

Se ha demostrado que en ciertas realizaciones, la unión del dominio de unión al receptor de la apolipoproteína E (apoE) a una hélice anfipática de clase A puede mejorar la internalización y degradación de LDL por los fibroblastos y puede disminuir el colesterol plasmático y restaurar la función endotelial (ver, por ejemplo, Datta *et al.* (2000) *Biochemistry* 39: 213-220; Gupta *et al.* (2005) *Circulation* 111: 3112-3118).

Por consiguiente en ciertas realizaciones, cualquiera de los péptidos descritos en el presente documento, cuando se expresa en una planta transgénica, se puede expresar como un péptido que también comprende un dominio de unión al receptor apoE (ver, por ejemplo, SEQ ID NOs: 646-648 para ejemplos ilustrativos).

En diversas realizaciones, péptidos que comprenden un dominio oxfolipina tal como Arg-Glu-Dpa-Thr-Gly-Leu-Ala-Trp-Glu-Trp-Trp-Arg-Thr-Val (SEQ ID NO: 649), donde Dpa (3,3'-difenil alanina) se sustituye con Trp, Phe, o Ala) también se contemplan. Los péptidos de oxfololina son descritos por Ruchala *et al.* (2010) *PLoS ONE* 5(4): e10181) y en la Publicación PCT N.º: PCT/US2010/046534 (WO/2011/031460), que se incorporan en el presente documento como referencia para los péptidos descritos en el presente documento y donde tales péptidos incorporan 3,3'-difenilalanina, Este resto se sustituye con Trp, Phe, o Ala.

Además de las secuencias enumeradas en las Tablas 1, 2, y 3 se contemplan secuencias de aminoácidos que comprenden 1 sustitución conservativa, 2 sustituciones conservativas, 3 sustituciones conservativas, 4 sustituciones conservativas, 5 sustituciones conservativas, 6 sustituciones conservativas, 7 sustituciones conservativas, 8 sustituciones conservativas, 9 sustituciones conservativas, o 10 sustituciones conservativas.

Los péptidos anteriores pretenden ser ilustrativos y no limitantes. En vista del sorprendente descubrimiento de que los péptidos miméticos de ApoA-I y otros péptidos relacionados pueden expresarse en una planta transgénica y pueden ser eficaces cuando se administran partes de una planta a un mamífero, un experto en la materia reconocerá que muchos otros péptidos de este tipo también pueden expresarse en tales plantas y alimentarse a un mamífero para proporcionar una utilidad similar.

Construcción y propagación de plantas transgénicas.

Ácidos nucleicos y vectores que expresan el(los) péptido(s) de interés.

En varias realizaciones se proporcionan métodos para construir células de plantas transgénicas. Los métodos típicamente implican el constructo de un vector (por ejemplo, un vector de plásmido) o un fragmento de ADN uniendo operativamente una secuencia de ADN que codifica el péptido(s) de interés (por ejemplo, péptidos que comprenden dominio(s) de ApoA-I, y/o G*, y/o ApoE) a un promotor funcional de la planta capaz de dirigir la expresión del péptido en la planta y luego transformar una célula vegetal con el vector plasmídico o el fragmento de ADN. Cuando sea preferente, el método puede extenderse para producir plantas transgénicas a partir de las células transformadas mediante la inclusión de una etapa de regeneración de una planta transgénica a partir de la célula vegetal transgénica.

Típicamente, el uso del codón del ácido nucleico que es para expresar la secuencia o secuencias de aminoácidos deseadas se selecciona para reflejar el uso óptimo del codón en esa planta. Los expertos en la materia conocen los métodos para optimizar el uso de codones para la expresión de un ácido nucleico en un organismo hospedador particular, y existen numerosas herramientas de software disponibles para dicha optimización. Por ejemplo, las tablas de codones están disponibles en la base de datos de uso de codones, mantenido por el Departamento de Investigación Genética de Plantas en Kazusa, Japón (ver, por ejemplo, www.kazusa.or.jp/codon/).

En ciertas realizaciones la secuencia de ácidos nucleicos optimizada en codón se incorpora en un vector de expresión (por ejemplo, un plásmido). Típicamente la secuencia de ácidos nucleicos está unida operativamente (puesta bajo control de) un promotor capaz de dirigir la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos en la planta hospedadora.

Promotores

Los promotores que son conocidos o que se sabe que causan la transcripción de un gen extraño en células vegetales son bien conocidos por los expertos en la materia. Tales promotores incluyen, por ejemplo, promotores de origen viral y promotores de origen vegetal. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles, y en diversas realizaciones, son promotores específicos del tejido. En diversas realizaciones cualquiera de estos promotores se contempla para la expresión de un péptido descrito en el presente documento en una planta/tejido vegetal.

Los promotores más comunes utilizados para la sobreexpresión constitutiva en plantas se derivan de fuentes de virus

de plantas, como el promotor 35S del mosaico de la coliflor (CaMV) (Odell *et al.* (1985) *Nature*, 313: 810-812). Este promotor, como promotores similares derivados de virus utilizados en sistemas de plantas, se extrae de genomas virales de ADN de doble cadena, que utilizan ARN polimerasa nuclear del hospedador y no parecen depender de ningún producto genético viral que actúe en forma trans. El promotor CaMV 35S ofrece una alta expresión en prácticamente todas las regiones de la planta transgénica, se puede obtener fácilmente en entornos académicos y de investigación, y está disponible en casetes de vectores de transformación de plantas que permiten una fácil subclonación del transgén de interés. El promotor CaMV35S puede conducir altos niveles de expresión de transgenes tanto en dicotiledóneas como en monocotiledóneas (Battraw y Hall (1990) *Plant Mol. Biol.* 15:527-538; Benfey *et al.* (1990) *EMBO J.* 9:1677-1684). En diversas realizaciones el promotor 35S de tamaño completo (-941 a +9 pb) (Odell *et al.* (1985) *Nature*, 313: 810-812) o varios fragmentos como un fragmento de 2343 pb se pueden usar. Otros promotores virales también son bien conocidos por los expertos en la materia. Estos incluyen, pero no están limitados al promotor del virus del mosaico de la vena de la yuca (CsVMV) (ver, por ejemplo, Verdaguer *et al.* (1996) *Plant Mol. Biol.* 31:1129-1139; Verdaguer *et al.* (1998) *Plant Mol. Biol.* 37:1055-1067; Li *et al.* (2001) *Plant Sci.* 160:877-887), promotores del virus de la raya del banano australiano (BSV) (ver, por ejemplo, Schenk *et al.* (2001) *Plant Mol. Biol.* 47: 399-412), promotor del virus del mosaico mirabilis (MMV) (ver, por ejemplo, Dey y Maiti (1999) *Plant Mol. Biol.* 40: 771-782), el promotor del virus del mosaico de la figura (FMV) (ver, por ejemplo, Sanger *et al.* (1990) *Plant Mol. Biol.* 14: 433-443;; Maiti *et al.* (1997) *Transgenic Res.* 6: 143-156) y similares.

Los promotores de plantas endógenas también se usan regularmente para impulsar altos niveles constitutivos de expresión del transgén (Gupta *et al.* (2001) *Plant Biotechnol.* 18: 275-282; Dhankher *et al.* (2002) *Nature Biotechnol.* 20: 1-6). Varios de estos promotores constitutivos fuertes se derivan de los genes de actina y ubiquitina. Por ejemplo, el promotor Act2 se desarrolló a partir de la familia de genes de actina en *Arabidopsis* (An *et al.* (1996) *Plant J.* 10:107-121). El promotor del gen de la actina 1 del arroz también se ha desarrollado para su uso en sistemas de cereales (McElroy *et al.* (1991; Zhang *et al.* (1991) *Plant Cell* 3: 1155-1165) y dirige la expresión en prácticamente todos los tejidos excepto el xilema cuando se transforma nuevamente en arroz. Promotores de ubiquitina, por ejemplo el promotor de ubiquitina 1 de maíz (pUbi) han proporcionado una alta expresión de genes heterólogos en protoplastos de maíz. El promotor de maíz Ubi 1: La fusión GUS se ha utilizado en el arroz (Cornejo *et al.* (1993) *Plant Mol. Biol.* 23: 567-581). También se ha demostrado que el promotor del gen Ubi.U4 conduce una alta actividad de expresión (Garbarino *et al.* (1995) *Plant Physiol* 109: 1371-1378).

Una serie de tejidos específicos (por ejemplo, específico para la fruta, semilla/grano, tubérculos/sistemas de almacenamiento de raíces, floretes/flores, Hojas/tejido verde, anteras/polen, y similares se conocen. Los promotores específicos ilustrativos, pero no limitantes específicos de la fruta incluyen, por ejemplo, promotores del gen de la 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) oxidasa, el gen E8, y los genes de la poligalacturonasa (PG) se han caracterizado en la manzana (Atkinson *et al.* (1998) *Plant Mol. Biol.* 38: 449-460) y tomate (Montgomery *et al.* (1993) *Plant Cell* 5: 1049-1062; Nicholass *et al.* (1995) *Plant Mol. Biol.* 28: 423-435; Deikman y Fischer (1988) *EMBO J.* 7: 3315-3320). El promotor del gen E8 del tomate se ha utilizado con éxito en varios casos para dirigir la expresión del transgén a la fruta. El promotor del gen de la poligalacturonasa del tomate (el producto del gen PG se acumula durante la maduración y se asocia con el ablandamiento de la fruta) se ha utilizado para dirigir la expresión de genes heterólogos (Fraser *et al.* (2002) *Eur. J. Biochem.* 270:1365-1380). En tomate, un solo gen codifica PG, y el análisis de un fragmento de promotor de 1,4 kb muestra que también dirige la expresión específica de maduración (Montgomery *et al.* (1993) *Plant Cell* 5: 1049-1062). La fitoeno desaturasa (Pds) es la segunda enzima dedicada a la biosíntesis de carotenoides y también está codificada por un solo gen en el tomate (Giuliano *et al.* (1993) *Plant Cell* 5: 379-387). Debido a que los carotenoides se acumulan en los cloroplastos y cromoplastos, el promotor Pds de tomate (2,0 kb desde el inicio de la traducción) impulsa altos niveles de expresión en órganos y tejidos en desarrollo donde se encuentran los cromoplastos (frutos, pétalos, anteras) (Corona *et al.* (1996) *Plant J.* 9: 505-512).

La expresión transgénica específica de la semilla se ha utilizado para varias aplicaciones de ingeniería genética. Los promotores específicos ilustrativos de semillas incluyen, pero no se limitan a los promotores de diversas proteínas de almacenamiento de semillas. Otros promotores específicos de semillas incluyen por ejemplo, los de la β -conglucina de soja (Chen *et al.* (1989) *Dev. Genet.* 10: 112-122; Chamberland *et al.* (1992) *Plant Mol. Biol.* 19: 937-949; Lessard *et al.* (1993) *Plant Mol. Biol.* 5: 873-885), los genes de la heliantina de girasol (Nunberg *et al.* (1994) *Plant Cell* 6: 473-486), y similares. Uno de los promotores específicos de semilla mejor caracterizados y más comúnmente utilizados es el gen de la beta-faseolina de la judía francesa (ver, por ejemplo, Bustos *et al.* (1989) *Plant Cell* 1: 839-853; van der Geest y Hall (1997) *Plant J.* 6: 413-423). Otro promotor específico de semilla útil es el promotor de α -globulina de algodón (Sunilkumar *et al.* (2002) *Transgenic Res.* 11: 347-359) y se ha caracterizado en algodón, arábido, y tabaco. En monocotiledóneas, varios promotores de proteínas de almacenamiento incluyen, pero no se limitan a los promotores de hordeína específicos del endospermo en la cebada (Forde *et al.* (1985) *Nucleic Acids Res.* 13: 7327-7339), promotores de glutenina del trigo (Lamacchia *et al.* (2001) *J. Exp. Bot.* 52: 243-250), los promotores de zeína en maíz (Marzabal *et al.* (1998) *Plant J.* 16: 41-52), y el gen de almidón sintasa 1 (*gbss1*) unido a gránulos en el trigo (Kluth *et al.* (2002) *Plant Mol. Biol.* 49: 669-682).

Los promotores específicos de tubérculos/almacenamiento de raíces incluyen, pero no se limitan a los miembros de la familia patata clase I de patata, B33 y PAT 21 (Jefferson *et al.* (1990; Liu *et al.* (1991), el promotor de la sintasa de almidón unido a los gránulos de la patata (GBSS), batata, promotores de esporamina y β -amilasa (Maeo *et al.* (2001) *Plant Mol. Biol.* 46: 627-637), por ejemplo, el promotor gSPO-A1 (Ohta *et al.* (1991) *Mol. Gen. Genet.* 225: 369-378).

Los promotores específicos de nódulos de la raíz asociados a rizobio - leguminosa incluyen los promotores de genes expresados temprano en la organogénesis de los nódulos (genes ENOD) (ver, por ejemplo, Lauridsen *et al.* (1993) Plant J. 3: 484-492; Vijn *et al.* (1995) Plant Mol. Biol. 28: 1103-1110; Fang y Hirsch (1998) Plant Physiol. 116: 53-68; Hohnjec *et al.* (2000) Mol. Gen. Genet. 264: 241-250), promotores de la nodulina tardía (ver, por ejemplo, Sandal *et al.* (1987) Nucleic Acids Res. 15: 1507-1519; Stougaard *et al.* (1987) EMBO J. 6: 3565-3569), promotores de leghemoglobina, el promotor *glb3* de leghemoglobina de *Sesbania rostrata* (ver, por ejemplo, Szabados *et al.* (1990) Plant Cell 2: 973-986; Szczyglowski *et al.* (1996) Plant Mol. Biol. 31: 931-935), y similares.

Se describen promotores específicos de la raíz, por ejemplo, por Yamamoto *et al.* (1991) Plant Cell 3: 371-382. Los promotores específicos de raíz que no son de la planta incluyen los promotores de los genes de loci (rol) de enraizamiento que se encuentran en el plásmido Ri (que induce la raíz) de *A. rhizogenes* (por ejemplo, el promotor rolD), el dominio A del promotor CaMV 35S (Benfey y Chua (1989) Plant Cell 2: 849-856), el promotor TobRB7 del tabaco (Yamamoto *et al.* (1991) Plant Cell 3: 371-382), y similares.

Los promotores específicos para hojas/tejidos verdes incluyen, pero sin limitación, promotores de la familia multigénica *rbcS* que codifican la subunidad pequeña de ribosa-1,5-disfosfato carboxilasa como el promotor *rbcS-3A* de guisante, el promotor *rbcS* de alfalfa, el promotor Rubisco, promotores de los genes de la proteína de unión a/b (Cab) de la clorofila (por ejemplo, el promotor CAB2) (Piechulla *et al.* (1998) Plant Mol. Biol. 38: 655-662), el promotor RAc de alfalfa de 1532 pb, y similares.

Los ejemplos ilustrativos, pero no limitantes de promotores específicos de tejido se muestran en la Tabla 4.

La tabla 4 muestra ejemplos ilustrativos, pero no limitantes de promotores específicos de tejido.

Tejido	Promotores ilustrativos
Específico de fruta	ACC oxidasa de manzana Poligalactouronidasa de tomate <i>E8 Tomate</i> <i>PDS Tomate</i>
Específico tejido verde	<i>rbcS-3A</i> de guisante <i>CAB2 Arabidopsis</i> <i>RAc Alfalfa</i>
Específico nódulo	VfEnod12 de <i>Vicia faba</i> NVP30 de judía leghemoglobina de <i>S. rostrata</i>
Específico raíz	<i>rolD</i> de <i>A. rhizogenes</i> Dominio A, CaMV 35S TobRB7 tabaco

(continuación)

Tejido	Promotores ilustrativos
Específico tubérculo/órgano de almacenamiento	Patatina B33 de patata Patatina PAT21 de patata GBSS de patata
Específico semilla	Beta-faseolina de judía Alfa-globulina de algodón <i>gbss1</i> de trigo Zma10 Kz o Zmag12 (gen de zeína de maíz) Zmag12 (gen de la glutelina del maíz)
Específico flores	<i>UEP1</i> de crisantemo <i>CHS15</i> de judía EPSPS de petunia
Específico de polen	ZMC5 de maíz <i>lat52 Tomate</i>
Específico de pistilo	<i>PsTL1</i> de pera SK2 de patata

En ciertas realizaciones, el péptido(s) descrito en el presente documento se expresa bajo el control del promotor CaMV. Como se usa en el presente documento, la expresión promotor "CaMV 35S" incluye variaciones de promotor CaMV 35S, por ejemplo promotores derivados de ligaduras con regiones de operador, mutagénesis aleatoria o controlada, *etc.*). En ciertas realizaciones, El péptido(s) descrito en el presente documento se expresa bajo el control del promotor E8. En ciertas realizaciones, el péptido(s) descritas en el presente documento se expresan bajo el control del promotor de plantas híbridas de tomate E4/E8 (ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N.º 6.118.049).

Vectores

Tal como se ha indicado anteriormente, el ácido nucleico que codifica el o los péptidos descritos en el presente documento se coloca en un vector (por ejemplo, un vector plásmido) bajo el control del promotor deseado. En ciertas realizaciones el vector (por ejemplo, vector plásmido) puede codificar además uno o más marcadores seleccionables (por ejemplo, un marcador de resistencia a antibióticos como el gen *npt II* para resistencia a kanamicina) y marcadores que confieren la selección por higromicina, estreptomycinina, espectinomycinina, o fosfinotricina. Los marcadores seleccionables ilustrativos para uso en plantas incluyen, pero no se limitan a neomicina fosfotransferasa, higromicina fosfotransferasa, dihidrofolato reductasa, cloranfenicol acetil transferasa, gentamicina acetil transferasa, nopalina sintasa, octopina sintasa, p-galactosidasa, p-glucuronidasa, estreptomycinina fosfotransferasa, resistencia a bleomicina, luciferasa de luciérnaga, luciferasa bacteriana, treonina deshidratasa, metalotioneína i1, epsp sintasa, fosfinotricina acetil transferasa, acetolactato sintasa, bromoxinil nitrilasa, y similares.

En ciertas realizaciones el vector puede codificar un péptido señal (por ejemplo, ALPAH-A11 -*Phaseolus vulgaris*). Las secuencias que se pueden proporcionar incluyen, por ejemplo, una secuencia líder (por ejemplo, para permitir la secreción o la orientación vacuolar), y las señales de terminación de la traducción.

De manera más general los expertos en la materia conocen una serie de vectores para la transformación de células vegetales y la expresión génica heteróloga. Por ejemplo, las estructuras de una amplia gama de plásmidos que han demostrado ser eficaces en (a) transformación de plantas y expresión de genes heterólogos incluyendo los constructos que confieren resistencia a la kanamicina, higromicina, estreptomycinina, espectinomycinina y fosfinotricina, o que confieren la expresión del gen de la β -glucuronidasa (GUS) son descritas por Jones *et al.* (1992) *Transgenic Res.*, 1: 285-297. Construcciones de vectores binarios que transportan policonectores de los tipos pUC y Bluescript, plásmidos que permiten la expresión de cualquier marco de lectura heterólogo de los promotores de nopalina sintasa (nos) u octopina sintasa (ocs), así como el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, usando las secuencias de poliadenilación 3' de nopalina sintasa u octopina sintasa, también se presentan en esta referencia. Estos constructos permiten una elección de orientación del transgén resultante de interés, relativa a la orientación del gen marcador de selección. La mayoría de los plásmidos descritos por Jones *et al.* (*supra.*) están disponibles públicamente/comercialmente.

Ejemplos ilustrativos y no limitantes de vectores incluyen el vector pRL200 que se ha utilizado para transformar de manera estable la lechuga (ver, por ejemplo, Kanamoto *et al.* (2006) *Transgenic Res.*, 15: 205-217), el plásmido *pCAMB1381-GUS* se ha utilizado para atacar tejidos específicos en tomates (ver, por ejemplo, Lim *et al.* (2012) *Molecules and Cells* 34: 53-59), el vector pSBS4642, el vector de transformación de cloroplastos pLD, y similares.

Los medios para construir el "gen" heterólogo e incorporarlo en un plásmido son bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo el "gen" heterólogo puede sintetizarse químicamente usando un sintetizador de ADN. Los servicios comerciales también pueden proporcionar secuencias de ácidos nucleicos sintetizadas a pedido. La construcción se puede clonar en el vector usando, por ejemplo, procedimientos de clonación por PCR. Los métodos para hacer los constructos de ácido nucleico descritos en el presente documento son bien conocidos por los expertos en la materia, y los métodos específicos se ilustran en los ejemplos. Métodos de clonación y transformación, vectores de ADN y el uso de secuencias reguladoras son bien conocidos por los expertos en la materia y por ejemplo se pueden encontrar en *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel *et al.*, Wiley Interscience, 2004, incorporada por referencia en el presente documento.

En ciertas realizaciones los genes marcadores (por ejemplo, marcadores seleccionables) se eliminan de la planta transgénica. Los expertos en la materia conocen bien los métodos para eliminar marcadores seleccionables. En un enfoque ilustrativo, pero no limitante los genes marcadores se eliminan utilizando sistemas de vectores MAT. Los vectores MAT (Multi-Auto-Transformation) están diseñados para usar los oncogenes (*ipt*, *iaaM/H*, *rol*) de *Agrobacterium*, que controlan los niveles endógenos de hormonas vegetales y las respuestas celulares a los reguladores del crecimiento de las plantas, para diferenciar las células transgénicas, y para seleccionar plantas transgénicas libres de marcadores. Los oncogenes se combinan con el sistema de recombinación específico del sitio (R/RS). En la transformación, los oncogenes regeneran las plantas transgénicas y luego son eliminados por el sistema R/RS para generar plantas transgénicas sin marcadores. Protocolos para la elección de un promotor para los oncogenes y el gen de la recombinasa (R), el estado de los materiales vegetales y las condiciones de cultivo de tejidos se describen, por ejemplo, por Ebinuman *et al.* (2005) *Meth. Mol. Biol.*, 286: 237-254.

Selección de planta hospedadora

Una amplia variedad de especies de plantas se han transformado genéticamente con ADN extraño, utilizando varias técnicas diferentes para insertar genes (ver, por ejemplo, Wu (1989) Pp. 35-15 En: *Plant Biotechnology*, Kung, S. y Arntzen, eds., Butterworth Publishers, Boston, Mass; Deak *et al.* (1986) *Plant Cell Rep* 5, 97-100; McCormick *et al.* (1986) *Plant Cell Rep.*, 5: 81-84; Shahin y Simpson (1986) *Hort. Sci.* 21: 1199-1201; Umbeck *et al.* (1987) *Bio/Technology* 5: 263-266; Christon *et al.* (1990) *Trends Biotechnol.* 8: 145-151; Datta *et al.* (1990) *Bio/Technology* 8: 736-740; Hinchee *et al.* (1988) *Bio/Technology* 6: 915-922; Raineri *et al.* (1990) *Bio/Technology*, 8: 33-38; Fromm *et*

al. (1990) Bio/Technology 8: 833-839; y similares). Dado que muchas plantas comestibles utilizadas por los seres humanos como alimento o como componentes de la alimentación animal son plantas dicotiledóneas, en ciertas realizaciones, se prefiere emplear dicotiledóneas para la expresión del péptido(s) descrito en el presente documento, aunque la transformación monocotiledónea también es aplicable especialmente en la producción de ciertos granos útiles para la alimentación animal.

En ciertas realizaciones la planta hospedadora seleccionada para la transformación genética tiene un tejido comestible en donde se puede expresar el péptido(s) de interés. Así, en diversas realizaciones, el péptido(s) se puede expresar en una parte de la planta, como la fruta, hojas, vástagos, semillas, o raíces, que pueden ser consumidos por un ser humano o un animal para el cual están destinados el péptido(s).

Varias otras consideraciones pueden informar la selección de la planta hospedadora. A veces se prefiere que el tejido comestible de la planta hospedadora no requiera calentamiento antes del consumo ya que el calentamiento puede reducir la eficacia de la apolipoproteína o el mimético para uso humano o animal. También, a veces se prefiere que la planta hospedadora exprese el péptido(s) en forma de un líquido bebible.

En ciertas realizaciones las plantas que son adecuadas para la expresión de los péptidos descritos en el presente documento incluyen cualquier dicotiledónea o monocotiledónea que sea comestible en parte o en su totalidad por un ser humano o un animal. Las plantas ilustrativas incluyen, por ejemplo, tomates, zanahorias, patatas, manzanas, peras, ciruelas, melocotones, naranjas, kiwis, papayas, piñas, guayaba, liliroi, fruta estrella, lichi, mango, uva, granada, hojas de mostaza, kale, acelga, lechuga, soja, arroz, maíz y otros granos (por ejemplo, trigo, arroz, cebada, bulgur, farro, kamut, kaniwa, mijo, avena, quinoa, arroz, centeno, sorgo, espelta, teff, triticual, y similares), bayas como fresas, arándanos, moras, bayas de goji, y frambuesas, plátano, arroz, nabo, maíz, uva, higo, ciruela, patata, semillas de cártamo, nueces (por ejemplo, almendras, nogal, nueces pecanas, cacahuete, anacardo, macadamia, avellana, etc.), legumbres (por ejemplo, alfalfa, trébol, guisantes, judías (incluyendo judías negras), lentejas, altramuces, mezquite, algarroba, sojas, y similares), y similares. En ciertas realizaciones la expresión en plantas tales como tabaco y similares, también se contempla.

Métodos de transferencia de genes a plantas

Se puede usar cualquiera de una serie de protocolos de transformación para transformar las células vegetales y las plantas descritas en el presente documento. Si bien ciertas realizaciones preferentes que se describen a continuación utilizan protocolos de transformación particulares, los expertos en la materia entenderán que cualquier método de transformación puede utilizarse dentro de las definiciones y el alcance de la invención.

Hay varios métodos para introducir genes extraños en plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (ver, por ejemplo, Potrykus (1991) Annu. Rev. Plant Physiol, Plant Mol. Biol. 42:205-225; Shimamoto *et al.* (1989) Nature 338:274-27, y similares). Los métodos para la integración estable del ADN exógeno en el ADN genómico de la planta incluyen por ejemplo transferencia de genes mediada por agrobacterium, captación directa de ADN incluyendo métodos para la captación directa de ADN en protoplastos, captación de ADN inducida por breve choque eléctrico de las células vegetales, inyección de ADN en células o tejidos vegetales mediante bombardeo de partículas, o mediante el uso de sistemas de micropipetas, o mediante la incubación directa de ADN con polen en germinación; y el uso de virus de plantas como vectores genéticos.

La transformación y regeneración de plantas en dicotiledóneas por *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) está bien documentada. La aplicación del sistema *Agrobacterium tumefaciens* con, por ejemplo, el método de transformación del disco de la hoja (ver, por ejemplo, Horsch *et al.* (1988) Pp. 1-9 En: Plant Molecular Biology Manual AS, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht) permite la transferencia eficaz, selección y regeneración de genes.

También se ha encontrado que las monocotiledóneas son capaces de transformación genética por *Agrobacterium tumefaciens*, así como por otros métodos como la captación directa de ADN mediada por PEG (polietilenglicol) o electroporación. Transferencia exitosa de genes extraños en maíz (ver, por ejemplo, Rhodes *et al.* (1989) Science 240: 204-207) y el arroz (ver, por ejemplo, Toriyama *et al.* (1988) Bio/Technology 6: 1072-1074; Zhang y Wu (1988) Theor. Appl. Genet. 76: 835-840), tomate (ver, por ejemplo, Frary y Earl (1996) Plant Cell Rept. 15:235-240), así como protoplastos de trigo y sorgo, y muchas otras especies han sido demostradas.

El sistema *Agrobacterium* incluye el uso de vectores plasmídicos que contienen segmentos de ADN definidos que se integran en el ADN genómico de la planta. Los métodos de inoculación del tejido vegetal varían según la especie de planta y el sistema de administración de *Agrobacterium*. Un enfoque ilustrativo es el procedimiento del disco foliar que se puede realizar con cualquier explante de tejido que proporcione una buena fuente para el inicio de la diferenciación de la planta completa. El sistema *Agrobacterium* es especialmente viable en la creación de plantas dicotiledóneas transgénicas.

Como se indicó anteriormente hay varios métodos de transferencia directa de ADN a las células vegetales. En electroporación, los protoplastos se exponen brevemente a un campo eléctrico fuerte. En microinyección, el ADN se inyecta mecánicamente directamente en las células utilizando micropipetas muy pequeñas. En el bombardeo de

micropartículas, el ADN se adsorbe en microproyectiles como cristales de sulfato de magnesio o partículas de tungsteno, y los microproyectiles se aceleran físicamente en células o tejidos vegetales.

5 Otro método de transferencia de vectores es la transmisión de material genético utilizando virus de plantas modificados. El ADN de interés está integrado en los virus de ADN, y estos virus se utilizan para infectar plantas en sitios de heridas.

10 Un método de transfección que utiliza *Agrobacterium tumefaciens* se ilustra en el presente documento en los Ejemplos. Usando estas enseñanzas, muchas otras plantas pueden ser transformadas de manera similar. Los expertos en la materia deben reconocer que existen múltiples opciones de cepas de *Agrobacterium* y estrategias de construcción de plásmidos que pueden utilizarse para optimizar la transformación genética de las plantas. También reconocerán que *A. tumefaciens* puede no ser la única cepa de *Agrobacterium* utilizada. Otras cepas de *Agrobacterium* como *A. rhizogenes* pueden ser más adecuados en algunas aplicaciones.

15 Los métodos de inoculación del tejido vegetal varían según la especie de planta y el sistema de administración de *Agrobacterium*. Un enfoque muy conveniente es el procedimiento de disco foliar que puede realizarse con cualquier explante de tejido que proporcione una buena fuente para el inicio de la diferenciación de la planta completa. La adición de tejido de enfermería puede ser deseable en ciertas condiciones. Se pueden seguir otros procedimientos como la transformación *in vitro* de protoplastos en regeneración con *A. tumefaciens* para obtener células vegetales transformadas.

20 Se observa que los genes heterólogos se han expresado en una amplia variedad de plantas, plantas comestibles particulares. Así, por ejemplo, se ha utilizado un promotor (*Lhcb2*Ppl*) del gen de la proteína de unión a *a/b* de clorofila (Cab19) y un promotor CaMV *mas35S* mejorado para expresar genes heterólogos en tomates (ver, por ejemplo, Bassett *et al.* (2007) BMC Biotechnology 7: 47). Un promotor 35S::PtFT1 (promotor 35S CaMV) se ha utilizado con éxito en ciruelas (ver, por ejemplo, Srinivasan PLoS ONE 7(7):e40715) y en manzanas (ver, por ejemplo, Trankener *et al.* (2010) Planta 232:1309-1324). También se ha utilizado la secuencia promotora Suc2 del gen *SUC2* de *A. Thaliana* (sacarosa-H + simportador) (*Id.*). Otro promotor utilizado en manzanas fue el promotor Pgstl de patata (ver, por ejemplo, Malnoy *et al.* (2006) Transgenic Res., 15: 83-93). El promotor 35S CaMV se ha utilizado en manzanas durante muchos años (ver, por ejemplo, Gleave (1992) Plant Mol Biol. 20: 1203-1207). Otros promotores que son derivados del promotor 35S CaMV se han utilizado en manzanas como el promotor del inhibidor de la proteinasa II de patata (*Pin2*) (ver, por ejemplo, Ko *et al.* (2002) J. Amer. Soc. Hort. Sci. 127: 515-519). Butelli *et al.* usaron un vector binario (pDEL.ROS) que contenía los ADNc de *Delila* y *Roseal* de dragoniana bajo el control del promotor E8 de tomate para producir tomates enriquecidos en antocianinas (ver por ejemplo, Butelli *et al.* (2008) Nature Biotechnology 26: 1301-1308). Kesanakurti *et al.* (2012) Physiologia Plantarum 146: 136-148) usaron el promotor E8 para producir plantas de tomate para producir transgénicamente peroxidasa aniónica de tomate (*tap1*). Yang *et al.* (2012) Transgenic Res. 21: 1043-1056) demostraron que el promotor de zeaxantina epoxidasa de *Gentiana lutea* (*GIZEP*) estaba altamente expresado en plantas de tomate transgénicas.

40 En vista de lo anterior, un experto reconocerá que utilizando las enseñanzas y los ejemplos proporcionados en el presente documento, cualquiera de los péptidos (por ejemplo, péptidos miméticos de apoA-I) descritos en el presente documento puede expresarse en una cantidad eficaz en un tejido vegetal con la mayor parte de la experimentación de rutina.

45 Método de administración de plantas transgénicas y productos vegetales para uso terapéutico y/o profiláctico.

50 En varias realizaciones métodos para la profilaxis y/o tratamiento de diversas patologías, especialmente patologías caracterizadas por una respuesta inflamatoria (ver, por ejemplo, Tabla 5) se proporcionan. En ciertas realizaciones los métodos implican administrar a un mamífero que lo necesite (por ejemplo, un ser humano, un mamífero no humano) al menos una parte de una planta transgénica como se describe en el presente documento, y/o una apolipoproteína o péptido mimético de apolipoproteína derivado de dicha planta transgénica. En ciertas realizaciones toda o una parte de la planta se administra al mamífero. En ciertas realizaciones al mamífero se le administra el péptido en forma de un alimento y/o una proteína en polvo, y/o un suplemento nutricional, y/o una "barra de energía" y/o una "dieta definida".

55 En diversas realizaciones los métodos se utilizan en la profilaxis y/o el tratamiento de patologías que incluyen, pero sin limitación, aterosclerosis, artritis, cáncer, diabetes, fibrosis hepática, degeneración macular, enfermedad renal, obesidad, osteoporosis, esclerodermia, lupus eritematoso sistémico, vasculopatía por trasplante, y demencia vascular.

60 En ciertas realizaciones la patología es la aterosclerosis y la administración es para el tratamiento de la enfermedad o es una administración profiláctica. En ciertas realizaciones, la administración profiláctica es para un sujeto (por ejemplo, un mamífero humano o no humano) que muestra uno o más factores de riesgo para la aterosclerosis (por ejemplo, obesidad, antecedentes familiares, colesterol elevado, hipertensión, diabetes, síndrome metabólico, bajos niveles de colesterol HDL, niveles elevados de triglicéridos, o niveles de PCR de alta sensibilidad que se encuentran en la mitad superior de lo normal o están francamente elevados, y similares).

65 En ciertas realizaciones la patología es un cáncer y la administración es como un método terapéutico por derecho

5 propio y/o para aumentar los métodos terapéuticos y/o para reducir los efectos secundarios adversos a los métodos terapéuticos (por ejemplo, quimioterapia, radioterapia, *etc.*). Varios cánceres para los cuales se cree que la administración es adecuada incluyen, pero no se limitan a cáncer de ovarios, cáncer de colon, mieloma o mieloma múltiple, cáncer de mama, cáncer de hueso, cáncer cervical, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de piel incluyendo melanoma maligno, y cáncer de próstata.

En ciertas realizaciones la administración es para prevenir el inicio, retrasar la aparición y/o retardar la progresión de la enfermedad de Alzheimer y/u otra demencia.

10 Administración de planta transgénica o parte de planta.

15 En ciertas realizaciones al mamífero se le administra la planta transgénica que expresa un péptido que comprende o consiste en uno o más dominios de apolipoproteína (por ejemplo, dominios 6F, dominios 4F, *etc.*). En ciertas realizaciones el mamífero se alimenta con toda la planta, o ciertas partes de la planta. Tales partes incluyen por ejemplo, frutos, hojas, semilla, raíz, tallo, flor, y similares. En ciertas realizaciones, la planta o parte de ella se proporciona en forma de zumo, pulpa, o parte(s) molida(s) de la planta.

20 En ciertas realizaciones la planta, o parte de la misma, se proporciona en forma liofilizada o en forma seca (por ejemplo, como fruta seca, tomate seco, *etc.*). En ciertas realizaciones la planta o parte de la misma se liofiliza y/o se seca y luego se muele en un polvo que se puede administrar de esa forma al sujeto y/o se combina con otros componentes dietéticos (por ejemplo, como un ingrediente alimenticio) para su administración al sujeto.

Proteína en polvo

25 En ciertas realizaciones al mamífero se le administra una proteína en polvo que comprende un péptido que comprende o consiste en uno o más dominios de apolipoproteína (por ejemplo, dominios 6F, dominios 4F, *etc.*) aislado de la(s) planta(s) transgénica(s) descrita(s) en el presente documento, y/o la planta transgénica o al menos una parte de la misma. En ciertas realizaciones la proteína en polvo comprende además una proteína adicional. Las proteínas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a proteína de suero (por ejemplo, concentrado de suero de leche, aislado de suero, e hidrolizado de suero), proteína de caseína (o proteína de leche), proteína de soja, proteína de clara de huevo, proteína de semilla de cáñamo, proteína de arroz, proteína de guisante, y similares.

35 En ciertas realizaciones un péptido que comprende o que consiste en uno o más dominios de apolipoproteína (o miméticos de apolipoproteína) se aísla de la planta transgénica y simplemente se combina/mezcla con la proteína en polvo. En ciertas realizaciones la planta, o una parte de la misma, se seca y se tritura en un polvo vegetal que se puede combinar/mezclar con la proteína en polvo.

40 Los métodos para aislar/producir proteína en polvo son bien conocidos por los expertos en la materia. Los métodos típicos implican un paso de aislamiento crudo (por ejemplo, procesos de filtrado para separar la lactosa de la leche en la preparación de proteína de suero de leche) seguidos de un paso de concentración, por ejemplo, una purificación de intercambio iónico para purificar la proteína sin desnaturalizarla. En ciertas realizaciones la proteína recombinante aislada, o la planta/componente de la planta en polvo se agrega simplemente a una proteína en polvo disponible comercialmente.

45 Alimento o ingrediente alimentario que comprende una planta o parte de una planta.

50 En ciertas realizaciones al mamífero se le administra un alimento o un ingrediente alimentario que comprende al menos una parte de la planta transgénica que expresa un péptido que comprende o consiste en una o más apolipoproteínas o miméticos de los mismos (por ejemplo, dominios 6F, dominios 4F, *etc.*). Típicamente la parte es al menos una parte de la planta transgénica capaz de ser ingerida por su valor nutricional y/o sabor donde la parte consumida comprende el péptido recombinante que comprende o consiste en el(los) péptido(s). Para estos fines se considera que una planta o una parte de la misma tiene valor nutricional cuando proporciona una fuente de energía metabolizable, vitaminas o cofactores suplementarios o necesarios, efecto bruto o de otro modo beneficioso a ingerirlo el mamífero objeto.

55 Así, cuando el mamífero debe ser tratado con el alimento, o ingrediente alimentario, es un herbívoro capaz de digerir celulosa con ayuda bacteriana, tal alimento podría estar representado por una hierba monocotiledónea transgénica. De manera similar, Aunque las plantas de lechuga transgénicas no contribuyen sustancialmente a las fuentes de energía, moléculas de bloques de construcción tales como proteínas, carbohidratos o grasas, u otras vitaminas o cofactores necesarios o complementarios, una planta de lechuga transgénica para la(s) apolipoproteína(s) descrita en el presente documento utilizada como alimento para ese mamífero se incluiría en la definición de un alimento tal como se usa en el presente documento si la ingestión de la lechuga contribuyera al beneficio del mamífero, incluso si el mamífero no pudiera digerir el componente celulósico de la lechuga.

65 Debe observarse, que en varias realizaciones, partes de plantas secas, en particular las frutas secas se pueden usar fácilmente como alimentos (por ejemplo, peras secas, manzanas secas, tomates secos, ciruelas secas, *etc.*). De manera similar estas partes de plantas secas (por ejemplo, frutas secas) pueden incorporarse fácilmente a los

alimentos y por lo tanto formar componentes de ese alimento. Así, por ejemplo los tomates secos son ampliamente utilizados en alimentos como la bruschetta, pizza, salsa de tomate, y similares. Cuando la parte de la planta se proporciona como un polvo se puede incorporar fácilmente como ingrediente en varios alimentos diferentes (por ejemplo, barras de energía o proteínas). batidos, y similares).

5

Suplemento nutricional.

En ciertas realizaciones un péptido que comprende o consiste en uno o más dominios de apolipoproteína (por ejemplo, dominios que comprenden una secuencia 6F, una secuencia 4F, *etc.*) aislado de la planta o plantas transgénicas descritas en el presente documento, y/o la planta transgénica o al menos una parte de la misma se proporciona como un componente de un suplemento nutricional (por ejemplo, un suplemento vitamínico, un suplemento proteico, *etc.*). Los suplementos vitamínicos ilustrativos incluyen, por ejemplo, suplementos de vitamina A, suplementos de vitamina B, suplementos de vitamina D, suplementos de vitamina C, suplementos de ácidos grasos (por ejemplo, ácidos grasos omega 3), suplementos minerales como calcio, cinc, y hierro, y varias combinaciones de los mismos.

15

En ciertas realizaciones un péptido que comprende o consiste en uno o más dominios de apolipoproteína (por ejemplo, dominios que comprenden una secuencia 6F, una secuencia 4F, *etc.*) aislado de la(s) planta(s) transgénica(s) descrita(s) en el presente documento, y/o la planta transgénica o al menos una parte de la misma se proporciona como un componente de una formulación multivitamínica o se combina en un paquete de múltiples componentes con otra vitamina/FA/suplementos minerales. En ciertas realizaciones cuando la planta o parte de la misma se usa en dicho suplemento la planta o parte de la misma se seca y se muele, por ejemplo, a un polvo fino y luego se incorpora en una multivitamina, o comprimido o encapsulado solo. En ciertas realizaciones el suplemento vitamínico comprende vitamina A y/o vitamina B1, y/o B2, y/o B6 y/o B12, y/o vitamina C, y/o vitamina E, y/o un ácido graso.

20

Dieta definida/producto sustitutivo de la comida.

En ciertas realizaciones un péptido que comprende o consiste en uno o más dominios de apolipoproteína (por ejemplo, dominios que comprenden una secuencia 6F, una secuencia 4F, *etc.*) aislado de la(s) planta(s) transgénica(s) descrito(s) en el presente documento, y/o la planta transgénica o al menos una parte de la misma se proporciona como un componente de una "dieta definida" y/o productos de reemplazo de comidas (MRP). Una dieta definida es una dieta, opcionalmente preenvasada, que está destinada a satisfacer todos los requisitos dietéticos de un tema en particular. Por ejemplo, para los seres humanos una dieta definida puede ser una dieta predeterminada diseñada para facilitar un objetivo dietético particular (por ejemplo, reducción de peso, reducción de alérgenos, lactosa, aumento de peso, elevación de proteínas, *etc.*). En el caso de mamíferos no humanos (por ejemplo, caninos, felinos, porcinos, equinos, bovinos, *etc.*) la "dieta definida" se puede proporcionar en forma de un producto alimenticio para animales. El producto alimenticio para animales puede diseñarse para cumplir objetivos dietéticos particulares, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente para un ser humano.

30

35

En ciertas realizaciones, el producto alimenticio para animales se puede proporcionar como el componente de un régimen de tratamiento (por ejemplo, para un animal de granja, mascota, *etc.*) afectado con, o en riesgo de, una patología particular, por ejemplo, cáncer, aterosclerosis, enfermedad renal, *etc.*

40

Los productos de reemplazo de comidas son una forma de dieta definida, mezclas de bebidas en polvo preenvasadas o barras comestibles diseñadas para reemplazar las comidas preparadas. Los MRP son generalmente altos en proteínas, bajo en grasas, tienen una cantidad baja a moderada de carbohidratos y contiene una amplia gama de vitaminas y minerales. La mayoría de los MRP utilizan proteína de suero, caseína (a menudo incluida como caseinato de calcio o caseína micelar), proteína de soja y/o albúmina de huevo como fuente de proteínas. Los carbohidratos se derivan típicamente de la maltodextrina, fibra de avena, arroz integral y/o harina de trigo. Algunos MRP también contienen polvo de aceite de lino como fuente de ácidos grasos esenciales. Los MRP también puede contener otros ingredientes. Estos pueden incluir, pero no se limitan a monohidrato de creatina, péptidos de glutamina, L-glutamina, alfa-cetoglutarato de calcio, aminoácidos adicionales, lactoferrina, ácido linoleico conjugado y triglicéridos de cadena media.

45

50

En ciertas realizaciones la "dieta definida" comprende uno o más alimentos. Cada alimento puede ser envasado individualmente. Además, uno o más de los alimentos pueden mejorarse nutricionalmente mediante el enriquecimiento de vitaminas y minerales y/o mediante la incorporación del péptido o planta transgénica o una parte del mismo.

55

Los alimentos individuales se pueden preparar por procesamiento, por ejemplo, mezcla, precocinando cocinado, congelación, deshidratación o liofilización, de tal manera que la comida se pueda mantener congelada o seca durante un periodo prolongado. Además, un alimento individual puede ser envasado de tal manera que, antes del consumo, el alimento debe ser mezclado a mano o licuadora, cocinado colocando el componente de comida en una estufa, en un horno o microondas, o preparado agregando agua fría, caliente o hirviendo o sumergiendo el alimento en agua hirviendo. Uno o más de los alimentos pueden ser estables en la estantería. Preferentemente, un alimento tiene un almacenamiento o una vida útil suficientemente prolongados de manera que la dieta definida puede almacenarse antes del consumo. En ciertas realizaciones es deseable un almacenamiento o vida útil en condiciones de venta al por menor en un rango de aproximadamente seis a doce meses.

60

65

En ciertas realizaciones los alimentos individuales pueden estar en forma de sólidos, semisólidos o líquidos y puede incluir, pero sin limitación, productos de sopa, suplementos proteicos, alimentos de grano, alimentos del almidón, alimentos de frutas o verduras, bebidas nutricionales y bebidas.

En diversas realizaciones, el péptido que comprende o consiste en uno o más dominios de apolipoproteína (por ejemplo, dominios que comprenden una secuencia 6F, una secuencia 4F, *etc.*) aislada de la(s) planta(s) transgénica(s) descrita(s) en el presente documento, y/o la planta transgénica o al menos una parte de la misma se combina simplemente con/incorporada en la dieta definida y/o producto de reemplazo de comidas (MRP). En ciertas realizaciones la planta se seca y se muele hasta obtener un polvo que se puede agregar a uno o más de los componentes del alimento que comprenden la dieta definida o MRP. En ciertas realizaciones, la planta o una parte de la misma puede servir como un alimento que comprende la dieta/MRP definidos. Por ejemplo, cuando la planta transgénica es una planta de tomate transgénica, la planta se puede proporcionar como un tomate seco (por ejemplo, en una ensalada o pizza), como una pasta de tomate, jugo de tomate, o tomate entero en la comida según lo previsto.

Barras energéticas.

En ciertas realizaciones un péptido que comprende o consiste en uno o más dominios de apolipoproteína (por ejemplo, dominios que comprenden una secuencia 6F, una secuencia 4F, *etc.*) aislado de la(s) planta(s) transgénica(s) descrita(s) en el presente documento, y/o la planta transgénica o al menos una parte de la misma se proporciona como un componente de una "barra energética"/barra de energía. Las barras energéticas son barras complementarias que generalmente contienen cereales y/o frutas (s) secas, y/u otros alimentos y/o fibra de alta energía dirigidos a personas que requieren energía rápida o que están en ciertos regímenes de pérdida de peso. pero que no tienen tiempo para una comida. Son diferentes a las bebidas energéticas, que contienen cafeína, mientras que las barras proporcionan energía alimentaria.

Los expertos en la materia conocen numerosas formulaciones de barras de potencia. En ciertas realizaciones el péptido que comprende o consiste en uno o más dominios de apolipoproteína se incorpora a la barra energética como un componente de proteína (aminoácido). En ciertas realizaciones la planta transgénica o al menos una parte de la misma se proporciona como un componente de la barra de potencia. En diversas realizaciones la planta se puede proporcionar como parte o como parte de un componente de fruta y/o fibra de la formulación de la barra energética.

Uso de tomate "no transgénico"

También fue un descubrimiento sorprendente que los tomates no transgénicos, aunque carecen de la actividad demostrada por las plantas transgénicas descritas en el presente documento puede aumentar la actividad de PON y/o disminuir la inflamación. Por consiguiente en ciertas realizaciones se contempla el uso de un concentrado de tomate para aumentar la actividad de PON y/o para disminuir la inflamación (por ejemplo, medido por los niveles de SAA).

Usos animales.

Tal como se ha indicado anteriormente, en diversas realizaciones, un péptido que comprende o consiste en uno o más dominios de apolipoproteína (por ejemplo, dominios que comprenden una secuencia 6F, una secuencia 4F, *etc.*) aislada de la(s) planta(s) transgénica(s) descrita(s) en el presente documento, y/o la planta transgénica o al menos una parte de la misma se proporciona como un componente de una dieta animal. La dieta se puede proporcionar para mantener simplemente un animal sano o en ciertas realizaciones, La dieta está optimizada para facilitar un efecto profiláctico o terapéutico.

Las dietas ilustrativas de animales incluyen, pero no se limitan a dietas para animales juveniles, dietas para animales adultos normales, dietas para animales viejos, dietas para bajar de peso, dietas de salud dental, dietas saludables para la tiroides, dietas para la salud gastrointestinal, dietas hipoalergénicas, dietas de salud renal, dietas de salud de la vejiga, dietas de envejecimiento, y similares. En ciertas realizaciones la dieta es una dieta optimizada para el tratamiento de un animal con enfermedad renal y/o con cáncer. En ciertas realizaciones la dieta está diseñada para la administración a un animal que recibe quimioterapia y/o radioterapia.

En ciertas realizaciones el péptido que comprende uno o más dominios de apolipoproteína se agrega simplemente a la dieta como una fuente de proteína (aminoácido) adicional. En ciertas realizaciones la planta o una parte de la misma se incorpora a la dieta. En ciertas realizaciones la planta o parte de la misma se seca y se tritura en un polvo para incorporarlo a la dieta. El plan o la parte del mismo pueden incorporarse en un alimento para animales húmedo o en un alimento para animales seco (por ejemplo, gránulos). En ciertas realizaciones la planta o parte de la misma proporciona un componente de fibra de la dieta.

Otros péptidos terapéuticos.

Aunque los constructos, plantas, y métodos descritos anteriormente se describen con respecto a las apoproteínas, se cree que los mismos métodos de administración (por ejemplo, consumo de una planta, parte de la planta, o producto vegetal) se puede usar para administrar otros péptidos terapéuticos.

Los expertos en la materia conocen una amplia variedad de otros péptidos terapéuticos y se cree que pueden expresarse en plantas en cantidades terapéuticamente eficaces como se describe en el presente documento. Dichos péptidos incluyen, pero sin limitación, hormona del crecimiento (por ejemplo, aislada y/o humana, hormonas de crecimiento porcino o bovino), naturales, hormonas de crecimiento sintéticas o recombinantes (GHRH), interferones (por ejemplo, alfa, interferón beta y gamma), interleuquinas (por ejemplo, interleuquina-1, interleuquina, 2, etc.), naturales, insulina sintética o recombinante (por ejemplo, porcino, bovina, insulinas humanas), factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1), factor de crecimiento similar a la insulina-2 (IGF2, somatostatina), heparina, heparinoides, dermatanos, condroitinas, calcitonina (por ejemplo, naturales, sintética o recombinante, porcino, anguila, pollo, y calcitonina humana), antígenos (por ejemplo, antígeno de la gripe, hepatitis A, B, antígeno C, antígeno del VPH, etc.), anticuerpos (policlonales y monoclonales) (por ejemplo, HERCEPTIN®, RITUXAN®, AVASTIN®, ERBITUX®, etc.), oxitocina, hormona liberadora de hormona leutinizante (LHRH), hormona estimulante del folículo (FSH); glucocerebrosidasa, trombopoyetina; filgrastim; prostaglandinas; vasopresina; cromolina sódica (por ejemplo, cromoglicato de sodio o disódico), vancomicina, desferrioxamina (DFO); hormona paratiroidea (PTH) incluyendo sus fragmentos, antimicrobianos (por ejemplo, agentes antibacterianos, incluyendo agentes antifúngicos, etc.), y similares. Además, los péptidos terapéuticos incluyen análogos, los fragmentos, miméticos o derivados modificados de estos compuestos (por ejemplo, derivados modificados con polietilenglicol (PEG), derivados glicosilados, etc.), o cualquier combinación de los mismos.

20 Aplicaciones terapéuticas/profilácticas de apolipoproteínas.

Se ha demostrado que los péptidos descritos en el presente documento (por ejemplo, los péptidos enumerados en las Tablas 1, 2 y/o 3) son terapéutica y/o profilácticamente eficaces en varias indicaciones caracterizadas por una respuesta inflamatoria. Tales indicaciones incluyen, por ejemplo aterosclerosis como se describe por ejemplo, en los documentos de patente de Estados Unidos N.ºs: 6.664.230, 6.933.279, 7.144.862, 7.166.578, 7.199.102 y N.ºs de publicación PCT: PCT/US2001/026497 (WO 2002/015923), y PCT/US2008/085409, que se incorporan en el presente documento como referencia para los péptidos e indicaciones descritas en el presente documento.

Por consiguiente, se cree que las plantas transgénicas como se describen en el presente documento que expresan los péptidos o partes de los mismos son igualmente eficaces en tales indicaciones. Así, en ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para el tratamiento o la profilaxis de una patología caracterizada por una respuesta inflamatoria donde el método comprende administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad eficaz de: al menos una parte de una planta transgénica que expresa uno o más péptidos de las Tablas 1, 2 y/o 3; y/o una apolipoproteína o un péptido mimético de apolipoproteína expresado en una planta como se describe en el presente documento, y/o un alimento que comprende al menos una parte de una planta transgénica que puede ingerirse por su valor nutricional, donde la planta expresa un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es una apolipoproteína o un mimético de apolipoproteína como se describe en el presente documento, y/o una proteína en polvo, en donde al menos una parte de la proteína en polvo comprende una apolipoproteína o un péptido mimético de apolipoproteína expresado en una planta como se describe en el presente documento, y/o que comprende una planta transgénica (o una parte de la misma) y/o una apolipoproteína o un péptido de apolipoproteína como se describe en el presente documento.

En ciertas realizaciones el péptido de apolipoproteína comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en DWLKAIFYDKFFKFKFEFF (6F, SEQ ID NO: 17), FFEKFKFEFFKDYFAKLWD (rev6F, SEQ ID NO: 25), DWFKAIFYDKVAEKFEAF (4F, SEQ ID NO: 15), FAEKFKFEAVKDYFAKFWD (rev4F, SEQ ID NO: 23), LLEQLNEQFNWVSRANL (SEQ ID NO:609), y LVGRQLEEFL (SEQ ID NO: 612).

Un listado ilustrativo pero no limitante de indicaciones/condiciones para las cuales los péptidos descritos en el presente documento han demostrado ser eficaces y/o se cree que son eficaces se muestra en la Tabla 5 .

Tabla 5. Condiciones ilustrativas en donde los péptidos descritos en el presente documento (por ejemplo, 4F, 6F, etc.) han demostrado ser o se cree que son eficaces.

Aterosclerosis/síntomas/consecuencias de la misma.
formación de placa
formación de lesiones
infarto de miocardio
apoplejía
insuficiencia cardíaca congestiva
función vascular
función arteriolar
enfermedad arteriolar
asociado con el envejecimiento

asociado con la enfermedad de Alzheimer
asociada con enfermedad renal crónica
asociado con hipertensión
asociada con demencia multi-infarto
asociada con hemorragia subaracnoidea
enfermedad vascular periférica
enfermedad pulmonar:
enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC),
enfisema
asma
fibrosis pulmonar idiopática
fibrosis pulmonar
síndrome de dificultad respiratoria en adultos
osteoporosis
enfermedad de Paget
calcificación coronaria
autoinmune
artritis reumatoide
poliarteritis nodosa
polimialgia reumática
lupus eritematoso
esclerosis múltiple
granulomatosis de Wegener
vasculitis del sistema nervioso central (CNSV)
síndrome de Sjogren
Esclerodermia
polimiositis
respuesta inflamatoria del SIDA
infecciones:
bacteriano
fúngico

(continuación)

viral
parasitario
gripe (incluida la gripe aviar)
neumonía viral
síndrome de shock endotóxico
septicemia
síndrome de sepsis (síndrome clínico donde parece que el paciente es séptico pero no se recuperan organismos de la sangre)
traumatismo/herida:
trasplante de órganos
trasplante de aterosclerosis
rechazo de trasplante
úlceras corneales
herida crónica/no curativa
colitis ulcerosa
lesión por reperfusión (prevenir y/o tratar)
lesión por reperfusión isquémica (prevención y/o tratamiento)

(continuación)

lesiones de la médula espinal (efectos atenuantes).
cánceres
mieloma/mieloma múltiple
cáncer de ovario
cáncer de mama
cáncer de colon
cáncer de hueso
cáncer de cuello de útero
cáncer de próstata
osteoartritis
enfermedad inflamatoria del intestino
rinitis alérgica
caquexia
diabetes
enfermedad de Alzheimer
prótesis implantada
formación de biopelículas
enfermedad de Crohn
insuficiencia renal (insuficiencia renal aguda, insuficiencia renal crónica)
enfermedad de células falciformes, crisis de células falciformes
mejoría de la toxicidad a adriamicina
mejoría de la toxicidad a antracilina
para mejorar la sensibilidad a la insulina
para tratar el síndrome metabólico
para aumentar la adiponectina
para reducir la grasa abdominal
dermatitis, aguda y crónica
eccema
psoriasis
dermatitis de contacto
esclerodermia
diabetes y condiciones relacionadas
Diabetes tipo I
Diabetes tipo II
Diabetes de inicio juvenil
Prevención de la aparición de la diabetes.
Nefropatía diabética
Neuropatía diabética
Retinopatía diabética
disfuncion eréctil
degeneración macular
esclerosis múltiple
nefropatía
Neuropatía
Enfermedad de Parkinson
enfermedad vascular periférica
meningitis
Actividades biológicas específicas:
aumentar la Heme oxigenasa 1

(continuación)

aumentar la superóxido dismutasa extracelular
prevenir el desprendimiento endotelial
prevenir la asociación de mieloperoxidasa con ApoA-I.
prevenir la nitrosilación de tirosina en ApoA-I.
hacer antiinflamatorio al HDL
mejorar la vasorreactividad
aumentar la formación de HDL pre-beta.
promover el transporte inverso de colesterol
promover el transporte inverso de colesterol desde los macrófagos
sinergizar la acción de las estatinas

Se observa que las afecciones enumeradas en la Tabla 5 pretenden ser ilustrativas y no limitantes.

Métodos para prevenir o reducir la absorción de componentes de microlipídicos proinflamatorios en la dieta.

5 Sin estar limitado por una teoría particular, se cree que una acción principal de las plantas transgénicas descritas en el presente documento que expresan/contienen una apolipoproteína o un mimético de la misma (por ejemplo, una planta que expresa el péptido 6F) es la reducción en los niveles de ácido lisofosfatídico (LPA) en el intestino delgado. Esto podría ser mediado por varios mecanismos. Anteriormente se postuló que la formación de LPA se produce por dos vías (Aoki *et al.* (2008) *Biochimica et Biophysica Acta*, 1781: 513-518)). El primero implica la acción de PLA₁ o PLA₂ sobre un fosfolípido como la fosfatidilcolina para producir un lisofosfolípido (es decir, la eliminación de un ácido graso de la posición uno o dos del fosfolípido). La siguiente etapa es la acción de una fosfolipasa D como la autotaxina para eliminar la colina y producir el ácido lisofosfatídico. La segunda vía implica al ácido fosfatídico que se forma a partir de la acción de la fosfolipasa D en un fosfolípido como el fosfatidilcolina que genera ácido fosfatídico o la acción de la diacilglicerol quinasa (DGK) en el diacilglicerol (DAG) que resulta en la formación de ácido fosfatídico. Estos procesos pueden ocurrir en el enterocito o en la luz del intestino delgado o antes de la ingestión de alimentos.

10 Otro posible mecanismo para regular los niveles de LPA implica a tres enzimas conocidas como ácido fosfatasa lisofosfatídica 1, 2 o 3 (LPP1, LPP2, LPP3). Estas fosfatasas eliminan rápidamente el fosfato de LPA y por lo tanto contribuyen a la regulación de los niveles de LPA.

15 Para explorar el mecanismo de acción, se realizó un experimento de micromatrices para determinar los niveles de expresión génica en el intestino delgado de ratones alimentados con la Dieta Occidental o una dieta Piense y se les dio o no D-4F en su agua potable. Anteriormente se demostró que la administración de D-4F reduce los niveles de LPA similares a los tomates transgénicos 6F. En este experimento, ninguna de las enzimas involucradas en la formación de LPA cambió su expresión significativamente en la micromatriz. Aunque este experimento no descarta completamente el efecto de los miméticos de la apolipoproteína sobre estas enzimas, sin pretender quedar ligado a una teoría particular, se cree que las plantas transgénicas descritas en el presente documento alteran/reducen el LPA por otro mecanismo.

20 En particular se cree que el mecanismo de acción de los tomates transgénicos 6F descritos aquí es que bloquean, o al menos inhiben parcialmente, la captación de precursores en el enterocito como el ácido fosfatídico (PA) o bloquean, o al menos inhiben parcialmente, la captación en el enterocito de LPA preformado que está contenido en la dieta. Dicho mecanismo es consistente con la acción conocida de los péptidos miméticos de la apoA-I. En este sentido, se observa que la afinidad de unión de L-4F por LPA se aproxima a la afinidad de unión de avidina a biotina, que es la afinidad de unión más alta conocida.

25 Sin pretender quedar ligado a una teoría particular, se cree que los componentes lipídicos de la dieta se pueden dividir en dos clases: componentes macrolipídicos de la dieta y componentes microlipídicos de la dieta. Lo primero en una dieta occidental incluiría fosfolípidos como fosfatidilcolina y esteroides como el colesterol. Estos están presentes en miligramos por gramo de dieta. Incluso es posible que la lisofosfatidilcolina esté presente en cantidades de miligramos después de la acción de la fosfatidilcolina en el Duodeno mediante la PLA₂. Los componentes microlipídicos están presentes en cantidades de microgramos por gramo de dieta. Como se muestra en la Figura 33 la cantidad de péptido 6F intacto que se encontró en el intestino delgado aproximadamente dos horas después de que los ratones consumieron la dieta occidental con tomates transgénicos 6F fue de $15,6 \pm 7,4 \mu\text{g}$ de 6F por 200 mg de intestino delgado. Se cree que es poco probable que esta cantidad de péptido pueda unirse y prevenir la captación de cantidades significativas de fosfolípidos o lisofosfatidilcolina o esterol. Sin embargo, esta cantidad de péptido podría unirse y prevenir la captación de cantidades de microgramos de ácido fosfatídico (PA), tal como está presente en los alimentos (verpor ejemplo, Tanaka *et al.* ((2012) *Agric. Food Chem.*, 60: 4156-4161) o LPA preformado que está presente en la yema de huevo de gallina a 44,23 nmol/g de tejido o en clara de huevo de gallina (8,81 nmol/g de tejido) (Nakane *et al.* (2001) *Lipids*, 36: 413-419).

Por consiguiente, en vista de lo anterior, los métodos para prevenir o reducir la captación de componentes de microlipídicos proinflamatorios en la dieta (por ejemplo, ácido lisofosfatídico, ácido fosfatídico, y similares se contemplan. En ciertas realizaciones el método comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de al menos una parte de una planta transgénica como se describe y/o se reivindica en el presente documento; y/o una apolipoproteína o un péptido mimético de apolipoproteína de acuerdo con lo descrito y/o reivindicado en el presente documento; y/o un alimento o ingrediente alimentario como se describe y/o se reivindica en el presente documento; y/o una proteína en polvo como se describe y/o se reivindica en el presente documento; y/o un suplemento nutricional como se describe y/o se reivindica en el presente documento. En ciertas realizaciones al mamífero se le administra al menos una parte de una planta transgénica como se describe y/o se reivindica en el presente documento. En ciertas realizaciones al mamífero se le administra una fruta o parte de una fruta de la planta transgénica. En ciertas realizaciones la fruta se selecciona entre el grupo que consiste en un tomate, una manzana, una pera, una ciruela, un melocotón, una naranja, un kiwi, una payaya, una piña, una guayaba, un lilikoi, una fruta de estrella, un lichi, un mango, una granada, y una ciruela. En ciertas realizaciones el fruto es un tomate.

Las plantas anteriores, componentes de la planta, métodos, formulaciones y modos de administración descritos anteriormente pretenden ser ilustrativos y no limitantes. Utilizando la enseñanza proporcionada en el presente documento numerosas otras plantas, componentes de la planta, métodos, las formulaciones y/o los modos de administración estarán disponibles para un experto en la materia.

Ejemplos

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

Ejemplo 1

Actividad del péptido 6F.

La Figura 1 compara la eficacia de una variedad de péptidos miméticos de la apoA-I en la inhibición de la producción de actividad quimiotáctica de monocitos por células de la pared arterial humana expuestas a LDL humana. Se encontró que los péptidos 4F, 5F y 6F no se podían distinguir en este ensayo. La Figura 2 muestra que los péptidos 4F, 5F y 6F difieren según el número de restos de fenilalanina en la cara hidrófoba del péptido.

El péptido 6F se describe en la patente de Estados Unidos N.º: 7.199.102 B2. A diferencia del péptido 4F, que incluía grupos de bloqueo para maximizar la actividad con la administración oral, se demostró que el péptido 6F es activo por vía oral *in vivo* incluso sin grupos bloqueadores, por ejemplo, como se muestra en el experimento descrito en la Figura 3 que mide los niveles séricos de amiloide A (SAA). En ratones y conejos los niveles de SAA están altamente correlacionados con la extensión de la aterosclerosis.

El experimento descrito en la Figura 3 se realizó con todos los ratones en una dieta de pienso. El experimento que se muestra en la Figura 16B se realizó con todos los ratones en una dieta occidental. Los experimentos que se muestran en la Figura 16C demuestran que agregar péptido L-6F sin grupos bloqueadores a WD dio como resultado una disminución significativa en la aterosclerosis.

Habiendo demostrado que L-6F sin grupos bloqueadores era eficaz en un modelo de aterosclerosis en ratones, hicimos la siguiente pregunta. Si tuviéramos éxito en expresar L-6F sin bloquear grupos en una forma de vida inferior que los humanos pudieran comer ¿seguiría siendo biológicamente activo? Si la respuesta a la pregunta era no; nada se habría ganado mediante la expresión genética del péptido. Por ejemplo, Si expresáramos L-6F sin grupos bloqueadores en un tomate sería completamente posible que durante el proceso de maduración el proceso sea altamente oxidativo. El péptido puede destruirse o el péptido puede saturarse con lípidos oxidados formados durante el proceso de maduración y por lo tanto el péptido puede estar presente pero no es funcional. Para probar esta pregunta realizamos los experimentos que se muestran en la Figura 28A. Los datos en la Figura 28A indican que L-6F sin grupos bloqueadores todavía era biológicamente activo incluso en presencia de una cantidad sustancial de tomate maduro.

Anteriormente informamos que los niveles de ácido lisofosfatídico (LPA) se redujeron significativamente después del tratamiento con L-4F (que contiene grupos de bloqueo) en un modelo de ratón de cáncer de ovario. LPA es un factor de crecimiento tumoral conocido y también se sabe que acelera la aterosclerosis en modelos de ratón. La reducción en los niveles de LPA en ratones tratados con 4F se asoció con una reducción significativa en el volumen del tumor y una reducción en el número de nódulos tumorales en el modelo de ratón de cáncer de ovario.

Como se muestra abajo en la Figura 28B, la adición de L-6F sin grupos bloqueadores a WD que contenía un 10 % de homogeneizado de tomate madurado disminuyó significativamente los niveles de LPA en los ratones apoE nulos y LDLR nulos.

Ejemplo 2

Plantas transgénicas que expresan el péptido 6F

Este ejemplo describe la clonación y expresión del péptido 6F en plantas de tomate. Este ejemplo muestra además que las plantas transgénicas que expresan de manera estable el péptido 6F tienen una actividad biológica sustancial.

5 Clonación del gen 6F en el vector de transformación de plantas

La estrategia para expresar el péptido 6F en plantas de tomate se muestra en la Figura 4. Básicamente, se construyó un ácido nucleico que codifica el péptido 6F en donde el uso del codón se optimizó para la expresión en plantas de tomate (ver, por ejemplo, www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=4081). El ADN codificó además un péptido señal (M-I-M-A-S-S-K-L-L-S-L-A-L-F-L-A-L-L-S-H-A-N-S, SEQ ID NO: 2).

El gen original que codifica el péptido mimético 6F de apoA-I tiene una longitud de 54 pb y codifica una proteína de 18 aa (D-L-K-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F, SEQ ID NO: 17) con una masa molecular de 2435,81 Da. El casete de expresión de la proteína 6F comprendía el péptido señal (SP) de 23 aminoácidos M-I-M-A-S-S-K-L-L-S-L-A-L-F-L-A-L-L-S-H-A-N-S (SEQ ID NO: 2) derivado de planta, 69 pb de longitud (Pogrebnyak *et al.* (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 9062-9067). La tabla de uso de codones (www.kazusa.or.jp/codon) específica para *Lycopersicon esculentum* se usó para diseñar la secuencia de ADN (TCT AGA ATG ATT ATG GCT TCT TCT AAA CTT CTT TCT CTT GCT CTT TTT CTT GCT CTT CTT TCT CAT GCT AAT TCT GAT TGG CTT AAA GCT TTT TAT GAT AAA TTT TTT GAA AAA TTT AAA GAA TTT TTT TGA GAG CTC, SEQ ID NO: 4) y se sintetizó a partir de DNA 2.0 (www.dna20.com). El casete se clonó en el sitio XbaI/SacI reemplazando el gen GUS del vector binario de planta pBI121 y se introdujo el codón de parada TGA antes del sitio SacI (centro de recursos biológicos de Arabidopsis, ABRC, www.arabidopsis.org) bajo el promotor S35 de CaMV. La secuencia fue verificada por secuenciación de ADN. El vector también contiene el gen npt II para la selección de kanamicina de plantas transgénicas. En la Figura 15 se muestra una ilustración esquemática del vector.

La Figura 5 muestra *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 que se transformó con y sin la secuencia para 6F que se muestra en la Figura 4 y más arriba y que usa el vector ilustrado en la Figura 15.

30 Generación de Plantas Transgénicas.

Las plantas transgénicas fueron generadas como un trabajo de alquiler por el St. Louis Donald Danforth Plant Science Center, Missouri en colaboración con el Dr. Kevin Lutke. Un total de 1.200 cotiledones de tomate (*Lycopersicon esculentum*) se transformaron mediante 6F (en dos experimentos) y un vector vacío (un experimento) que contiene *Agrobacterium* usando el método descrito por Frary *et al.* (1996) Plant Cell Rept., 16: 235-240. Inicialmente, se generaron sesenta plantas fundadoras resistentes a kanamicina (vector 44 6F y vector vacío 16) y se utilizaron adicionalmente para análisis moleculares.

La Figura 6 muestra la expresión de la banda NPT II de plantas que se encontraron resistentes o no resistentes a la kanamicina, mientras que la Figura 7 muestra ejemplos de las plantas seleccionadas en Kanamicina y ejemplos de plantas con PCR positiva.

40 Análisis del material vegetal transgénico.

La presencia del gen 6F en plantas transgénicas se confirmó mediante PCR utilizando ADN genómico aislado con el kit de preparación mini Genoma ADN genéluto de Plantel (Sigma) y cebadores específicos 6F (TGATATCTCCACTGACGT (SEQ ID NO: 650) y CGAGAAAGGAAGGGAAGAAAG (SEQ ID NO: 651)) produciendo un producto de 712 pb. Las plantas transgénicas independientes resistentes a kanamicina se confirmaron por PCR para la presencia del transgén p6F y se analizaron adicionalmente para el péptido mediante análisis espectrométrico de masas. La Figura 17 muestra geles de SDS que demuestran la expresión positiva del péptido 6F a nivel de aminoácidos en la mayoría de las líneas de plantas que contienen el gen 6F.

50 Extracción y análisis de proteínas.

Un sistema liofilizador liofilizado (VirTis, Gardner, NY) se usó para obtener tejidos liofilizados de frutos de tomate. Las proteínas de la pulpa de fruta liofilizada se obtuvieron por homogeneización en una maza de mortero con nitrógeno líquido y se homogeneizaron en un tampón de extracción (Tris-Cl 50 mM, NaCl 150 mM, 2 % de Nonidet P-40, 1 % de ácido desoxicólico, SDS al 0,5 %) a pH 8,0 con una mezcla completa de inhibidores de proteasa (Roche Applied Science, Indianapolis). Las proteínas solubles totales 100 µg por calle se resolvieron en un gradiente de 4-20 %. Los geles Mini Protean TGX (Bio-Rad) se tiñeron con Sypro Ruby (Invitrogen) durante la noche. Para el análisis de MS, la banda del péptido 6F se digirió en gel como se describió anteriormente (8). En resumen, la banda de interés se escindió y se digirió con tripsina en gel (5-10 ng/µl de tripsina Gold, V5280, Promega) durante la noche a 37 °C, se eluyó en acetonitrilo al 50 % que contenía ácido trifluoroacético al 0,1 %, seguido de la punta de cremallera C-18, tamaño de la punta P10 (Millipore) y se sometió a análisis de MS/MS. La Tabla 6 muestra un ejemplo del método semicuantitativo utilizado para identificar el nivel de expresión de péptidos en estos geles.

65

Tabla 6. La semicuantificación de la expresión de péptidos en geles de SDS se muestra en la Figura 17. La intensidad de la señal se clasificó en una escala de cero (-) a 4 (++++).

Línea	Expresión	Línea	Expresión
90	++	119	+
95	-	120	-
97	++	128	+++
98	++++	131	+++
102	+	103	+++
106	++		
118	++		

5 Como se ha señalado anteriormente, las áreas de cada calle que se consideraron positivas para la expresión del péptido 6F en geles como se muestra en la Figura 17 y las mismas áreas de algunas calles que se suponía que no expresaban el péptido 6F se extrajeron y analizaron mediante LC-ESI-MS/MS. La Figura 18A a continuación muestra los datos de LC-ESI-MS del tomate control (es decir, la planta de tomate infectada con un vector vacío) y la Figura 18B muestra los datos de LC-ESI-MS del tomate transgénico 6F. El recuadro en las figuras superiores muestra geles de SDS de control de tomate (TC) y una línea 1A de tomate transgénico 6F. La flecha indica la banda 6F de la línea 1A de tomate transgénico 6F.

10 Usando las técnicas mostradas en los ejemplos anteriores, se seleccionaron líneas fundadoras positivas y se cultivaron para recolectar semillas. Las semillas se germinaron de nuevo y se seleccionaron plantas homocigotas usando el proceso de selección descrito anteriormente. En la Figura 29 se muestra un ejemplo de dos líneas homocigotas que producen tomates positivos para el péptido 6F.

15 Se confirmó que las bandas de 1A y 17A que se muestran en la Figura 29 son 6F mediante LC-ESI-MS/MS. Notablemente como se muestra en la Figura 8, la expresión del péptido 6F aumentó dramáticamente a medida que los tomates sufrían el estrés oxidativo de la maduración (es decir, se convierten de tomates verdes a rojos).

20 Se liofilizaron los tomates de control maduros (tipo silvestre) y los tomates de la línea 17A de tomates transgénicos homocigotos (17a-4) (6F-Transgénicos). La figura 9 muestra el aspecto de los tomates liofilizados. La Figura 10 muestra ejemplos de las diferentes partes del tomate liofilizado. La pulpa se pulverizó fácilmente en un mortero mientras que la piel era dura y se debía picar antes de pulverizarse en el mortero.

25 El material liofilizado se mezcló con Dieta Occidental en polvo como se muestra en la Figura 11. Los 19 gramos del material mostrado en la Figura 11 se mezclaron luego con una cantidad mucho mayor de Dieta Occidental en polvo que se muestra en el bol de mezcla grande en la Figura 12.

30 La dieta almacenada en tubos como se muestra en la Figura 13 se mantuvo a -80 °C hasta su uso. Los tubos que contenían suficiente dieta para cada noche se retiraron, descongelaron y compactaron y se proporcionaron 16 gramos por cada jaula de cuatro ratones (ver, por ejemplo, Figura 27) cada noche.

35 Después de dos semanas los ratones se mantuvieron en ayunas y se obtuvo sangre del seno retroorbital y se determinaron los niveles plasmáticos de amiloide A (SAA) por ELISA. Los resultados se muestran a continuación en la Figura 14.

40 Los datos en la Figura 19B demuestran que la alimentación de los tomates 17A transgénicos liofilizados madurados a ratones nulos con LDLR también aumentó significativamente la actividad plasmática de la potente enzima antioxidante paraoxonasa (PON).

La importancia del aumento en la actividad de paraoxonasa que se muestra en la Figura 19 radica en la muy fuerte relación inversa entre la actividad de paraoxonasa, estrés oxidativo y riesgo cardiovascular en seres humanos (9) (es decir, a mayor actividad de paraoxonasa, menor riesgo cardiovascular).

45 Los datos en las Figuras 19C-19F demuestran que la alimentación de los tomates 17A transgénicos liofilizados madurados a ratones nulos con LDLR también disminuyó significativamente los niveles plasmáticos de ácido lisofosfatídico (LPA).

50 Los datos en las Figuras 14 y 19B demuestran que la alimentación de tomates madurados liofilizados que expresan el péptido 6F puede reducir significativamente la inflamación en un modelo de aterosclerosis en ratones (disminuir los niveles de SAA) y aumentar la potente enzima antioxidante paraoxonasa en plasma. Los datos en las Figuras 19C-19F demuestran que un mecanismo de acción puede ser a través de la reducción significativa en los niveles plasmáticos de ácido lisofosfatídico (LPA). Se ha demostrado que el LPA es un potente promotor del crecimiento tumoral (Su *et al.* (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107:19997-20002) y un potente promotor de la inflamación y aterosclerosis (Zhou *et al.* (2011) Cell Metab. 13:592-600). Así, Los métodos descritos en el presente documento

55

hacen posible la producción de péptidos que modulan la enfermedad en una forma económica y fácil de proporcionar y que puede reducir la aterosclerosis, cáncer e inflamación entre otras enfermedades importantes.

Ejemplo 3

5

Un enfoque novedoso de la terapia mimética oral con apoA-I

Abreviaturas.

10 Las siguientes abreviaturas se utilizan en este ejemplo: ratones ApoE nulos, apoE^{-/-}; ácido docosahexaenoico 22:6 (n-3), DHA; ácido eicosapentaenoico 20:5 (n-3), EPA; ácido eicosatrienoico, EET; vector vacío, EV; el péptido D-W-L-K-A-F-YD-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F sintetizado a partir de todos los L-aminoácidos, 6F; ácido hidroxicosatetraenoico, HETE; Índice inflamatorio HDL, HII; ratones nulos receptores de lipoproteínas de baja densidad, LDLR^{-/-}; ácido lisofosfatídico, LPA; actividad paroxonasa-1, PON; prostaglandina, PG; amiloide sérico A, SAA; por vía intravenosa, IV; por vía subcutánea, SQ; tromboxano TX Dieta occidental, WD.

15

Sumario del ejemplo

20 Como se describe en el presente documento, las plantas de tomate transgénicas se construyeron con un vector vacío (EV) o un vector que expresa un péptido mimético de apoA-I, 6F. Se cosecharon tomates EV o 6F, se liofilizaron, se molieron en polvo, se añadieron a la dieta occidental (WD) al 2,2 % en peso, y se alimentó a ratones LDLK^{-/-} a 45 mg/kg/día 6F. Después de 13 semanas, el porcentaje de aorta con lesiones fue de 4,1 ± 4, 3,3 ± 2,4, y 1,9 ± 1,4 para WD, WD + EV, y WD + 6F, respectivamente (WD + 6F frente a WD, p = 0,0134; WD + 6F frente a WD + EV, p = 0,0386; WD + EV frente a WD, no significativo). Aunque el peso corporal no difirió, el suero plasmático amiloide A (SAA), colesterol total, niveles de triglicéridos y ácido lisofosfatídico (LPA) fueron menores en ratones WD + 6F; p < 0,0295. La actividad de colesterol HDL y paroxonasa-1 (PON) fue mayor en ratones WD + 6F (p = 0,0055, p = 0,0254, respectivamente), pero no en ratones WD + EV. Los niveles de plasma SAA, colesterol total, triglicéridos, LPA y 15-HETE se correlacionaron positivamente con las lesiones (p < 0,0001); colesterol HDL y PON se correlacionaron inversamente (p < 0,0001). Después de alimentar a WD + 6F se detectó 6F intacto en el intestino delgado (pero no en el plasma); ii) el LPA de intestino delgado disminuyó en comparación con WD + EV (p < 0,0469); iii) LPA de intestino delgado 18:2 se correlacionó positivamente con el porcentaje de aorta con lesiones (p < 0,0179). Estos datos sugieren que 6F actúa en el intestino delgado y proporciona un enfoque novedoso para la terapia mimética de la apoA-I oral.

25

30

Detalles

35

Este informe describe los resultados de una búsqueda de un péptido que no requiere grupos finales añadidos químicamente para su eficacia y que puede producirse en plantas genéticamente modificadas. La búsqueda comenzó revisando nuestros datos publicados anteriormente a la luz de nuestros hallazgos más recientes. El péptido 4F fue similar en eficacia a 6F basándose en nuestros ensayos *in vitro* (Datta *et al.* (2001) J. Lipid Res. 42:1096-1104). El péptido 4F se eligió inicialmente debido a su solubilidad incrementada en comparación con el 6F porque pensamos que la absorción del péptido era necesaria para alcanzar algún nivel crítico de péptido en plasma. Como esto no resultó ser el caso, dirigimos nuestra atención al péptido 6F. Ni el péptido 4F ni el 6F tienen ninguna homología de secuencia con apoA-I. El primer péptido mimético de la apoA-I con 18 aminoácidos se conoció como "18A" (Anantharamaiah (1986) Meth. Enzymol. 128: 627-647). Las cargas terminales de este péptido se modificaron agregando grupos bloqueadores finales, lo que resultó en una afinidad lipídica incrementada por los lípidos no oxidados (Venkatachalapathi *et al.* (1993) Proteins Structure Function Genet. 15: 349-359; Yancey *et al.* (1995) Biochemistry. 34: 7955-7965). El péptido 18A también se conoce como "2F" porque el péptido tiene dos restos de fenilalanina en la cara hidrófoba en las posiciones 6 y 18. Aunque el péptido 2F se unió a lípidos no oxidados con afinidades similares a la apoA-I no fue muy eficaz para prevenir la producción de MCP-1 inducida por LDL por células de la pared arterial humana cultivadas y no logró disminuir la aterosclerosis inducida por la dieta en ratones (Datta *et al.* (2001) J. Lipid Res. 42: 1096-1104). En consecuencia se sintetizaron varios péptidos de 18 aminoácidos y se probó su capacidad para inhibir la producción de MCP-1 inducida por LDL por células de la pared arterial humana cultivadas (*Id.*). Como se revisó anteriormente (Navab *et al.* (2005) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 25: 1325-1331), en función de sus propiedades físicas estos péptidos podrían separarse en 2 grupos. El grupo I consistió en 2F con restos de fenilalanina en las posiciones 6 y 18; 3F³ con un resto de fenilalanina adicional en la posición 3; 3F¹⁴ con un resto de fenilalanina adicional en la posición 14; y 4F con dos restos de fenilalanina adicionales en las posiciones 3 y 14. De este primer grupo de péptidos, solo el péptido 4F fue altamente eficaz en la prevención de la producción de MCP-1 inducida por LDL por células de la pared arterial humana cultivadas (*Id.*) y fue biológicamente activo en modelos de ratón (Navab *et al.* (2010) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 30: 164-168; Flandattu *et al.* (2007) J. Biol. Chem. 282: 1980-1988). El grupo II consistió en el péptido 5F con 3 restos de fenilalanina adicionales en las posiciones 11, 14 y 17; el péptido 6F con 4 restos de fenilalanina adicionales en las posiciones 10, 11, 14 y 17; y el péptido 7F con 5 restos adicionales en las posiciones 3, 10, 11, 14 y 17. De este segundo grupo tanto 5F como 6F pudieron inhibir eficazmente la producción de MCP-1 inducida por LDL por células de la pared arterial humana cultivadas; 7F no lo hizo (Datta *et al.* (2001) J. Lipid Res. 42: 1096-1104). El péptido 5F también fue biológicamente activo *in vivo* inhibiendo la aterosclerosis en un modelo de ratón (Garber *et al.* (2001) J. Lipid Res. 42: 545-552), e inhibiendo la angiogénesis tumoral en ratones (Gao *et al.* (2011) Integr. Biol. (Camb), 3: 479-489).

55

60

65

La comparación de los datos de dicroísmo circular para los péptidos en solución salina tamponada con fosfato en ausencia o presencia de dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) mostró que el porcentaje de helicidad de los péptidos en la interacción con DMPC aumentó para todos los péptidos probados excepto para 4F y 6F (Datta *et al.* (2001) *J. Lipid Res.* 42: 1096-1104). Debido a esta similitud entre 4F y 6F en la interacción con DMPC, lo que demostramos previamente fue altamente eficaz en un modelo de aterosclerosis en ratones cuando se administró por vía oral (Navab *et al.* (2003) *Circulation.* 108: 1735-1739); en primer lugar decidimos centrar nuestra atención en el péptido 6F en lugar del péptido 5F. Como se muestra por los experimentos informados aquí, el péptido 6F es eficaz sin grupos finales añadidos químicamente, puede expresarse en tomates genéticamente modificados, y quizás lo más notable, el péptido 6F es eficaz cuando se alimentan los tomates, incluso sin aislamiento y purificación del péptido.

Materiales y métodos.

Materiales

El péptido 6F (D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F, SEQ ID NO: 17) se sintetizó químicamente a partir de todos los L-aminoácidos mediante síntesis en fase sólida como se describe (Datta *et al.* (2001) *J. Lipid Res.* 42: 1096-1104) utilizando resina Wang (Advanced Chem Tech, Louisville, KY) para obtener ácido libre C-terminal después de la escisión del péptido de la resina excepto que se omitió la etapa de acetilación N-terminal. El vector pBI121 que contiene un gen resistente a kanamicina (NPTII), un promotor 35 S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S) y un terminador de la nopalina sintasa (NOS) se obtuvieron en "The Arabidopsis Information Resource" (TAIR) (www.arabidopsis.org; número de stock CD3-388, vector pBI121). LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* se obtuvo en Invitrogen, Electromax (número de catálogo 18313-015). Los kits de ELISA para la determinación del ácido lisofosfatídico (LPA) se adquirieron de Echelon (número de catálogo k-2800s). Los demás materiales se compraron en fuentes descritas anteriormente (Navab *et al.* (2011) *J. Lipid Res.* 52: 1200-1210; Navab *et al.* (2012) *J. Lipid Res.* 53: 437-445).

Ratones

Los ratones hembra C57BL/6J de tipo silvestre o LDLR^{-/-} o apoE^{-/-} hembra originalmente comprados en los laboratorios Jackson en un fondo C57BL/6J se obtuvieron de la colonia de cría del Department of Laboratory and Animal Medicine en la David Geffen School of Medicine en UCLA. Los ratones utilizados en estos estudios tenían diferentes edades, que se indican en cada leyenda. Los ratones se mantuvieron con una dieta de pienso (Ralston Purina) antes de cambiar a WD (Teklad, Harlan, número de catálogo TD88137). La adición del péptido 6F químicamente sintetizado a la dieta se realizó como se describió previamente para la adición del péptido 4F (Navab *et al.* (2011) *J. Lipid Res.* 52: 1200-1210); la preparación y adición de tomate con o sin 6F transgénico para WD se describe a continuación en la sección, "Procesamiento y Análisis de Tomates". Para experimentos en donde se presentó a los ratones WD con o sin 2,2 % en peso de tomate en polvo, los preparativos, que se almacenaron a -80 °C hasta su uso, se descongelaron cada noche, se compactaron estrechamente y se presentaron a cada jaula de cuatro ratones cada noche. La Figura 27 muestra un ejemplo de la WD estrechamente compactada presentada a los ratones. Todos los experimentos con ratones fueron aprobados por el UCLA Animal Research Committee.

Determinación de los componentes plasmáticos e intestinales y ateroscleróticos

Lesiones

El plasma fue recogido y analizado para el colesterol total, triglicéridos, amiloide sérico A (SAA), colesterol HDL, actividad de paraoxonasa-1 (PON) como se describió anteriormente (Navab *et al.* (2011) *J. Lipid Res.* 52: 1200-1210; Navab *et al.* (2012) *J. Lipid Res.* 53: 437-445). La perfusión de los ratones para extraer toda la sangre de los tejidos antes de la extracción del intestino delgado y la preparación de las muestras del intestino delgado se realizó como se describió anteriormente (Navab *et al.* (2012) *J. Lipid Res.* 53: 437-445). Los niveles de colesterol en los tejidos se midieron como se describió anteriormente (Navab *et al.* (2011) *J. Lipid Res.* 52:1200-1210). Los niveles de ácido araquidónico y sus metabolitos se midieron por LC-ESI-MS/MS como se describió anteriormente (Navab *et al.* (2012) *J. Lipid Res.* 53:437-445). El ácido lisofosfatídico se midió mediante ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante o LC-ESI/MS/MS como se describió anteriormente (Navab *et al.* (2011) *J. Lipid Res.* 52: 1200-1210). El porcentaje de aorta con aterosclerosis se determinó mediante un análisis facial tal como se describió anteriormente (Navab *et al.* (2011) *J. Lipid Res.* 52: 1200-1210; Morgantini *et al.* (2010) *Diabetes* 59: 3223-3228).

Generación de Plantas de Tomate Transgénicas

La estrategia que elegimos implica el uso de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, que porta un plásmido Ti que puede manipularse para insertar un gen de interés en células vegetales (Frery y Earle (1996) *Plant Cell Reports*, 16: 235-240). Para lograr esto utilizamos el vector binario de planta pBI121 que contiene un gen de resistencia a kanamicina (NPTII), un promotor 35 S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S), el gen *GUS* que codifica la proteína marcadora β-glucuronidasa y un terminador de nopalina sintasa (término NOS) (Figura 15). El gen que codifica 6F tiene una longitud de 54 pb y codifica los 18 aminoácidos D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F (SEQ ID NO: 17) con una masa molecular de 2435,81 Da. El casete de expresión para 6F también contenía el péptido señal

(SP) derivado de la planta con 23 aminoácidos (M-I-M-A-S-S-K-L-L-S-L-A-L-F-L-A-L-L-S-H-A-N-S, SEQ ID NO: 2), 69 pb de longitud (Pogrebnyak *et al.* (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 102: 9062-9067). La tabla de uso de codones (www.kazusa.or.jp/codon) específica para *Lycopersicon esculentum* se utilizó para diseñar la secuencia de ADN: TCT AGA ATG ATT ATG GCT TCT TCT AAA CTT CTT TCT CTT GCT CTT TTT CTT GCT CTT CTT TCT CAT GCT AAT TCT GAT TGG CTT AAA GCT TTT TAT GAT AAA TTT TTT GAA AAA TTT AAA GAA TTT TTT TGA GAG CTC (SEQ ID NO:4). El ADN se sintetizó a partir de ADN 2.0 (www.dna20.com). El casete se clonó en el sitio XbaI/SacI reemplazando el gen *GUS* del vector binario pBI121 de la planta y un codón de parada TGA se introdujeron antes del sitio SacI (centro de recursos biológicos de Arabidopsis, ABRC, www.arabidopsis.org) bajo un promotor CaMVS35 (Figura 15). La secuencia fue verificada por secuenciación de ADN. El vector también contenía el gen *nptII* para la selección de kanamicina de plantas transgénicas (Figura 15). La cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* se transformó con y sin el casete que contiene las secuencias para el péptido señal derivado de la planta y para 6F. Las transformaciones sin el casete que contiene las secuencias para el péptido señal derivado de la planta y 6F se denominan vector vacío (EV), que todavía contiene el gen *GUS* en el vector pBI121 que codifica la proteína marcadora beta-glucuronidasa. Las copias que albergan el vector binario se verificaron en secuencia en el núcleo GeneSeq de UCLA y luego se usaron para la transformación de plantas utilizando la estrategia de Frary y Earle (Frary y Earle (1996) Plant Cell Reports, 16: 235-240).

Las plantas transgénicas se generaron a través de un contrato de servicio central con el Saint Louis Donald Danforth Plant Science Centre, Missouri (Dr. Kevin Lutke). Inicialmente, un total de 1.200 cotiledones de tomate (*Lycopersicon esculentum*) se transformaron para 6F en dos experimentos separados y vector vacío en un experimento usando el procedimiento descrito por Frary y Earle (*Id.*). La presencia del gen 6F en plantas transgénicas se confirmó mediante PCR utilizando ADN genómico aislado con el kit Mini Prep de Genelute Plant Genomic DNA (Sigma) y cebadores (TGA TAT CTC CAC TGACGT (SEQ ID NO: 652) y CGA GAA AGG AAG GGA AGA AAG (SEQ ID NO: 653)) que produce un producto de 712 pb. Treinta y tres plantas positivas para el gen 6F se identificaron inicialmente de aproximadamente 120 plantas que se habían seleccionado en kanamicina. Se seleccionaron líneas fundadoras positivas y se cultivaron para recolectar semillas. Posteriormente, las semillas fueron nuevamente germinadas; se seleccionaron plantas homocigotas, se cultivaron y se permitió que produjeran tomates maduros a partir de los cuales se recolectaron las semillas. El proceso se repitió un mínimo de 3 veces para asegurar que las líneas fueran homocigotas.

Identificación y cuantificación de 6F en tomates

Las semillas de los tomates maduros homocigotos se eliminaron y la pulpa de tomate y la piel restantes sin semillas se congelaron rápidamente y se enviaron por mensajería durante la noche a la UCLA, donde se procesaron en un sistema de liofilizador liofilizado (VirTis, Gardner, NY) para obtener tejido de fruta de tomate liofilizado (pulpa más piel). Para el análisis de gel SDS-PAGE, las proteínas de la fruta liofilizada se obtuvieron por homogeneización con un mortero y una mano en nitrógeno líquido y se homogeneizaron en un tampón de extracción (Tris-Cl 50 mM, NaCl 150 mM, 2 % de Nonidet P-40, 1 % de ácido desoxicólico, SDS al 0,5 %) a pH 8,0 con una mezcla completa de inhibidores de proteasa (Roche Applied Science, Indianapolis). Las proteínas solubles totales, 100 µg por calle se resolvieron en geles con gradiente de 4-20 %; las muestras de 500 µg por calle se resolvieron en geles SDS-PAGE al 20 %. Los geles Mini Protean TGX (Bio-Rad) se tiñeron con Sypro Ruby (Invitrogen) o tinción de plata (Invitrogen). Para análisis LC-ESI-MS/MS o LC-ESI-MS, la banda del péptido 6F se digirió en gel como se describió anteriormente (Hellman *et al.* (1995) Anal Biochem. 224: 451-455). En resumen, la banda de interés se escindió y se digirió con tripsina en gel (5-10 ng/ml de tripsina de oro, V5280, Promega) durante la noche a 37 °C, se eluyó en acetonitrilo al 50 % que contenía ácido trifluoroacético al 0,1 %, seguido de Zip-Tip C-18, tamaño de punta P10 (Millipore), y se sometió a análisis LC-ESI-MS/MS utilizando un espectrómetro de masas cuádruple QTRAP 4000 (Applied Biosystems) equipado con una fuente de ionización por electropulverización o el análisis fue realizado por LC-ESI-MS en un espectrómetro de masas LCQAdvantage Max (ThermoElectron, Inc.) equipado con una fuente de ionización por electrospray como se describió previamente (Watson *et al.* (2011) J. Lipid Res. 52: 361-373; Navab *et al.* (2011) J. Lipid Res. 52: 1200-1210). La cuantificación del péptido 6F en el tomate liofilizado por LC-ESI-MS/MS o LC-ESI-MS se realizó utilizando un péptido 6F sintetizado químicamente y marcado con ¹⁵N sin grupos bloqueadores terminales. Cuando las fracciones 6F de la HPLC antes de la inyección en el espectrómetro de masas se sometieron a un análisis SDS PAGE y las bandas que migraban con el péptido 6F auténtico se digirieron en tripsina en gel, en el examen posterior en el espectrómetro de masas, solo se observó la firma de 6F (es decir, no se pudo detectar ninguna otra proteína o péptido en estas bandas). En consecuencia, el análisis SDS PAGE de extractos de proteína de tomates liofilizados después de LC (pero sin análisis MS) se utilizó para la cuantificación rutinaria de 6F. Para la cuantificación rutinaria, los geles se escanearon por densitometría y los resultados se calcularon a partir de una curva patrón generada por las pistas que contienen péptido 6F químicamente sintetizado sin grupos bloqueadores finales.

Identificación y cuantificación de 6F en intestino delgado y plasma

Para el análisis del intestino delgado, se homogeneizaron 200 mg de intestino delgado (incluidos los contenidos) en 10 ml de acetonitrilo:agua (1:1) y los homogeneizados se liofilizaron y se resuspendieron en 400 µl de acetonitrilo:agua (1:1). Para el análisis de plasma, se liofilizaron 100 µl de plasma y se llevaron a 400 µl de acetonitrilo:agua (1:1). Las muestras se procesaron en HPLC usando una columna analítica de fase inversa C-18 y un sistema de gradiente de solvente de acetonitrilo: agua (30 % a 80 % en 20 min) en presencia de TFA al 0,1 % y se monitorizó a 280 nm. Se

inyectaron muestras 6F sintetizadas químicamente (5 µg en el mismo disolvente que las muestras) y se obtuvieron tiempos de retención. Se inyectaron muestras desconocidas (200 µl de 400 µl originales) y se recogieron fracciones de 0,5 ml. Las muestras correspondientes al tiempo de retención del 6F sintetizado químicamente se secaron y analizaron por electroforesis en gel SDS como se describe anteriormente y las bandas que migran con el 6F sintetizado químicamente se cuantificaron mediante escaneo y comparación con cantidades conocidas de 6F sintetizado químicamente (sin grupos bloqueadores) en los mismos geles.

Adición de tomates a WD

Para experimentos *in vivo*, el tejido de fruta de tomate liofilizado se trituró a fondo hasta obtener un polvo fino en nitrógeno líquido sin el tampón de extracción y luego se mezcló a fondo con cantidades crecientes de WD en polvo para obtener WD que contenía 2,2 % de polvo de tomate liofilizado, el cual se congeló y almacenó a -80 °C hasta su uso. En algunos experimentos, se usaron tomates de tipo silvestre en lugar de los tomates EV como controles. Esto se indica explícitamente en las leyendas de las figuras. En estos casos, los tomates de tipo silvestre se cultivaron en Saint Louis y se procesaron de manera idéntica a los tomates EV y 6F.

Determinación del contenido de licopeno de los tomates

El contenido de licopeno en los tomates se determinó mediante los métodos descritos previamente (Lucini *et al.* (2012) J. Sci. Food Agric. 92: 1297-1303). En resumen, el polvo de tomate liofilizado molido se suspendió en NaCl (3,42 M) y se extrajo con acetato de etilo y ciclohexano (1:1; v/v) centrifugando durante 5 min a 600 x g. La fase orgánica se eliminó cuidadosamente y la DO se midió a una longitud de onda de 503 nm por triplicado en un espectrofotómetro (FLUOstar omega, BMG Labtech) como se describe (Lavecchia y Zuorro (2008) Eur. Food Res. Technol., 228: 153-158). Se usaron patrones de licopeno de Sigma (número de catálogo L9879) para generar las curvas patrón.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron por ANOVA, ensayo t de dos colas sin coincidencias o por regresión lineal usando GraphPad Prism versión 5.03 (Software GraphPad, San Diego, CA).

Resultados

¿El péptido 6F sin grupos bloqueadores terminales es eficaz *in vivo*?

Como se muestra en la Figura 16A, alimentando a los ratones apoE^{-/-} con el péptido 6F sin grupos bloqueadores terminales la incorporación del péptido en la comida de ratón disminuyó significativamente los niveles de SAA en plasma. La alimentación de los ratones apoE^{-/-} con el péptido 6F sin grupos bloqueadores terminales incorporando el péptido en WD también disminuyó los niveles plasmáticos de SAA (Figura 16B) y disminuyó el porcentaje de aorta con lesiones ateroscleróticas (Figura 16C).

¿El péptido 6F sin grupos terminales de bloqueo podría ser eficaz en más de un modelo de aterosclerosis en ratones si se mezcla con un tomate homogeneizado antes de incorporarlo a la dieta?

Se cree que la eficacia de los péptidos miméticos de apoA-I se debe a su capacidad para unirse a los lípidos oxidados (Van Lenten *et al.* (2008) J. Lipid Res. 49: 2302-2311). Antes de proceder con un intento de producir el péptido en una planta genéticamente modificada como un tomate, pensamos que era importante determinar si el tomate homogeneizado podría saturar el péptido con los lípidos de las plantas haciéndolo ineficaz. Como se muestra en la Figura 28A este no fue el caso de los niveles de SAA en plasma. Como se muestra en la Figura 28B, la incorporación del péptido 6F sin grupos bloqueadores terminales en WD que contenía un 10 % de homogeneizado de tomate madurado dio lugar a una disminución significativa en los niveles plasmáticos del potente factor de crecimiento ácido lisofosfatídico (LPA) en ambos ratones apoE^{-/-} y LDR^{-/-}. Después de asegurarnos de que la presencia de frutos de tomate no alteraría la eficacia del péptido 6F nos propusimos determinar si podríamos diseñar genéticamente los tomates para expresar el péptido 6F.

¿Se puede expresar el péptido 6F en el fruto de las plantas de tomate?

Como se muestra en la Figura 17, la mayoría de las líneas de tomate que fueron positivas para PCR para 6F expresaron una banda en geles de SDS PAGE que migraron de manera similar a la 6F sintetizada químicamente auténtica sin grupos bloqueadores finales. Otras líneas de tomate en la Figura 17 no lo hicieron (por ejemplo, la línea 95 y el control [WT] de tipo silvestre). La línea de tomate 95 mostró evidencia de PCR de inserción génica, pero supuestamente el gen no se expresó a nivel de proteína. Después de HPLC y SDS PAGE, la región en cada calle correspondiente a 6F se escindió y la tripsina en gel se sometió a digestión y se sometió a análisis LC-ESI-MS/MS o LC-ESI-MS como se describe en Materiales y Métodos. La Figura 18A demuestra que las bandas que migran de manera similar a la 6F auténtica exhibieron la firma LC-ESI-MS para la 6F mientras que la misma región de aquellas calles sin bandas no lo hizo (Figura 18B). Se encontró que el péptido 6F representaba entre el 0,6 y el 1,0 % del peso de los tomates liofilizados. Las líneas del fundador se seleccionaron y cultivaron para recolectar semillas. Las líneas

homocigotas se generaron como se describe en Materiales y Métodos. Los geles SDS PAGE de una línea homocigótica de control y de dos líneas homocigóticas (1A y 17A) que expresan 6F se muestran en la Figura 29. Habiendo tenido éxito en la producción del péptido 6F en tomates transgénicos homocigotos nos propusimos determinar si la alimentación de estos tomates en comparación con los tomates de control mostraría un efecto beneficioso sobre los biomarcadores de plasma en los estudios de alimentación a corto plazo.

¿La alimentación de WD durante dos semanas con tomates transgénicos para 6F podrían mejorar los biomarcadores de plasma en comparación con un tomate no agregado o en comparación con la alimentación de tomates de tipo silvestre?

Al comienzo de estos experimentos teníamos un suministro limitado de tomates transgénicos homocigotos y un suministro aún más limitado de tomates EV homocigotos. Así, diseñamos experimentos con relativamente pocos ratones que medían biomarcadores después de la alimentación a corto plazo. En el primer experimento a corto plazo utilizamos tomate de tipo silvestre (WT) como el tomate de control. Estos se cultivaron de manera idéntica a los tomates EV y 6F transgénicos en las instalaciones de Saint Louis Core y se procesaron de manera idéntica como se indica en Materiales y Métodos. La alimentación de tomate 6F transgénico liofilizado molido a 2,2 % de la WD a ratones hembra LDLR^{-/-} de 10 semanas de edad (40 mg/kg/ratón/día de 6F) durante dos semanas mejoró significativamente muchos (pero no todos) los biomarcadores medidos (Figuras 19A-19K). En la Figura 19 No se muestran los datos que indican una mejora significativa en el colesterol total en plasma, triglicéridos, niveles de ácido araquidónico libre o tromboxano B₂ después de alimentar los tomates WT o 6F transgénicos.

¿La alimentación de WD durante dos semanas con tomates transgénicos para 6F podría mejorar los biomarcadores de plasma en comparación con un tomate no agregado o en comparación con la alimentación de tomates de vector vacío?

El segundo experimento difería del primer experimento en los siguientes detalles: i) los ratones eran mayores (4-5 meses de edad); ii) los tomates de control eran tomates de vector vacío (EV) en lugar de tomates de tipo silvestre; iii) no todos los biomarcadores medidos en el primer experimento se repitieron en el segundo. Los resultados fueron similares entre los dos experimentos como se muestra en la Figura 30. La alimentación con tomates EV con WD durante dos semanas disminuyó significativamente los niveles de SAA; la alimentación de tomates 6F transgénicos disminuyó ligeramente los niveles de SAA más allá de los tomates EV pero esta diferencia no alcanzó significación estadística (Figura 30A). La alimentación con WD con tomates 6F transgénicos aumentó significativamente la actividad de paraoxonasa-1 (PON); La alimentación con tomates EV no lo hizo (Figura 30B). La alimentación con WD con tomates EV disminuyó significativamente los niveles de 5-HETE. 15-HETE libre en plasma, y PGD₂; la alimentación de tomates transgénicos 6F redujo significativamente estos niveles más que la alimentación de WD con tomates EV (Figuras 30C-30E). La alimentación de WD con tomates transgénicos 6F redujo significativamente los niveles de PGE₂ en plasma, mientras que la alimentación con tomates EV no lo hizo (Figura 30F). La alimentación con WD con tomates 6F transgénicos aumentó significativamente los niveles de colesterol HDL en plasma; la alimentación con tomates EV no lo hizo (Figura 30G). En la Figura 30 No se muestran los datos que indican una mejora significativa en el colesterol total en plasma, triglicéridos, niveles de ácido araquidónico libre o tromboxano B₂ después de alimentar el EV o los tomates 6F transgénicos.

Para resumir y contrastar estos dos experimentos, en ambos experimentos de alimentación a corto plazo los tomates transgénicos 6F redujeron significativamente la SAA en plasma, 5-HETE libre, 15-HETE, los niveles de PGD₂ y PGE₂ aumentaron tanto la actividad de PON en plasma como los niveles de colesterol HDL. Además, en el primer experimento en donde se midieron los niveles de LPA alimentando a los tomates 6F transgénicos se redujeron significativamente los niveles de LPA 16:0, 18:0, 18:1 y 20:4 en plasma pero la alimentación con los tomates WT solo disminuyó significativamente los niveles de LPA 20:4 en plasma, que disminuyeron significativamente aún más por los tomates 6F transgénicos. En el segundo experimento a corto plazo pero no en el primero, la alimentación con los tomates de control (EV) redujo significativamente los niveles de SAA en plasma. En el primer experimento a corto plazo alimentando con los tomates de control (WT) aumentó significativamente la actividad de PON, pero en el segundo experimento alimentando con los tomates control (EV) no. En el primer experimento a corto plazo la alimentación con los tomates de control (WT) no disminuyó significativamente el 5-HETE libre en plasma, 15-HETE, PGD₂, o niveles de PGE₂, pero en el segundo experimento la alimentación con los tomates control (EV) disminuyó significativamente el 5-HETE libre en plasma, los niveles de 15-HETE y PGD₂ y estos niveles disminuyeron significativamente aún más al alimentar con los tomates 6F transgénicos. En ambos experimentos a corto plazo que alimentaron el control los tomates no pudieron alterar los niveles de colesterol HDL. En ambos experimentos a corto plazo los niveles de ácido araquidónico libres en plasma, los niveles de colesterol total y los niveles de triglicéridos no se modificaron al alimentar ninguno de los tomates.

Dado que los tomates de control mejoraron algunos de los biomarcadores en estos experimentos de alimentación a corto plazo, ¿podría el rendimiento superior de los tomates transgénicos 6F ser debido a una inducción de niveles más altos de antioxidantes en los tomates 6F transgénicos ?

Para ensayar esta pregunta medimos el contenido del principal antioxidante del tomate, licopeno. Como se muestra en la Figura 20 sorprendentemente, las líneas de tomate 6F homocigotas transgénicas 1A y 17A (esta última se usó

en los dos experimentos de alimentación a corto plazo descritos anteriormente) tuvieron un contenido de licopeno leve pero significativamente menor en comparación con los tomates WT o en comparación con las líneas de tomate EV 108 y 110 (esta última se usó en el segundo experimento de alimentación a corto plazo).

5 ¿La alimentación de WD durante 13 semanas con tomates 6F transgénicos podría mejorar los biomarcadores plasmáticos y la aterosclerosis aórtica en comparación con un tomate no agregado o en comparación con la alimentación de tomates de vector vacío?

10 Como se muestra en las Figuras 21A-21E después de 13 semanas de alimentación con WD con tomates 6F transgénicos (pero no con tomates EV) hubo una reducción significativa en la SAA en plasma, el colesterol total, y los triglicéridos y un aumento significativo en la actividad de PON en plasma y los niveles de colesterol HDL. También hubo una disminución significativa en los niveles plasmáticos de ácido lisofosfatídico (LPA) para LPA 18:1 (Figura 21F), LPA 18:2 (Figura 21G) y LPA 20:4 (Figura 21H) en los ratones alimentados con tomates 6F transgénicos (pero no con tomates EV). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en los niveles de LPA 16:0 o LPA 18:0 (datos no mostrados). Como se muestra en la Figura 211 tampoco hubo diferencias en el peso corporal entre los tres grupos. Mientras que los tomates EV no afectaron los parámetros mencionados anteriormente, la alimentación con los tomates EV y 6F transgénicos redujo significativamente los niveles plasmáticos de ácido araquidónico libre, 5-HETE, 15-HETE y aumentó los niveles plasmáticos de DHA y EPA libres (Figuras 22A-22E). Los niveles plasmáticos de 12-HETE libres, 20-HETE, PGD2, PGE2, TXB2, 14,15-EET, y 8-iso PGF2 α no mejoraron significativamente alimentando con tomates EV o 6F transgénicos (datos no mostrados). Como se muestra en la Figura 23, la alimentación con WD con tomate transgénico 6F redujo significativamente el porcentaje de aorta con aterosclerosis según lo determinado por el análisis en la cara en comparación con WD solo o tomate WD + EV; este último no fue significativamente diferente de WD solo.

25 ¿Qué biomarcadores se correlacionaron con el porcentaje de aorta con lesiones ateroscleróticas?

30 El uso de la regresión lineal de los datos individuales para todos los ratones independientemente del tratamiento reveló una correlación positiva significativa entre el porcentaje de aorta con lesiones ateroscleróticas y SAA en plasma ($r^2 = 0,5358$, $p < 0,0001$); Colesterol total ($r^2 = 0,5937$, $p < 0,0001$); Triglicéridos ($r^2 = 0,3425$, $p < 0,0001$); y 15-HETE libre ($r^2 = 0,2666$, $p < 0,0001$). También hubo una correlación positiva muy débil pero significativa entre las lesiones y los niveles de PGD2 libre en plasma ($r^2 = 0,06078$, $p = 0,046$). Hubo una correlación inversa significativa entre el porcentaje de aorta con aterosclerosis y la actividad de PON ($r^2 = 0,2585$, $p < 0,0001$) y niveles de colesterol HDL ($r^2 = 0,5948$, $p < 0,0001$). Hubo una correlación inversa muy débil pero significativa entre el porcentaje de aorta con lesiones ateroscleróticas y los niveles plasmáticos de EPA libre ($r^2 = 0,09596$, $p = 0,0107$). No hubo correlación significativa entre el porcentaje de aorta con lesiones ateroscleróticas y el peso corporal, ácido araquidónico libre en plasma, 5-HETE, 12-HETE, 20-HETE, PGE2, TXB2, 14,15-EET, DHA, o 8-isoPGF2 α (datos no mostrados). Como se muestra en las Figuras 31A y 31B no hubo correlación entre los niveles plasmáticos de LPA 16:0 o LPA 18:0 y el porcentaje de aorta con lesiones. En contraste como se muestra en las Figuras 31C-31E hubo una correlación significativa entre los niveles de LPA 18:1, LPA 18:2 y LPA 20:4 niveles con el porcentaje de aorta con lesiones. Estas correlaciones fueron para todos los ratones con todos los tratamientos. La correlación entre algunos de estos biomarcadores de plasma y el porcentaje de aorta con lesiones para ratones que recibieron WD con tomates 6F transgénicos se muestra en las Figuras 24A-24E.

45 ¿Los niveles de lípidos del intestino delgado fueron alterados por los tratamientos?

50 Pudimos medir el colesterol tisular y los niveles de LPA en el duodeno, yeyuno e íleon en un subconjunto aleatorio de los ratones descritos en las Figuras 21-23. Como se muestra en las Figuras 32A-32C, la adición tanto del vector vacío (EV) como de los tomates 6F transgénicos al WD redujo significativamente los niveles de colesterol en tejido en el duodeno y el yeyuno, pero no en el íleon. La adición de tomates EV a WD redujo modesta aunque significativamente los niveles de colesterol en yeyuno más que la adición de tomates transgénicos 6F (Figura 32B); los niveles de colesterol en el duodeno no fueron diferentes entre los ratones alimentados con tomates EV o tomates 6F transgénicos (Figura 32A). Como se muestra en la Figura 32E, los niveles de colesterol en yeyuno fueron muy débiles pero se correlacionaron significativamente con el porcentaje de aorta con lesiones en estos ratones, pero no hubo una correlación significativa de las lesiones con los niveles de colesterol en los tejidos ni en el duodeno (Figura 32D) ni en el íleon (Figura 32F). En contraste con estos resultados para los niveles de colesterol del intestino delgado, como se muestra en las Figuras 25A-25F, agregar tomates transgénicos 6F a WD en comparación con agregar tomates EV a WD redujo significativamente los niveles de LPA 18:2 y LPA 20:4 en el duodeno, yeyuno e íleon. Como se muestra en las Figuras 26A-26F, excepto para LPA 20:4 en el duodeno, que se acercó a la significancia (pero no la alcanzó), los niveles de LPA 18:2 y LPA 20:4 en el duodeno, yeyuno e íleon se correlacionaron significativamente con el porcentaje de aorta con lesiones ateroscleróticas en estos ratones.

60 ¿Dónde actúa el péptido?

65 Los datos presentados anteriormente indican que el péptido en los tomates 6F transgénicos actúa en el intestino delgado. Si este fuera el caso, podríamos esperar encontrar un péptido intacto en el intestino delgado de ratones que comen WD con tomates 6F transgénicos, pero poco o ningún péptido intacto en el plasma. Los ratones descritos en

la Figura 33 se mantuvieron en ayunas durante una noche durante 20 horas y luego se alimentaron con polvo de tomate 6F transgénico liofilizado que contenía 900 µg de 6F en 2 gramos de dieta. Durante un periodo de 30 a 90 minutos cada uno de los seis ratones comió todos los 2 gramos de dieta. Aproximadamente 2 horas después de que los ratones terminaron de comer se les extrajo sangre y sus intestinos pequeños se recolectaron y analizaron como se describe en Materiales y Métodos. Se encontró un péptido 6F intacto en el intestino delgado de cada uno de estos seis ratones en cantidades de microgramos (Media ± DT fue de 15,6 ± 7,4 µg 6F por cada 200 mg de intestino delgado). En estos estudios el límite inferior de detección para el péptido 6F en el plasma fue de 100 ng/ml. No se detectó péptido 6F en el plasma de ninguno de los seis ratones. Así ~2 horas después de comer los tomates 6F transgénicos, el péptido 6F intacto se encontró en el intestino delgado, pero no en el plasma. Estos datos son consistentes con el péptido que actúa en el intestino delgado.

Análisis

En nuestro trabajo original sobre la terapia del mimético de apoA-I, concluimos que D-4F pero no L-4F serían eficaces oralmente (Navab *et al.* (2002) *Circ.* 105: 290-292). Esta conclusión se basó en experimentos en donde se administró a los ratones LDLR^{-/-} L-4F o D-4F por medio de un tubo estomacal en una dosis única de 5 mg/kg/ratón. Cuatro horas después de esta dosis única, las propiedades inflamatorias de HDL y LDL según lo determinado en un ensayo basado en células mejoraron dramática y significativamente en el caso de D-4F pero no de L-4F. Utilizando ¹²⁵I-péptidos, también encontramos que después de la administración oral de L-4F prácticamente no había péptido intacto en el plasma, pero después de la administración de D-4F se identificó un péptido intacto en el plasma. Dado que la L-4F fue ineficaz y la D-4F fue eficaz en este estudio se asumió que era necesario que el péptido intacto para acceder al plasma sea eficaz (*Id.*). Respaldo esta suposición fue el hallazgo de que cuando se administra por inyección a una dosis de 10 mg/kg/día a conejos alimentados con colesterol, la eficacia de L-4F y D-4F era idéntica (Van Lenten *et al.* (2007) *J. Lipid Res.* 48: 2344-2353). Se realizó un estudio de fase I/II en seres humanos en donde D-4F se administró por vía oral en dosis que oscilaron entre 0,43 y 7,14 mg/kg. Los niveles máximos de péptidos en plasma fueron bajos (C_{máx} 15,9 ± 6,5 ng/ml) pero las dosis de 4,3 y 7,14 mg/kg mejoraron significativamente el índice inflamatorio de HDL (HII), mientras que las dosis de 0,43 y 1,43 mg/kg no fueron eficaces (Bloedon *et al.* (2008) *J. Lipid Res.* 49: 1344-1352). Posteriormente, en estudios preclínicos se encontró que D-4F había retrasado el aclaramiento de los tejidos, particularmente el hígado y el riñón hacen que su uso en seres humanos sea problemático; este no fue el caso para L-4F (Watson *et al.* (2011) *J. Lipid Res.* 52: 361-373). Como se sabía que L-4F y D-4F eran igualmente eficaces cuando se administraban mediante inyección (Van Lenten *et al.* (2007) *J. Lipid Res.* 48: 2344-2353), y se pensó que los niveles plasmáticos del péptido podrían ser el factor crítico de éxito para su eficacia, los estudios en seres humanos se diseñaron para alcanzar niveles plasmáticos elevados con dosis bajas de L-4F administrada por vía intravenosa o SQ (Watson *et al.* (2011) *J. Lipid Res.* 52: 361-373). Las dosis de 0,042 - 1,43 mg/kg de L-4F produjeron niveles plasmáticos elevados de péptido (por ejemplo, C_{máx} 3.255 ± 630 ng/ml en el estudio IV), pero sorprendentemente no hubo mejoría en HII (*Id.*). Después de este resultado decepcionante, volvimos a los modelos de ratón para comprender esta paradoja y, de forma inesperada, descubrimos que i) los niveles plasmáticos no predecían la eficacia - la dosis administrada predecía la eficacia y ii) mientras que la concentración de péptido difería en órdenes de magnitud en plasma e hígado dependiendo de la vía de administración, la concentración de péptido en las heces (Navab *et al.* (2011) *J. Lipid Res.* 52: 1200-1210) e intestino delgado (Navab *et al.* (2012) *J. Lipid Res.* 53: 437-445) fue similar a dosis similares independientemente de si el péptido se administró por vía oral o SQ. Para explicar la misma eficacia en cada dosis administrada, independientemente de la vía de administración debería haber concentraciones iguales de péptido en al menos un compartimento que contenga un sitio de acción importante. En dos estudios separados (Navab *et al.* (2011) *J. Lipid Res.* 52: 1200-1210; Navab *et al.* (2012) *J. Lipid Res.* 53: 437-445) se encontró que el intestino era ese compartimento.

La administración de L-4F por vía oral (incorporada en pienso de ratón) en una dosis de 10 mg/kg/día a ratones apoE^{-/-} hembra a partir de los 9,5 meses de edad y continuando durante seis meses junto con la adición de una dosis baja de estatina en el agua de bebida no cambió significativamente la aterosclerosis aórtica (Navab *et al.* (2009) *J. Lipid Res.* 50: 1538-1547). Por el contrario, si el L-4F se administraba con niclosamida que se une al L-4F y lo protege contra la degradación de la tripsina en el intestino, el péptido no solo inhibía la progresión de la lesión, en realidad inducía la regresión de la lesión en estos ratones viejos (*Id.*). En un estudio posterior, razonamos que si en lugar de administrar el péptido con niclosamida, simplemente aumentamos la dosis en 10 veces, suficiente L-4F podría sobrevivir a la degradación después de la administración oral para ser eficaz. De hecho este era el caso. La administración de L-4F en pienso de ratón a una dosis de 100 mg/kg/día redujo significativamente los niveles de LPA en plasma y disminuyó significativamente la carga tumoral en un modelo de ratón de cáncer de ovario (Su *et al.* (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 107: 19997-20002).

Estos estudios sugirieron que la terapia con mimético de apoA-I oral con péptidos sintetizados a partir de todos los L-aminoácidos podría ser factible si utilizáramos altas dosis del péptido. Desafortunadamente, no era probable que se produjera péptido suficiente para que la terapia en seres humanos fuera práctica porque el péptido 4F requiere grupos de bloqueo final que solo pueden agregarse mediante síntesis química. Utilizando modelos de ratón, exploramos la posibilidad de utilizar el péptido 4F sin grupos bloqueadores terminales pero encontramos que la actividad del péptido se redujo drásticamente (datos no mostrados). Esto nos llevó a buscar péptidos alternativos sintetizados a partir de todos los L-aminoácidos que podrían ser eficaces sin grupos bloqueadores finales. Como se describe aquí, se encontró que 6F era tal péptido.

Basado en nuestro trabajo anterior (Navab *et al.* (2011) *J. Lipid Res.* 52:1200-1210; Navab *et al.* (2012) *J. Lipid Res.* 53: 437-445; Su *et al.* (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 107: 19997-20002) elegimos probar las dosis de péptido de 40-100 mg/kg/día. La adición del péptido 6F sintetizado de todos los L-aminoácidos sin grupos de bloqueo final a las dietas de ratones apoE^{-/-} o LDLR^{-/-} (pienso o WD) a una dosis de 60 mg/kg/día dio como resultado una disminución significativa de la SAA en plasma (Figuras 16A y 16B). Además, el porcentaje de aorta con aterosclerosis también disminuyó significativamente (Figura 16C). Elegimos probar primero la expresión transgénica del péptido 6F en los tomates porque razonamos que el péptido debe expresarse en una planta que se pueda comer sin cocinar para evitar la desnaturalización del péptido. La adición del péptido 6F al tomate homogeneizado no condujo a una pérdida de eficacia (Figura 28) contra El péptido 6F se expresó con éxito en plantas de tomate y se encontró en frutos de tomate maduros (Figuras 17, 18 y Figura 29). La alimentación con tomates liofilizados que contenían 6F a ratones LDLR^{-/-} en WD durante dos semanas alteró favorablemente algunos biomarcadores plasmáticos (Figura 19 y Figura 30), pero no alteró los niveles plasmáticos de colesterol total o triglicéridos. En algunos de estos experimentos la alimentación con tomates liofilizados molidos de control disminuyó algunos de los biomarcadores lo que aumenta la posibilidad de que los efectos superiores de los tomates 6F transgénicos se deban a un mayor contenido de antioxidantes. Este no fue el caso del principal antioxidante en los tomates, licopeno (Figura 20). Dado que la adición a la dieta de L-6F sintetizado químicamente sin grupos bloqueadores produjo resultados biológicos similares a los logrados con la adición de tomates 6F transgénicos liofilizados, es probable que al menos algunos de estos efectos se debieran a la presencia del péptido en los tomates. Basándose en los datos de la Figura 20, también es probable que los efectos beneficiosos de los tomates 6F transgénicos no se debieran a su contenido de licopeno. Sin embargo, ciertamente no podemos excluir que una parte (si no todos) de los efectos beneficiosos de expresar el péptido 6F en los tomates se debe a un aumento de componente no 6F, no licopeno aún no identificado, de estos tomates.

La extensión de los experimentos de alimentación a 13 semanas usando tomates EV como control reveló que solo los tomates 6F transgénicos disminuyeron significativamente el SAA en plasma, colesterol total, triglicéridos y niveles de LPA, y aumento de la concentración de colesterol HDL y PON en plasma (Figura 21), y disminuyó el porcentaje de aorta con lesiones (Figura 23); todo sin cambiar el peso corporal (Figura 211). Sin embargo, los tomates EV disminuyeron los niveles plasmáticos de ácido araquidónico libre y algunos de sus metabolitos y aumentaron el DHA y el EPA (Figura 22) lo que sugiere que probablemente haya un beneficio del contenido de antioxidantes de los tomates de control. El aumento en los niveles plasmáticos de DHA y EPA puede deberse a la disminución de la oxidación de estos ácidos grasos altamente insaturados en la alimentación de los tomates de control. El aumento adicional de los niveles plasmáticos de DHA y EPA en la alimentación de los tomates 6F transgénicos probablemente represente una reducción adicional en el estrés oxidativo inducido por WD más allá del alcanzado por los antioxidantes contenidos en los tomates control.

Basándose en correlaciones entre el porcentaje de aterosclerosis y los diversos biomarcadores medidos parece probable que el mecanismo de acción de los tomates 6F transgénicos implique una alteración en el metabolismo de los lípidos en el intestino que altere favorablemente el colesterol total en plasma, triglicéridos, niveles de LPA, colesterol HDL, y actividad de PON, lo que resulta en una disminución de la inflamación sistémica (niveles de SAA) y aterosclerosis sin cambiar el peso corporal. Se ha informado que el LPA puede alterar la secreción de lipoproteínas que contienen apoB de los hepatocitos (Shen *et al.* (2012) *Atherosclerosis*, 222: 154-157) y LPA20:4 estimula la aterosclerosis en modelos de ratones (Zhou *et al.* (2011) *Cell Metabolism*, 13:592-600). Como se muestra en la Figura 25, la alimentación de tomates 6F transgénicos redujo significativamente los niveles de LPA 18:2 y LPA 20:4 en el duodeno, yeyuno e íleon. Los niveles de estas especies de LPA se correlacionaron significativamente con el porcentaje de aorta con lesiones ateroscleróticas como se muestra en la Figura 26. Así, una posibilidad es que la reducción en los niveles de LPA intestinal y plasmático explique en parte la disminución observada en el colesterol total en plasma, los triglicéridos y el porcentaje de aorta con lesiones ateroscleróticas. Es interesante observar que los niveles plasmáticos de especies de LPA insaturadas se correlacionaron significativamente con el porcentaje de aorta con aterosclerosis, mientras que los niveles de especies de LPA saturadas no lo hicieron.

Como se muestra en la Figura 32, la alimentación con los tomates EV y 6F transgénicos disminuyó significativamente los niveles de colesterol en el duodeno y el yeyuno, pero no redujo los niveles de colesterol en el íleon. Como se muestra en la Figura 21B solo los tomates 6F transgénicos disminuyeron significativamente los niveles de colesterol en plasma. Además y en contraste con el caso de los niveles de colesterol en plasma (Figura 24A), los niveles de colesterol en el intestino delgado se correlacionaron muy débilmente con el porcentaje de aorta con lesiones (Figura 32E) o no se correlacionaron con el porcentaje de aorta con lesiones (Figuras 32D y 32F).

Es posible que los tomates 6F transgénicos disminuyan la absorción de colesterol o triglicéridos en los estudios de alimentación de 13 semanas. Sin embargo si este fuera el caso, no está claro por qué el colesterol total en plasma y los triglicéridos no disminuyeron significativamente en los estudios de alimentación de dos semanas.

En estudios preliminares no publicados en un modelo de ratón de cáncer de ovario encontramos que al agregar los tomates 6F transgénicos liofilizados a pienso se obtuvieron resultados similares a los informados previamente para L-4F (Su *et al.* (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 107:19997-20002). Estos estudios, tomado con los datos proporcionados en el presente documento, sugieren que la eficacia de los tomates 6F transgénicos no requiere ni hiperlipidemia ni WD.

Este es el primer informe de expresión transgénica de un péptido en una fruta que cuando se alimenta a ratones da como resultado las propiedades antiinflamatorias descritas aquí. Los mecanismos particulares de acción y/o modos de interacción con el intestino están bajo investigación. En este sentido, se observa que los datos en la Figura 33 indican que ~2 horas después de que los ratones terminaran de comer 900 µg de 6F contenidos en tomates transgénicos, el péptido 6F intacto se identificó en el intestino delgado en cantidades de microgramos ($15,6 \pm 7,4$ µg de 6F por cada 200 mg de intestino delgado), pero no se detectó ningún péptido en el plasma con métodos que hubieran detectado 100 ng/ml. Sin pretender quedar ligado a una teoría particular, es posible que el péptido 6F esté protegido de la degradación de la tripsina al expresarse en una fruta (por ejemplo, el fruto del tomate) similar al caso de la niclosamida.

Ejemplo 4

Uso del promotor de tomate E8 para expresar péptidos miméticos de Apo-AI en plantas.

En diversas realizaciones, se contempla el uso de promotores alternativos tales como el promotor E8 o el promotor híbrido E4/E8 para expresar uno o más de los diversos péptidos descritos en el presente documento. El promotor E8 se describe en detalle en Kurokawa *et al.* (2013) An E8 promoter-HSP terminator cassette promotes the high-level accumulation of recombinant protein predominantly in transgenic tomato fruits: a case study of miraculin, *Plant Cell Rep.*, 11 de enero (Epub antes de imprimir) PMID: 23306632.

El plásmido pB 1121 (ver, por ejemplo, Figuras 34 y 35) se cultivó en cultivos bacterianos. El plásmido se aisló y se digirió en los sitios *Hind* III y *Bam* HI para eliminar el promotor 35S de CaMV. La estructura principal del vector pBI121 después de la digestión en *Hind* III/*Bam*HI se aisló en un gel SDS PAGE (Figura 36).

Se aisló ADN genómico de tomate y se prepararon cebadores para el promotor E8 que lleva los sitios de restricción *Hind* III y *Bam*HI. El promotor E8 se amplificó por PCR y se verificó la secuencia (ver la Figura 37).

La estructura principal del vector pBI121 (Figura 36) y el fragmento de PCR E8 (Figura 37) que llevan los sitios de restricción *Hind*III y *Bam*HI se ligaron. Las bacterias se transformaron con el producto ligado. Las colonias positivas siguieron creciendo y se utilizó PCR para confirmar las colonias +ve (Figura 38). La presencia del constructo se confirmó mediante digestión *Hin*DIII/*Bam*HI y un análisis SDS PAGE del producto (Figura 39).

El protocolo dio como resultado bacterias portadoras del plásmido pBI 121 modificado, que contiene el gen GUS dirigido por E8. El gen GUS puede estar sustituido (por ejemplo, como se describe anteriormente) con un ácido nucleico que codifica cualquiera de los péptidos (por ejemplo, 6F) descrito en el presente documento por proporcionar un constructo para transfectar una planta para expresar el péptido bajo el control del promotor E8.

Se entiende que los ejemplos y las realizaciones descritas en el presente documento son solo para fines ilustrativos y que varias modificaciones o cambios a la vista de los mismos se sugerirán a los expertos en la materia y se incluirán dentro del espíritu y alcance de la presente solicitud y alcance de las reivindicaciones adjuntas. Todas las publicaciones, patentes, y solicitudes de patente citadas en el presente documento se incorporan por la presente como referencia en su totalidad para todos los fines.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una planta de tomate transgénica que comprende células que expresan un péptido del que uno o más dominios comprenden la secuencia de aminoácidos DWLKAFYDKFFEKFKKEFF (SEQ ID NO: 17), en donde dicho péptido en el fruto de dicha planta es eficaz para disminuir los niveles plasmáticos de ácido lisofosfatídico (LPA) en un mamífero, y/o para disminuir los niveles séricos de amiloide A (SAA) en dicho mamífero, y/o para aumentar la actividad de paraoxonasa plasmática en dicho mamífero cuando dicho mamífero se alimenta con dicha fruta como un polvo liofilizado.
- 10 2. La planta transgénica de reivindicación 1, en donde dicho péptido comprende un dominio que comprende la secuencia de aminoácidos DWLKAFYDKFFEKFKKEFF (SEQ ID NO: 17).
- 15 3. La planta transgénica de reivindicación 1, en donde dicha secuencia de aminoácidos de dicho péptido consiste en la secuencia DWLKAFYDKFFEKFKKEFF (SEQ ID NO: 17).
- 20 4. La planta transgénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha planta y/o una parte de la misma es eficaz para disminuir los niveles plasmáticos de ácido lisofosfatídico (LPA) en un mamífero, y/o para disminuir los niveles de SAA en dicho mamífero, y/o para aumentar la actividad de paraoxonasa plasmática en dicho mamífero cuando dicho mamífero se alimenta con dicha fruta como un componente de un alimento o dieta.
- 25 5. La planta transgénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicho péptido se expresa mediante un constructo de ácido nucleico integrado de manera estable en el genoma de la planta.
- 30 6. La planta transgénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho péptido se expresa bajo el control de un promotor CaMV, y/o un promotor E8, y/o un promotor híbrido E4/E8.
- 35 7. La planta transgénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho péptido se expresa bajo el control de un promotor E8.
- 40 8. La planta transgénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho péptido se expresa bajo el control de un promotor híbrido E4/E8.
- 45 9. La planta transgénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde toda, o una parte de la planta se seca o se liofiliza, y/o se muele.
- 50 10. Una fruta transgénica de una planta transgénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 55 11. Una semilla de una planta transgénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 60 12. Una hoja, raíz o tubérculo de una planta transgénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
13. Un alimento o ingrediente alimentario que comprende al menos una parte de la fruta de una planta transgénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8; o un suplemento nutricional que comprende una planta transgénica o una parte de la planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
14. Una planta o parte de una planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, o un alimento, proteína en polvo, o un suplemento nutricional de acuerdo con la reivindicación 13, para uso en el tratamiento o profilaxis de aterosclerosis; y/o el tratamiento o profilaxis de una patología caracterizada por una respuesta inflamatoria; y/o el tratamiento o profilaxis de degeneración macular; y/o el tratamiento o profilaxis del cáncer.
15. Un ácido nucleico aislado que codifica un péptido del que uno o más dominios comprenden la secuencia de aminoácidos DWLKAFYDKFFEKFKKEFF (6F, SEQ ID NO: 17), en donde los codones de dicho ácido nucleico están optimizados para expresión en una planta de tomate, en donde dicha secuencia de ácidos nucleicos está en un vector que expresa dicho péptido a una concentración eficaz cuando se transfecta en una planta, y en donde dicho péptido se expresa a un nivel que es eficaz para disminuir los niveles plasmáticos de ácido lisofosfatídico (LPA) en un mamífero, y/o para disminuir los niveles de amiloide A (SAA) en suero en dicho mamífero, y/o para aumentar la actividad de paraoxonasa plasmática en dicho mamífero cuando dicho mamífero se alimenta con dicha fruta de dicha planta de tomate como un polvo liofilizado.

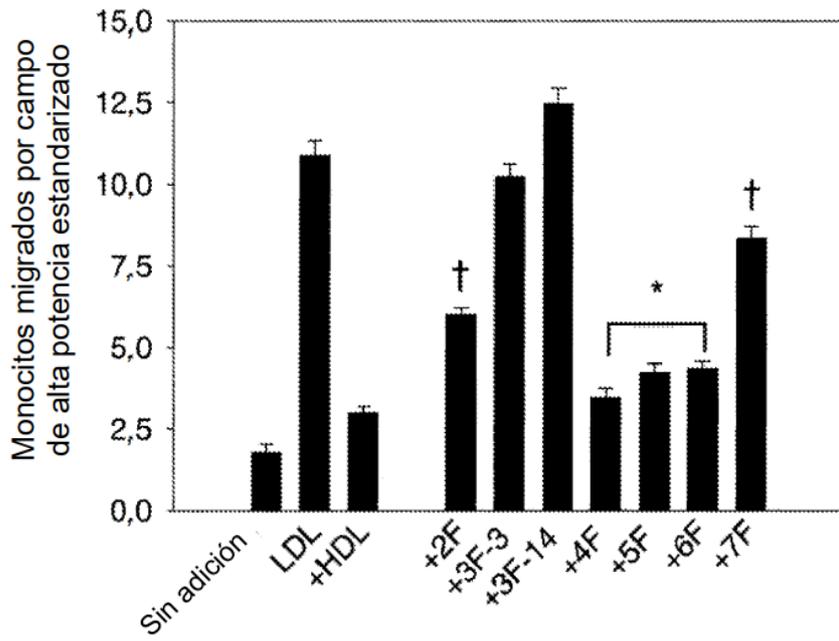


Fig. 1

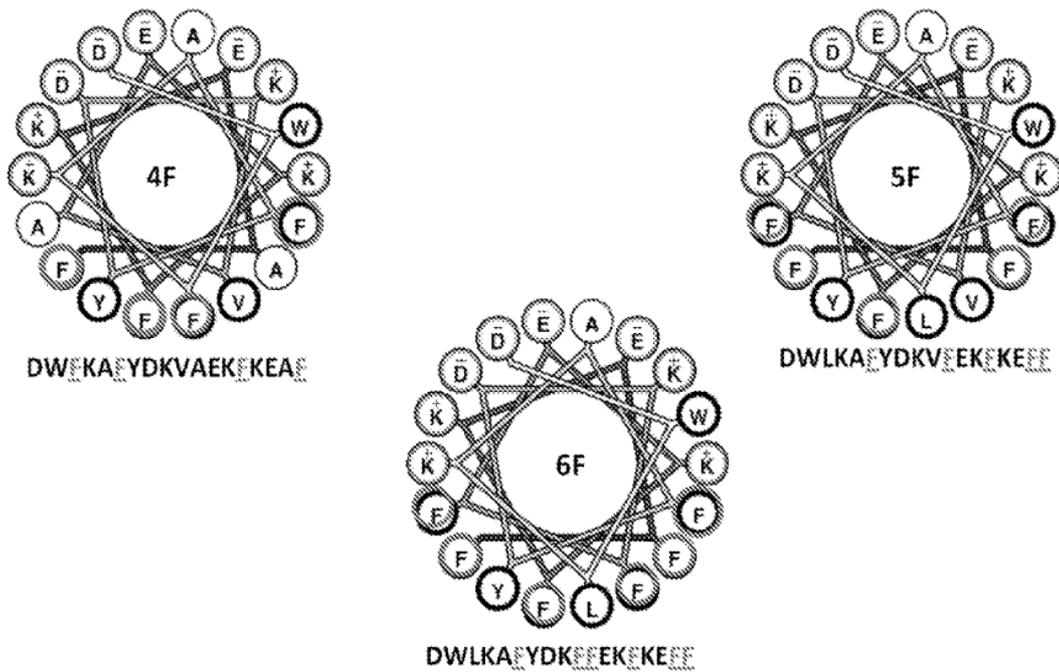


Fig. 2

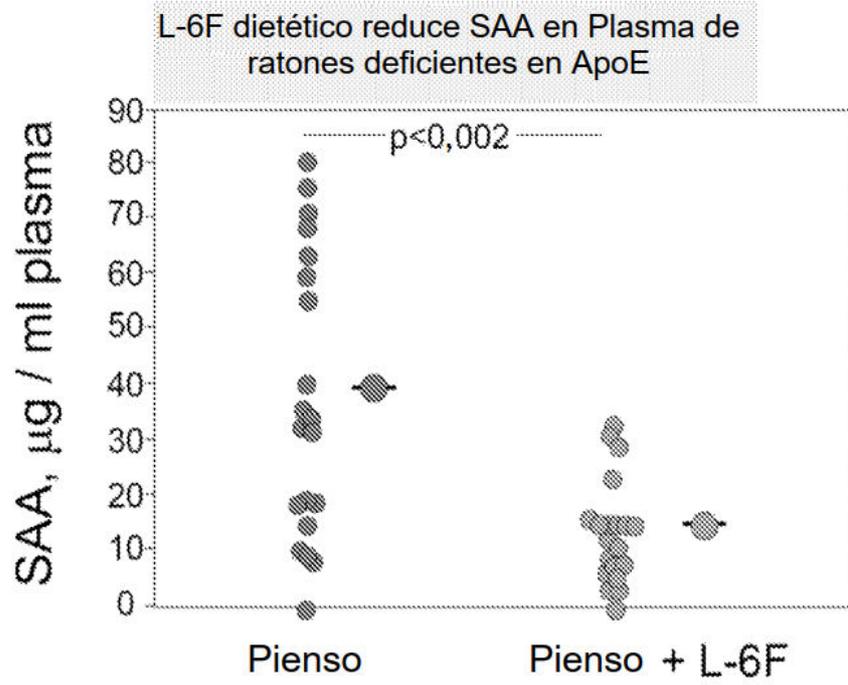


Fig. 3

Expresión planta

Péptido (6F) DWLKAFYDKFFEKFKKEFF



Codón de uso para tomate

<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=4081>



ADN(6F) después de adición de péptido señal (MIMASSKLLSLALFLALLSHANS)

ALFA All-Phaseolus vulgaris

TCTAGAATGATTATGGCTTCTTCTAAACTTCTTTCTCTTGCTCT
TTTTCTTGCTCTTCTTTCTCATGCTAATTCTGATTGGCTTAAA
GCTTTTATGATAAATTTTTTGAAAAATTTAAAGAATTTTTTT
GAGAGCTC

Fig. 4

LBA4404 de *Agrobacterium* transformada con vector de sobreexpresión de 6F



Cepa de *Agrobacterium tumefaciens* con pBI121 solo y pBI121+6F

Fig. 5

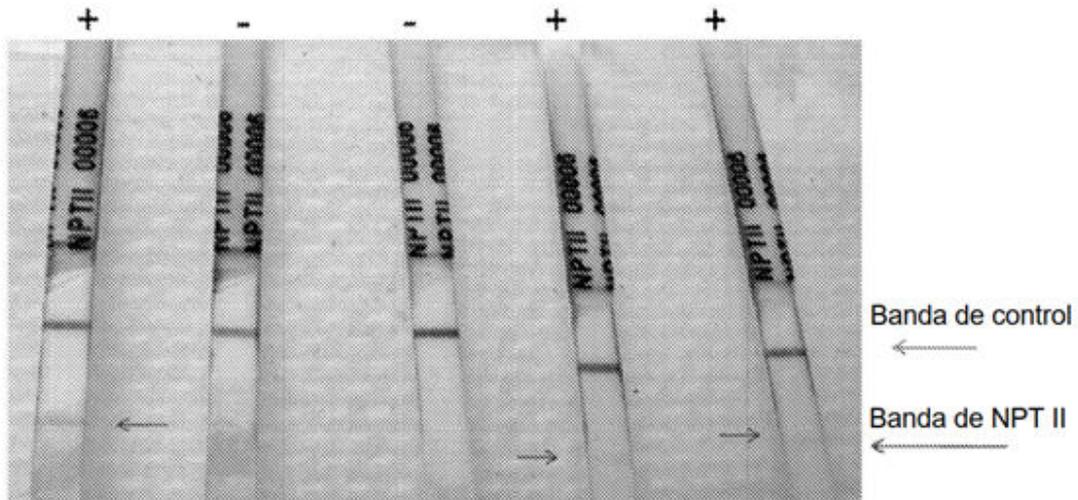


Fig. 6

Análisis molecular de plantas de tomate 6F transgénicas

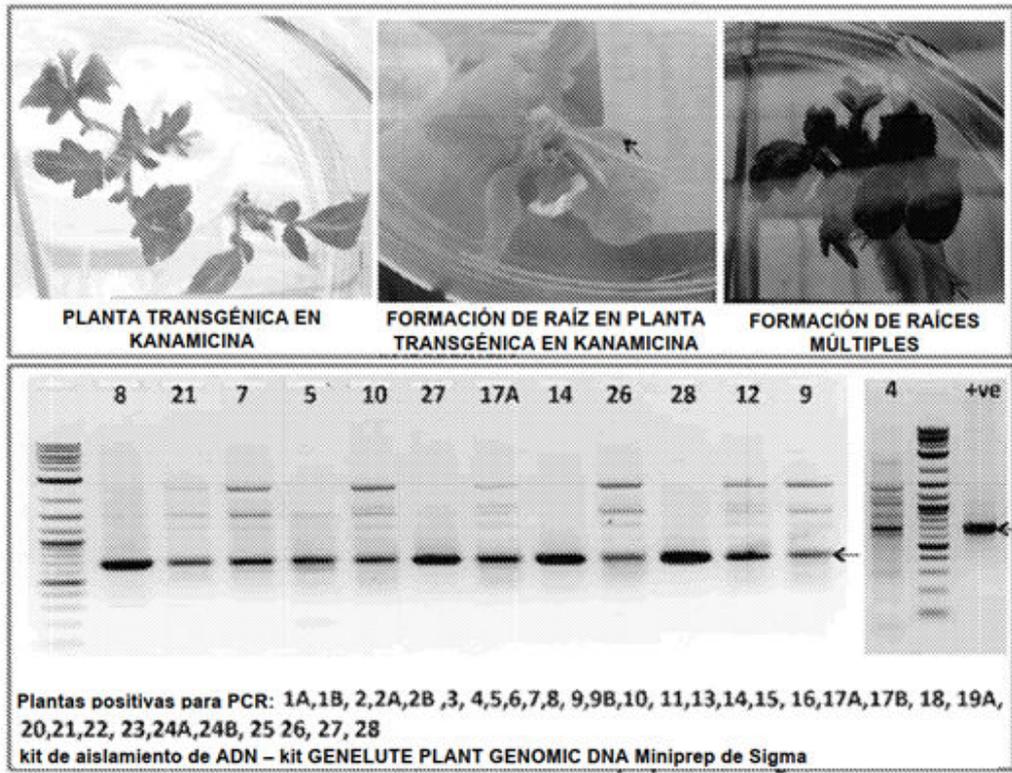
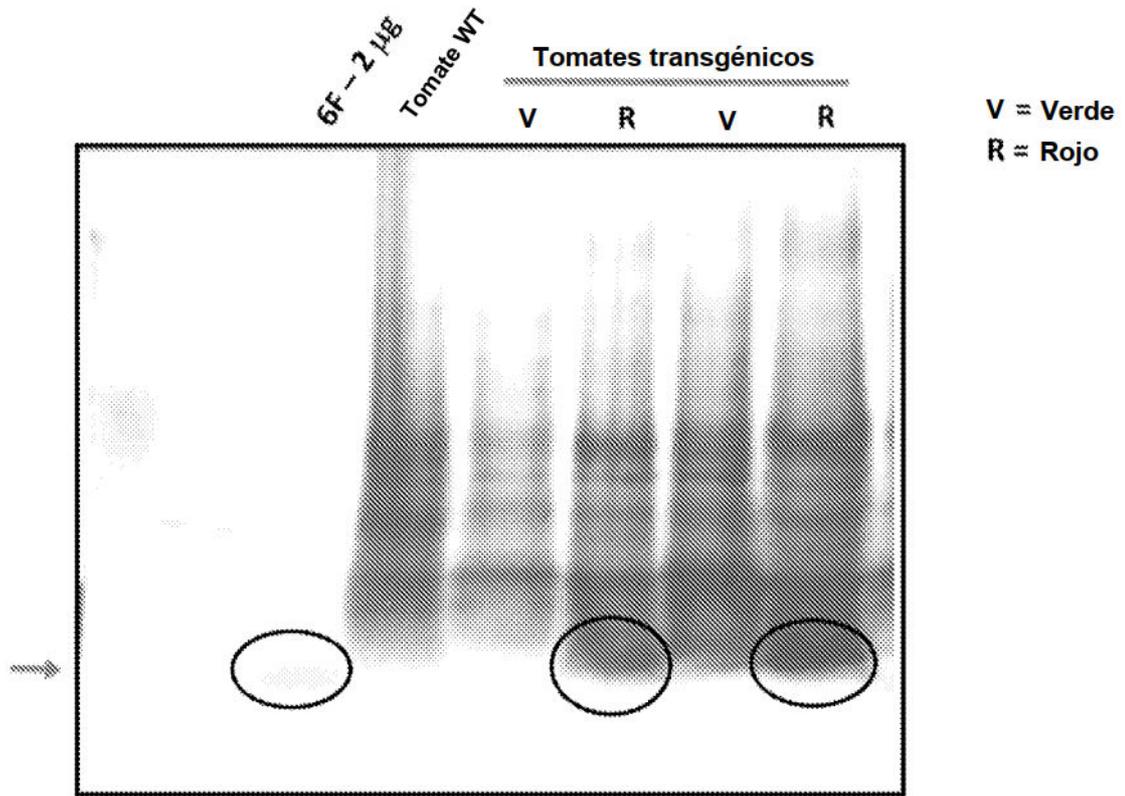


Fig. 7

Expresión de 6F en tomates verdes y rojos de la línea 17A transgénica



En cada calle se cargaron 100 µg de extracto de proteína total

Fig. 8

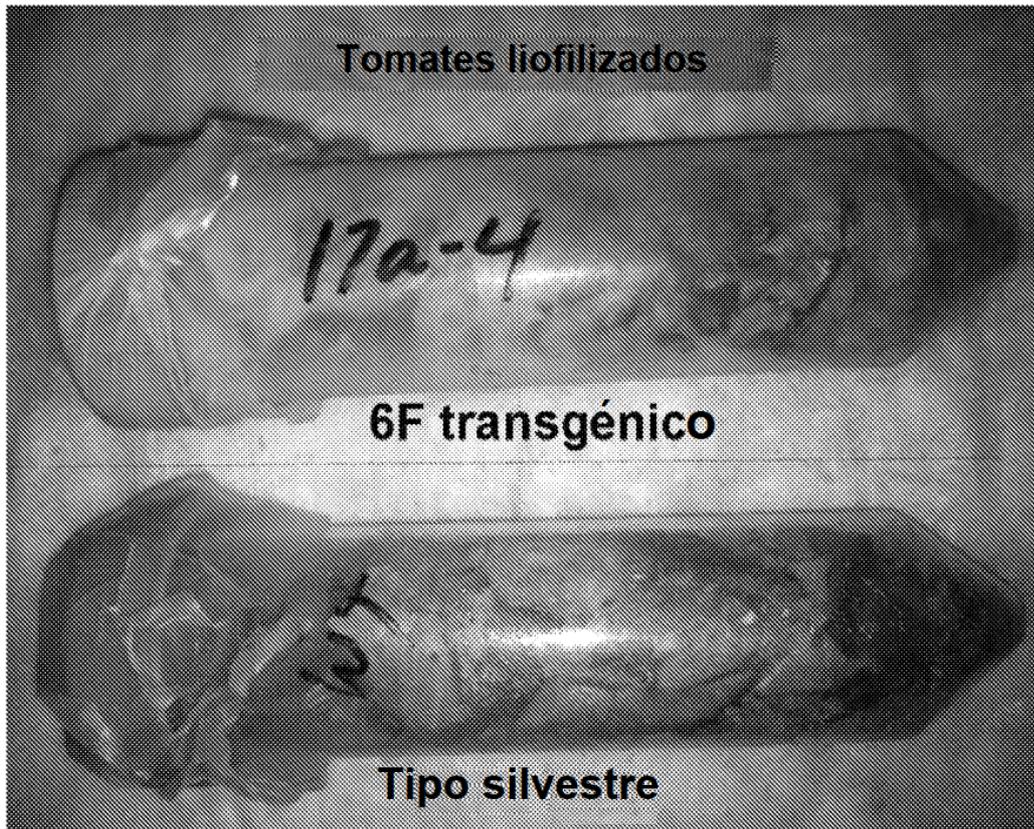


Fig. 9

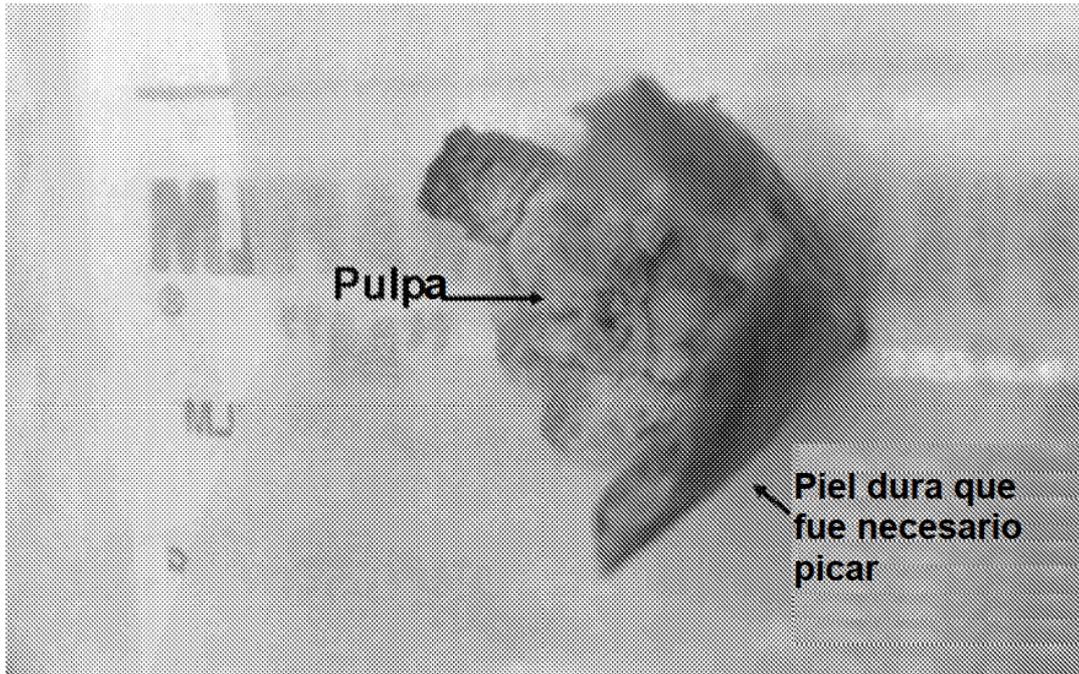


Fig. 10



Fig. 11

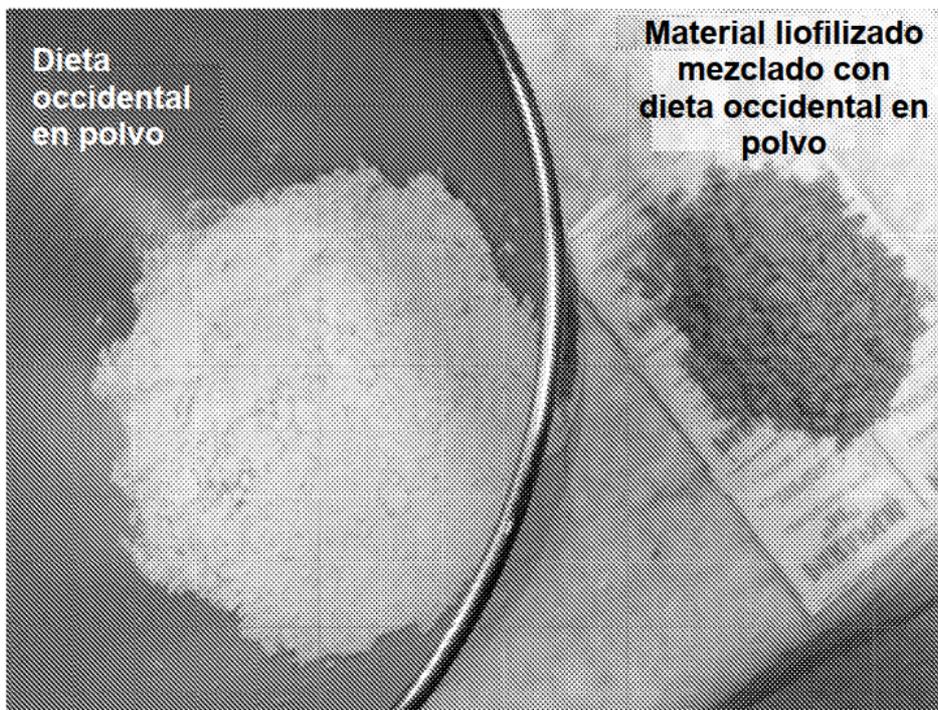


Fig. 12

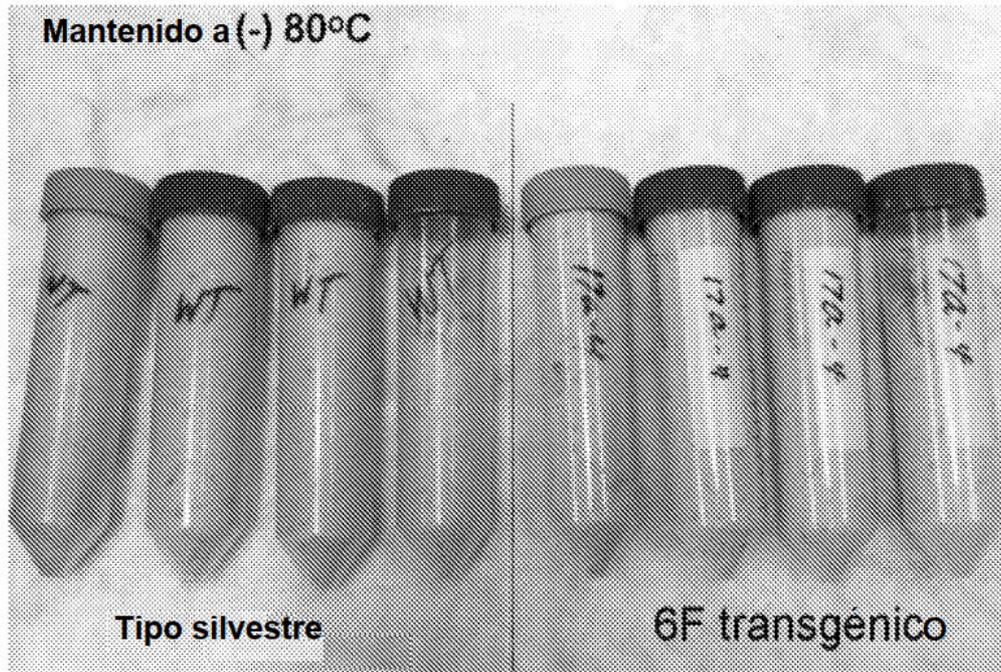


Fig. 13

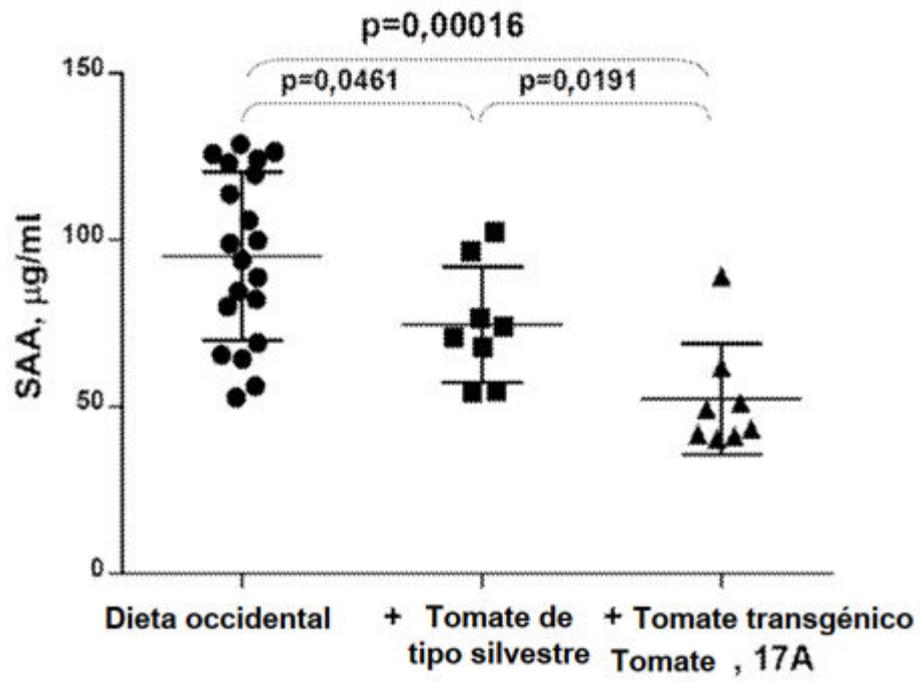
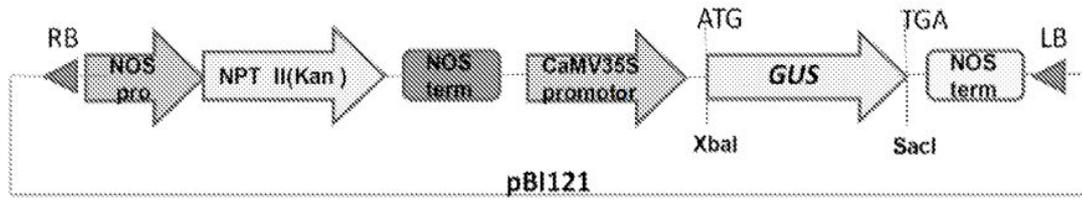
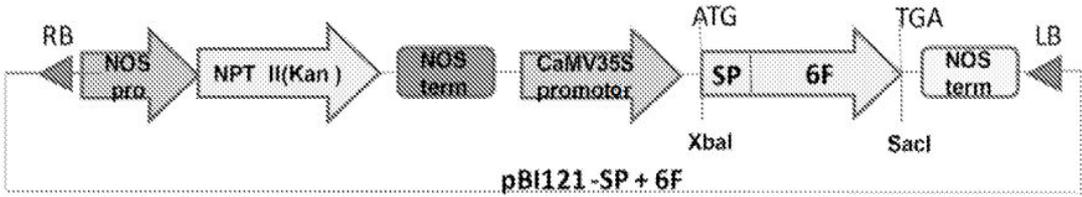


Fig. 14



Vector vacío (EV)



vector para expresar péptido 6F en tomates

Fig. 15

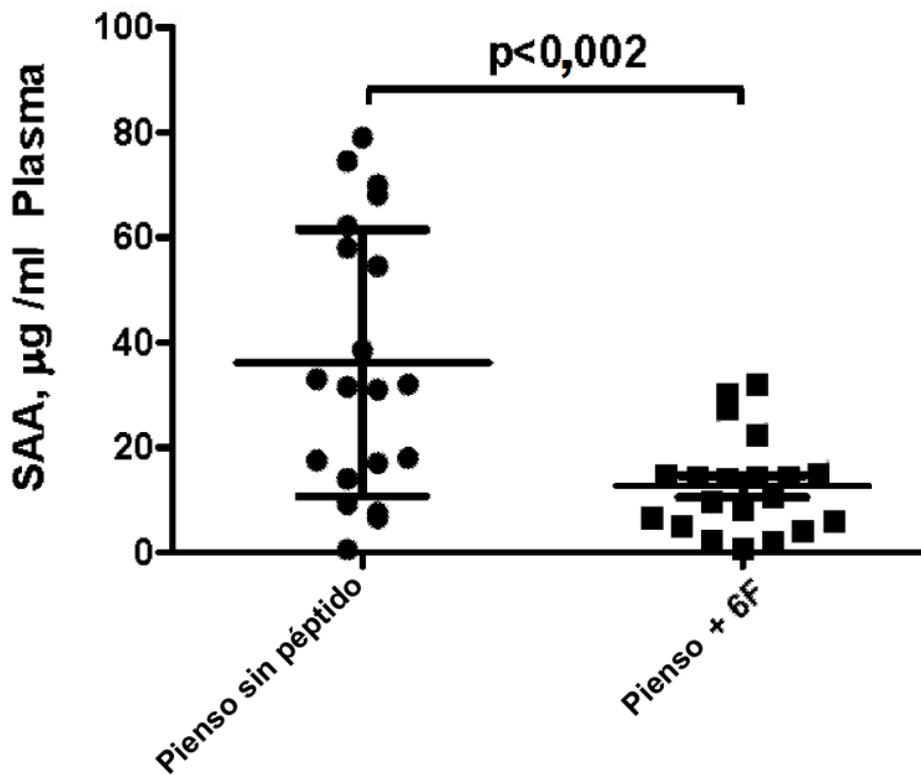


Fig. 16A

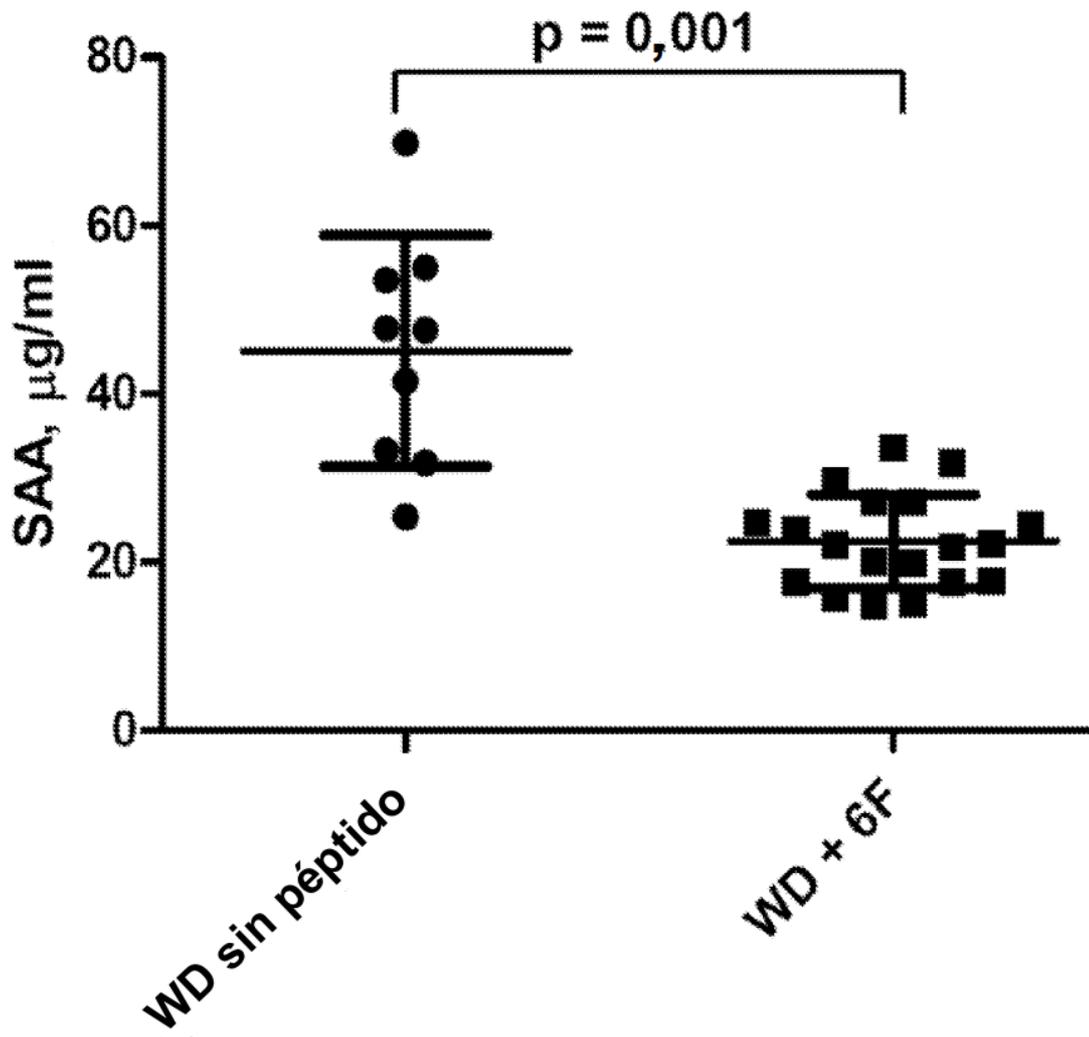


Fig. 16B

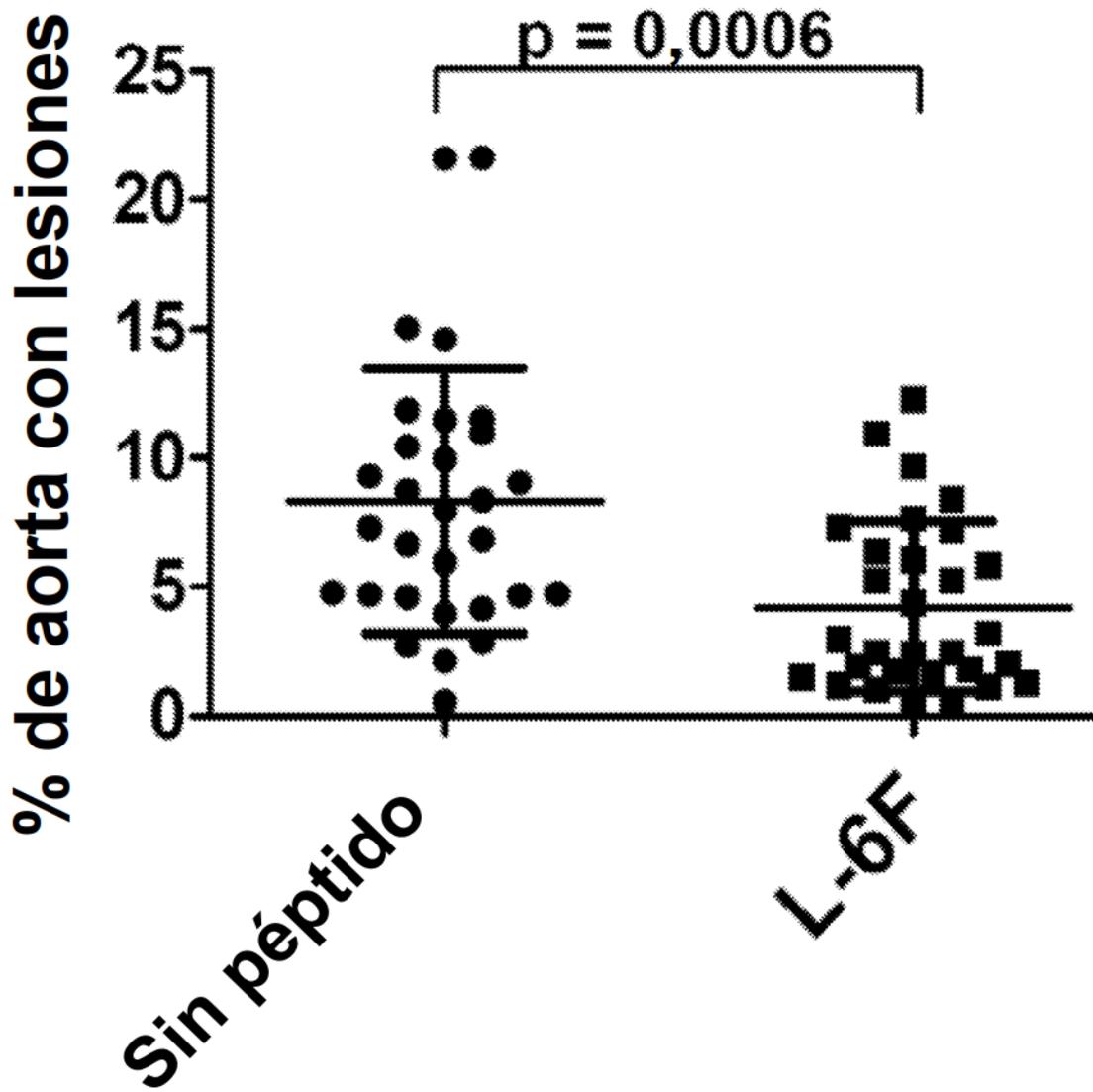


Fig. 16C

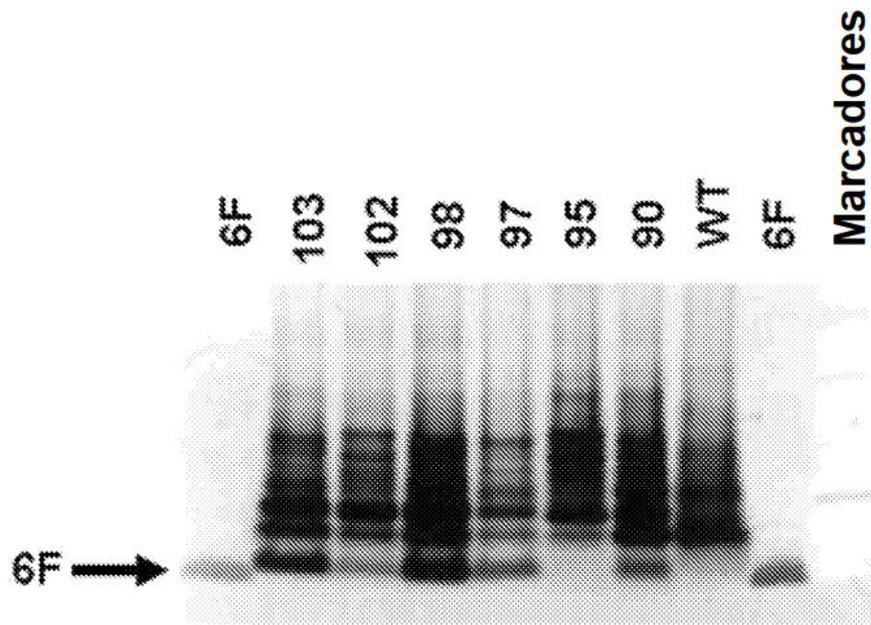


Fig. 17

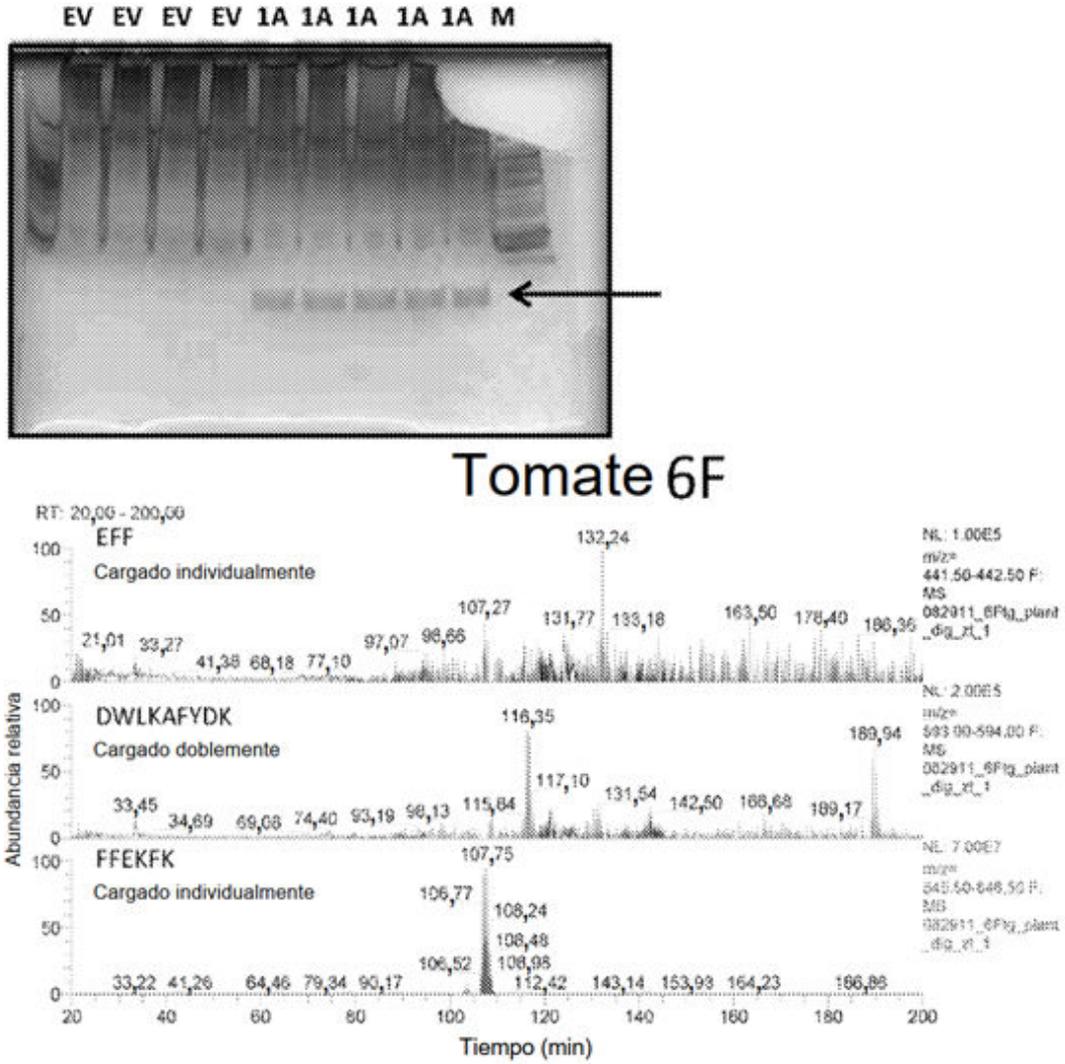


Fig. 18A

EV EV EV EV 1A 1A 1A 1A 1A M

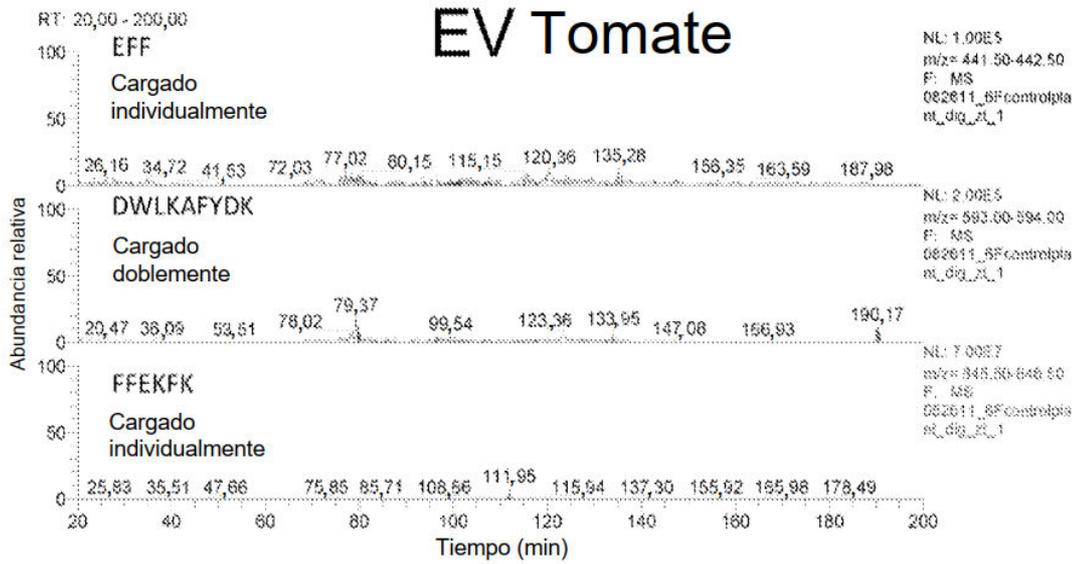
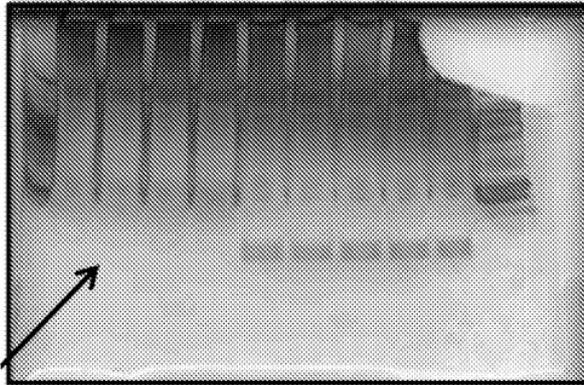


Fig. 18B

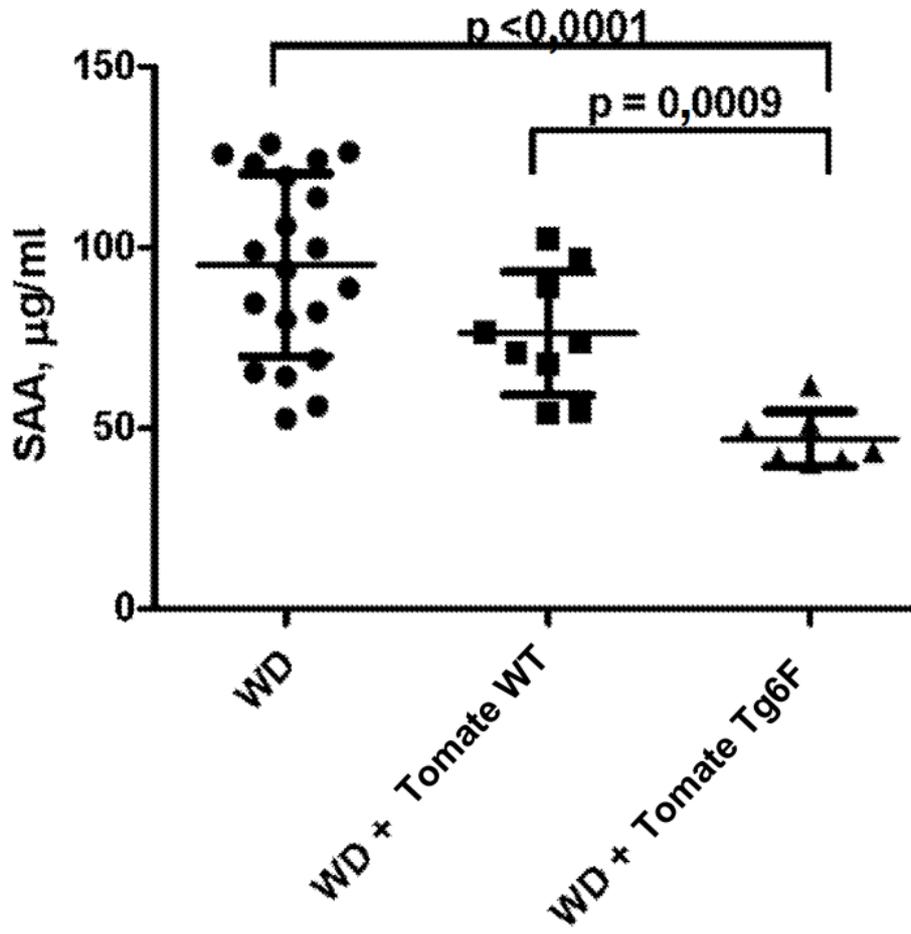


Fig. 19A

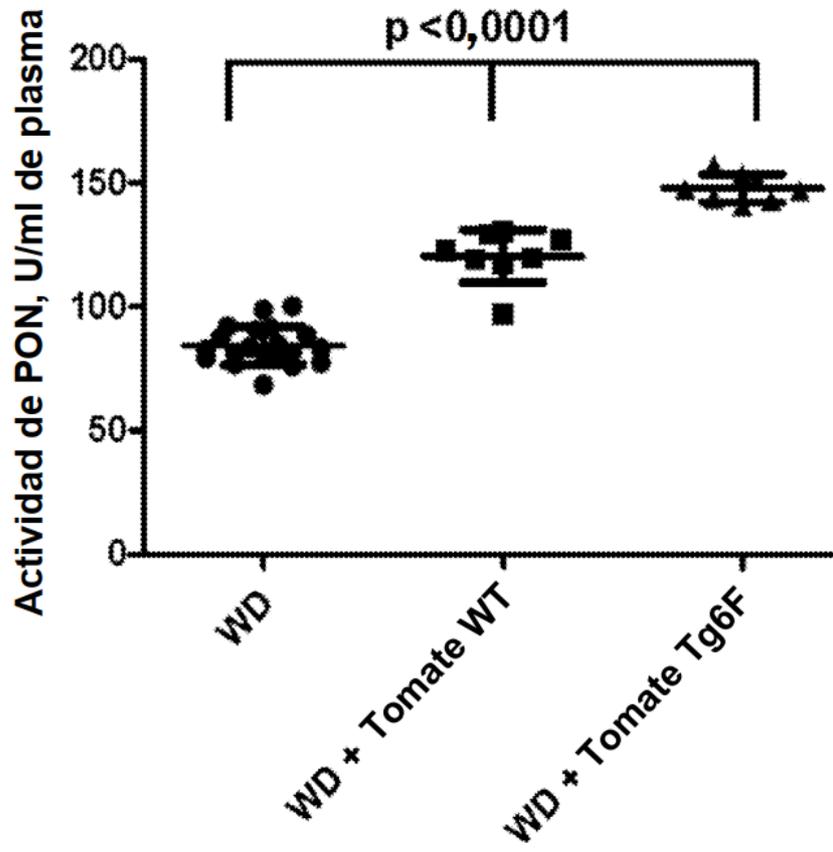


Fig. 19B

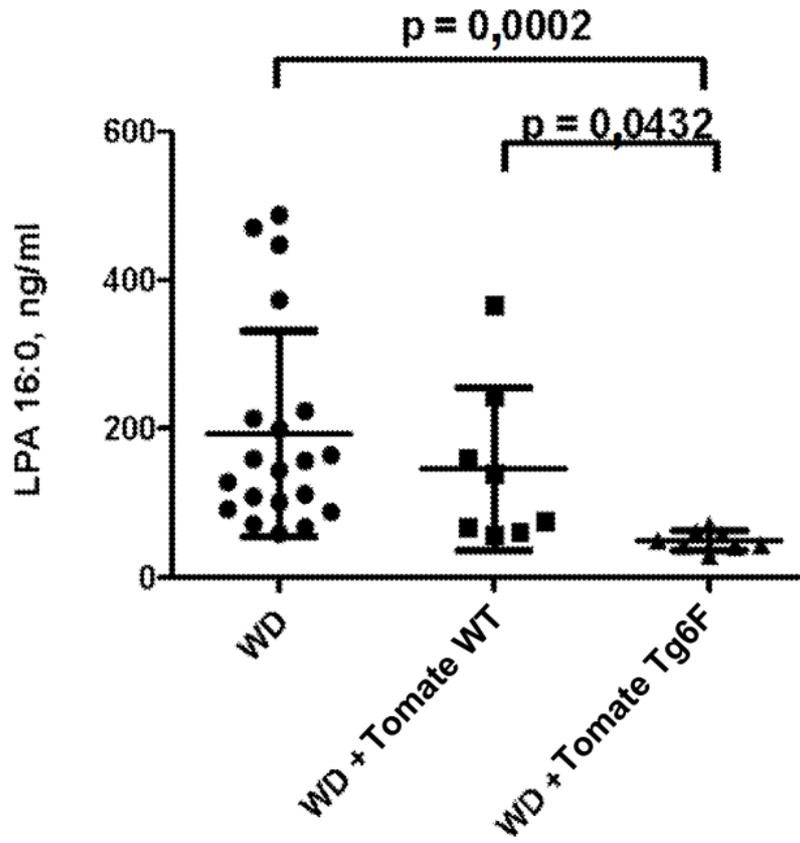


Fig. 19C

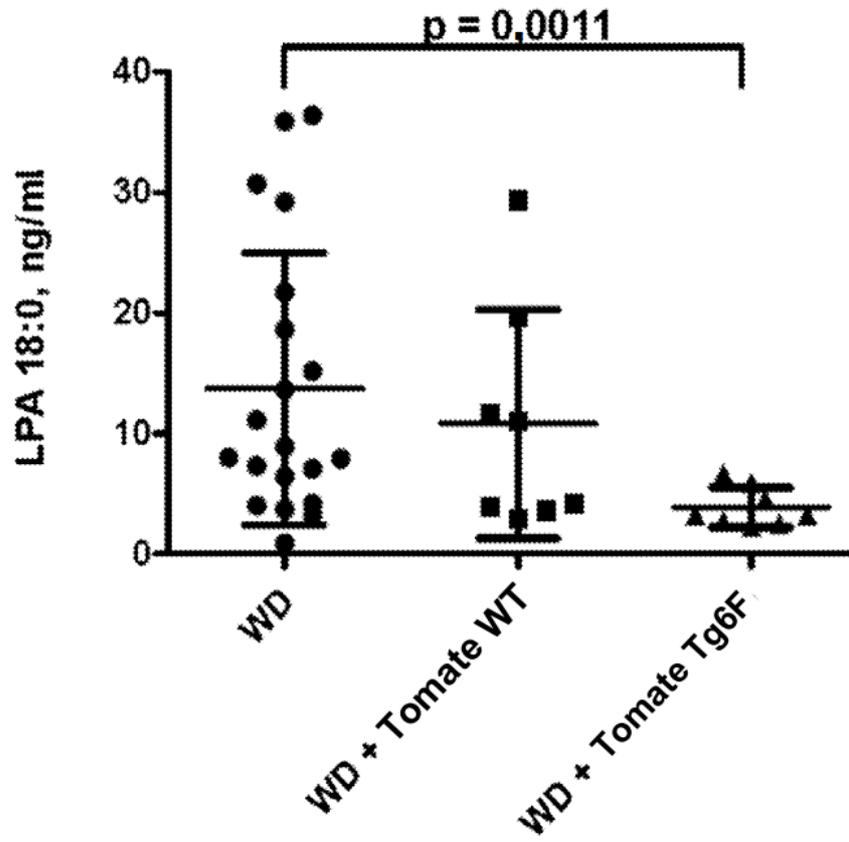


Fig. 19D

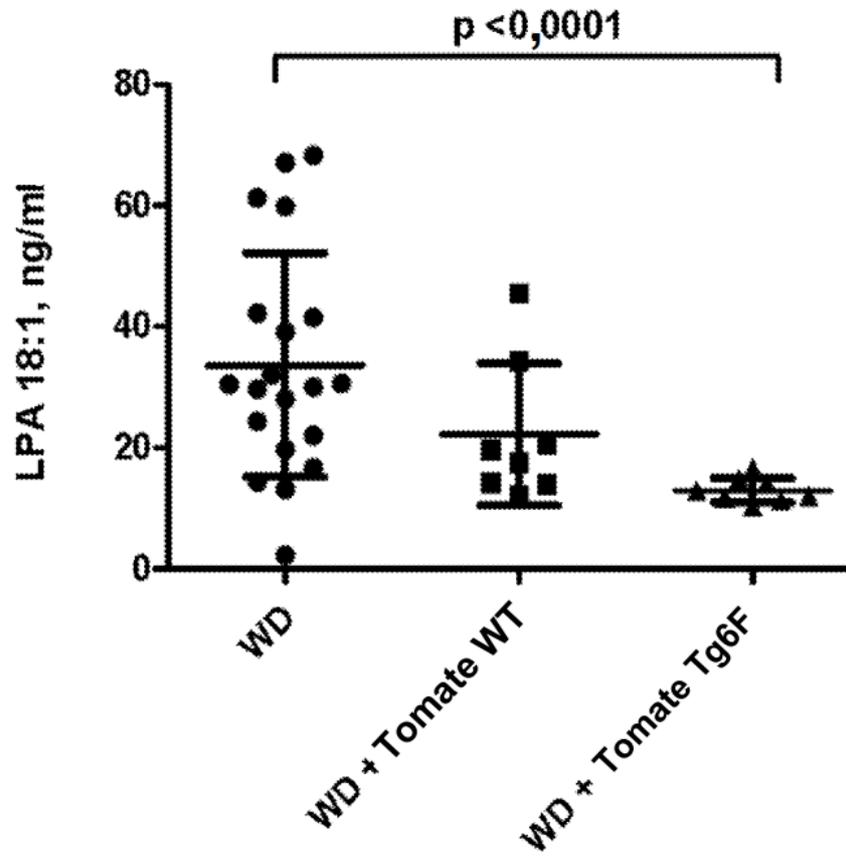


Fig. 19E

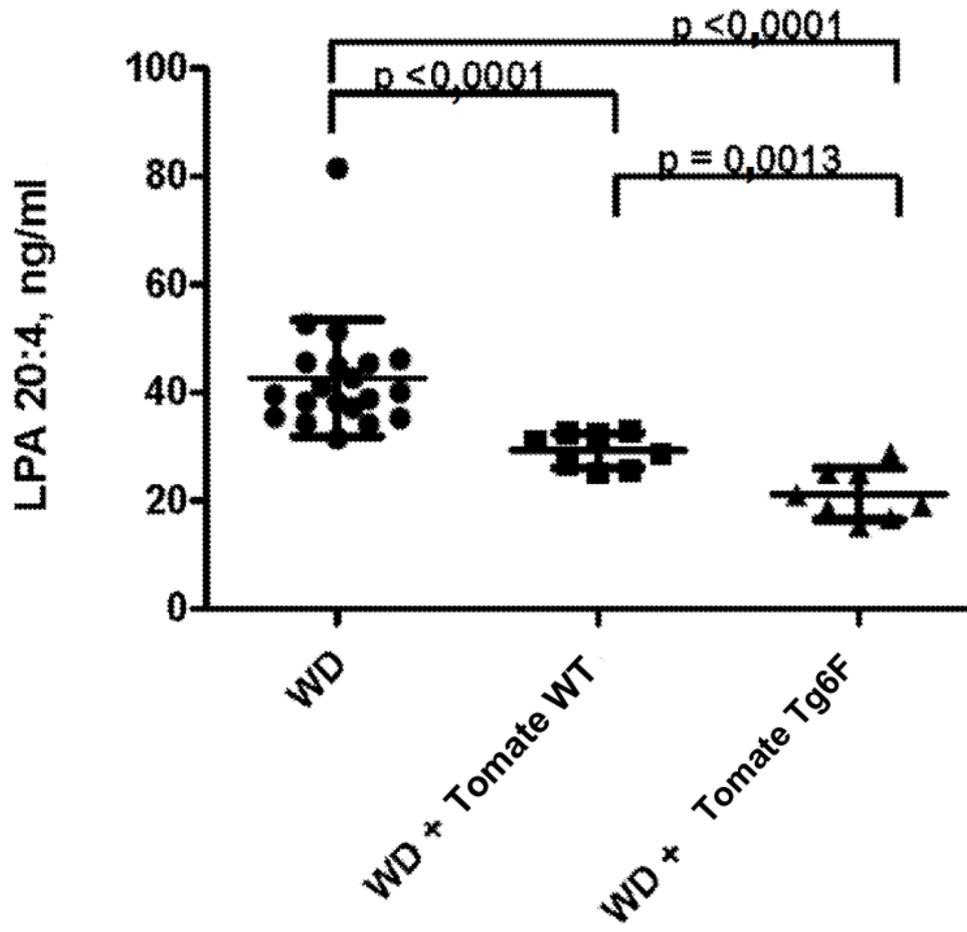


Fig. 19F

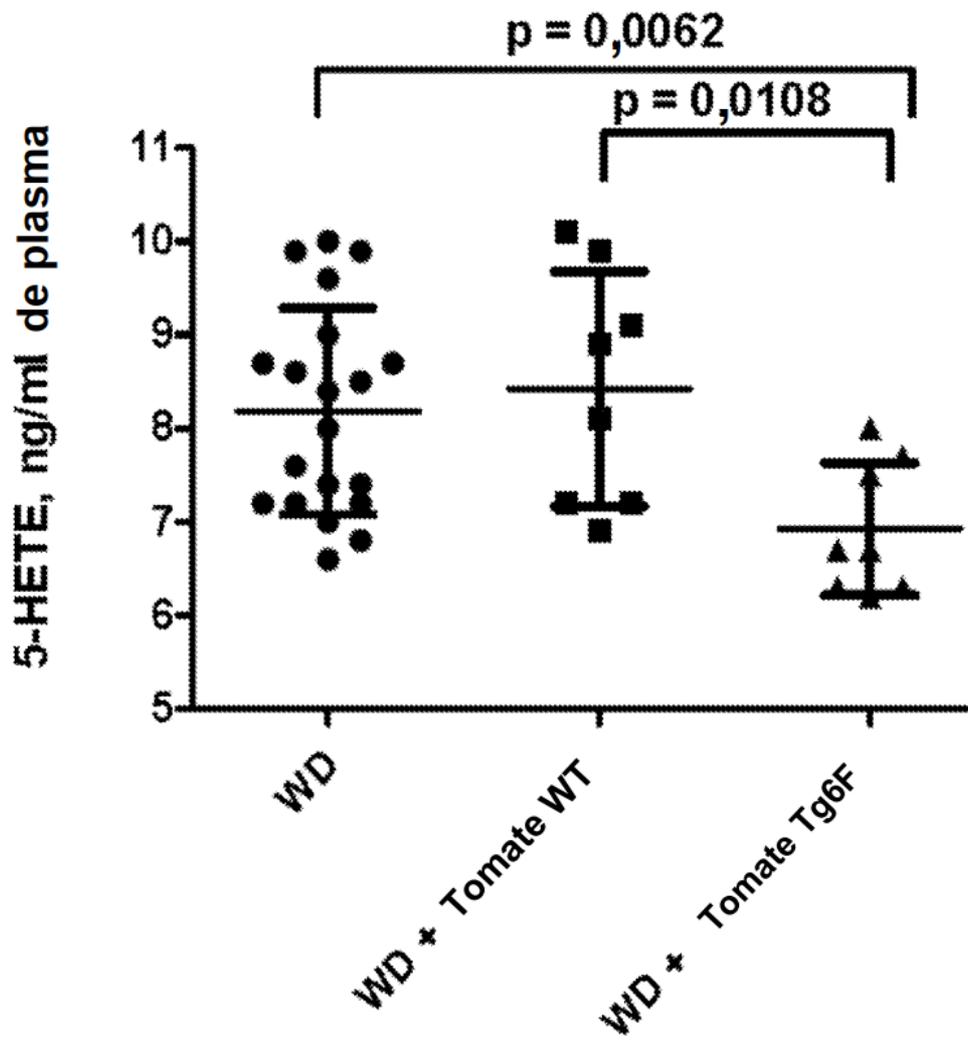


Fig. 19G

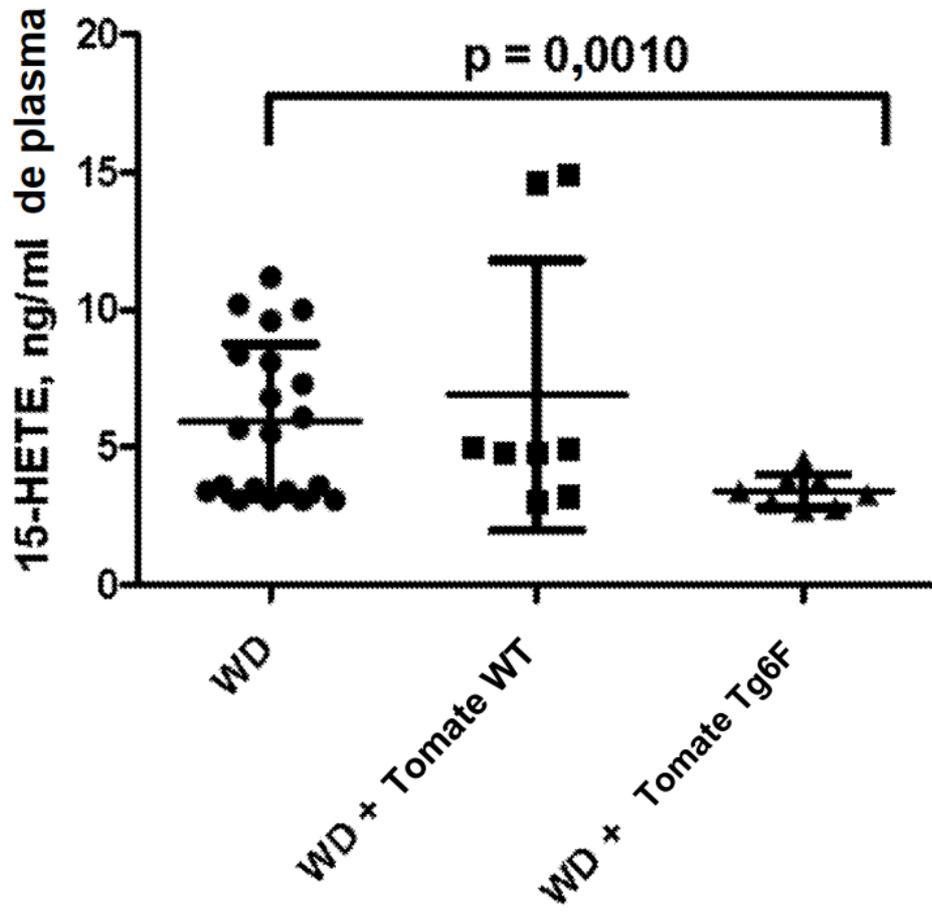


Fig. 19H

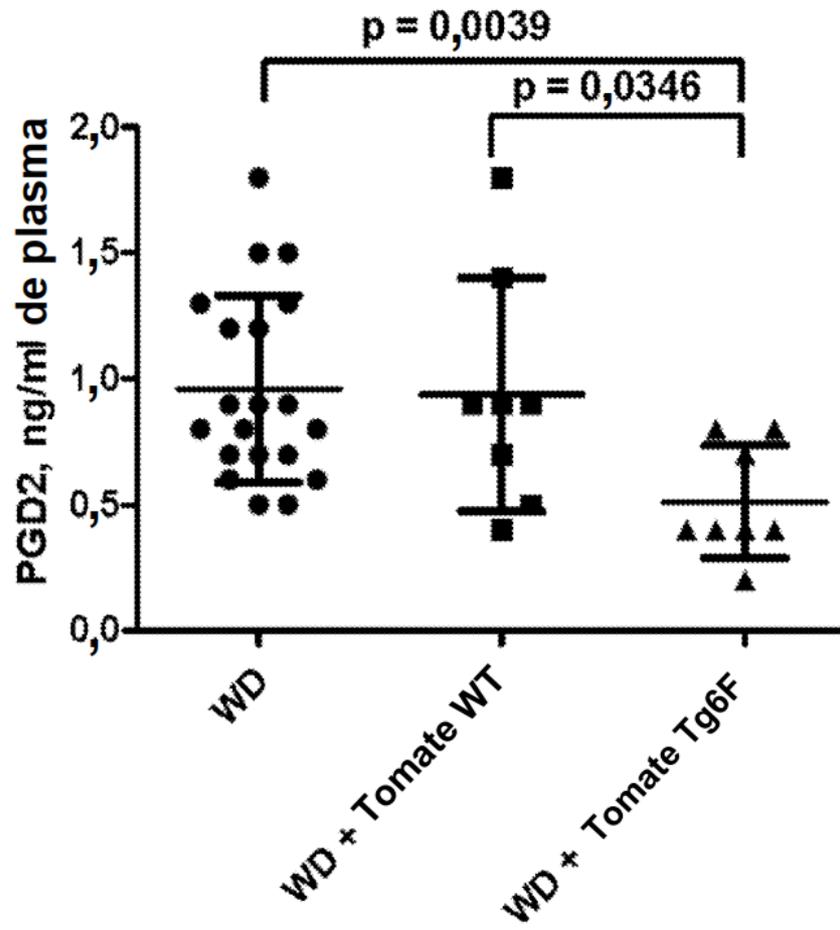


Fig. 19I

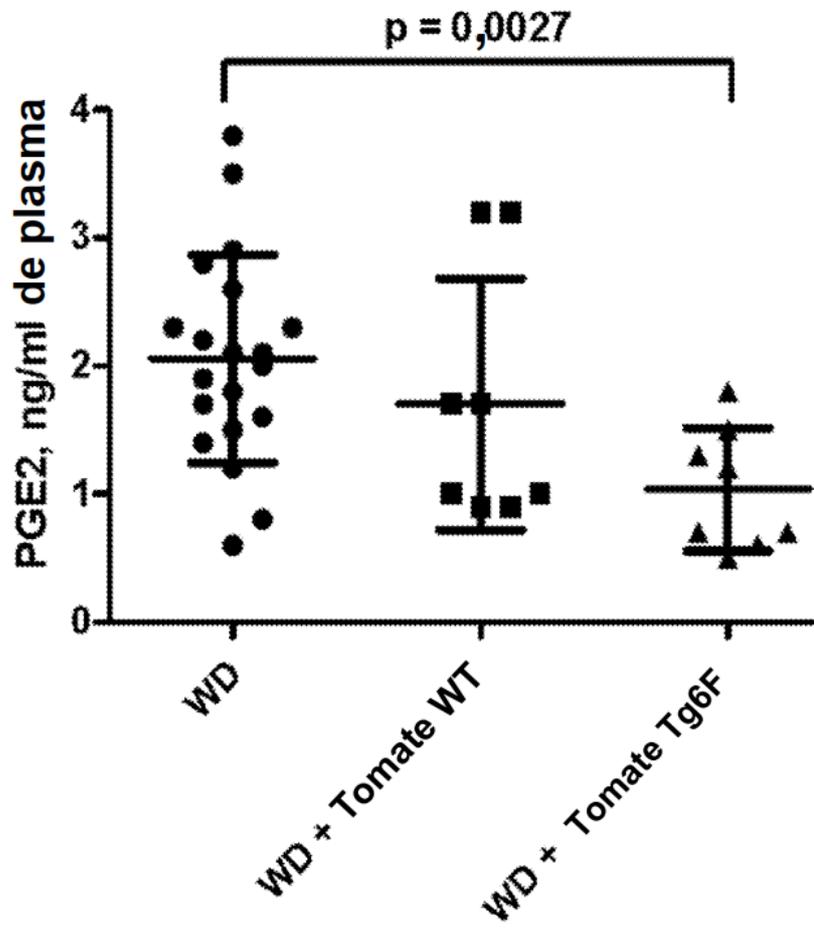


Fig. 19J

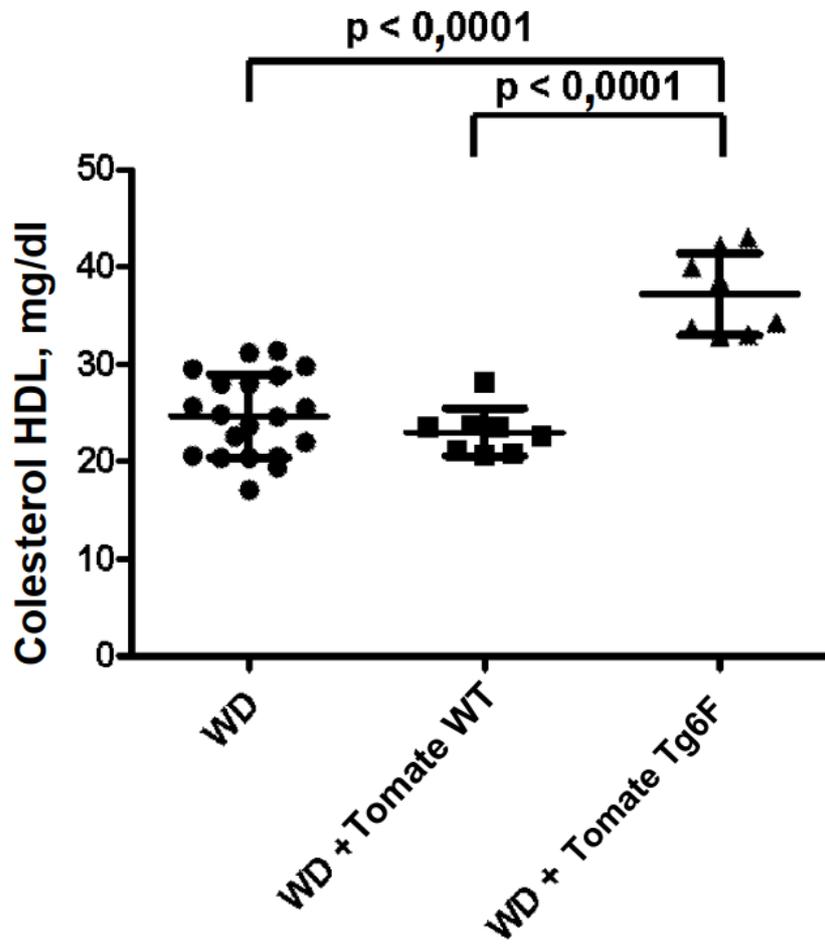


Fig. 19K

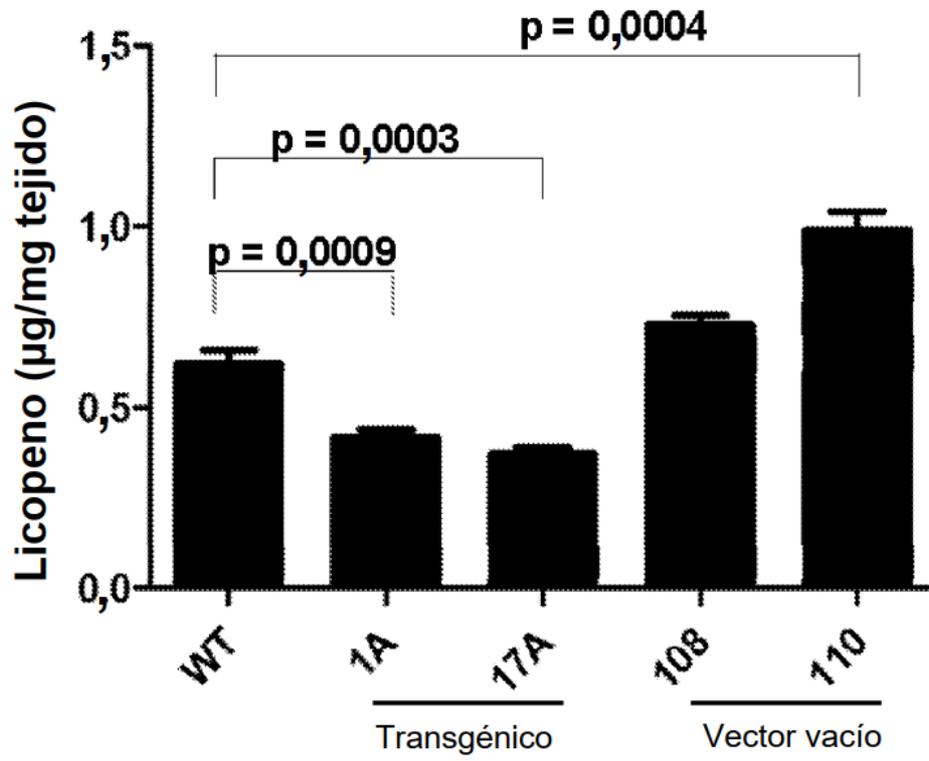


Fig. 20

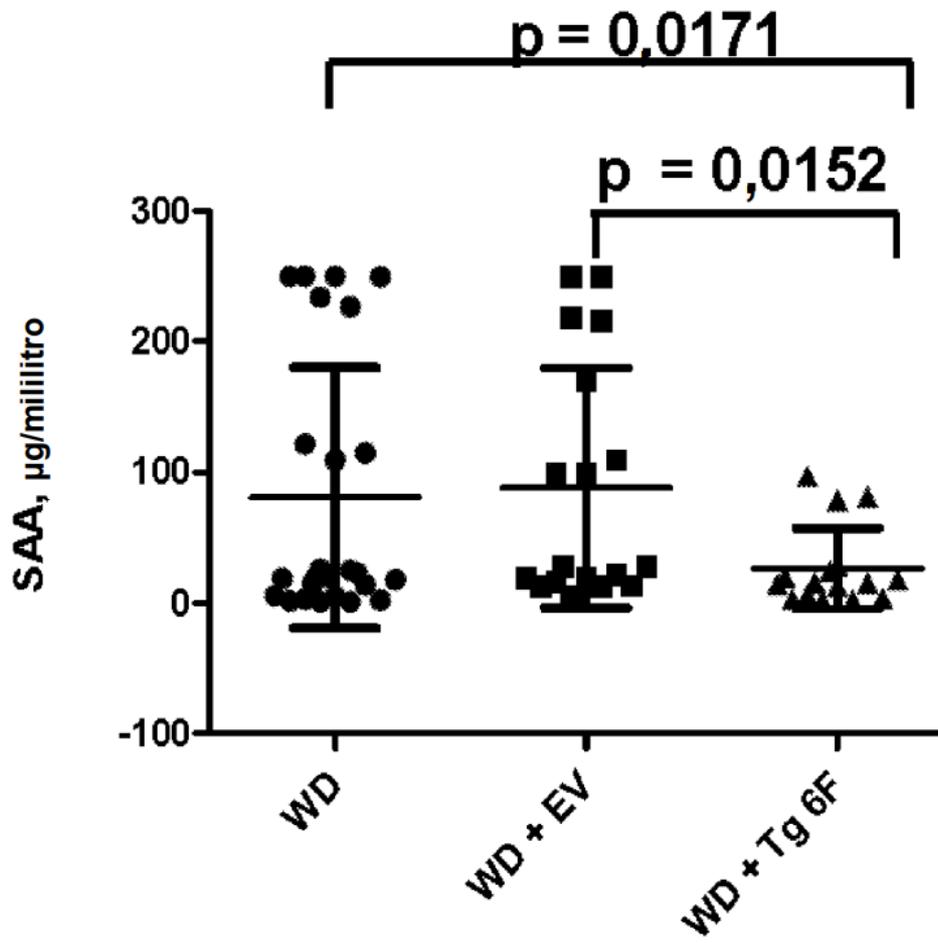


Fig. 21A

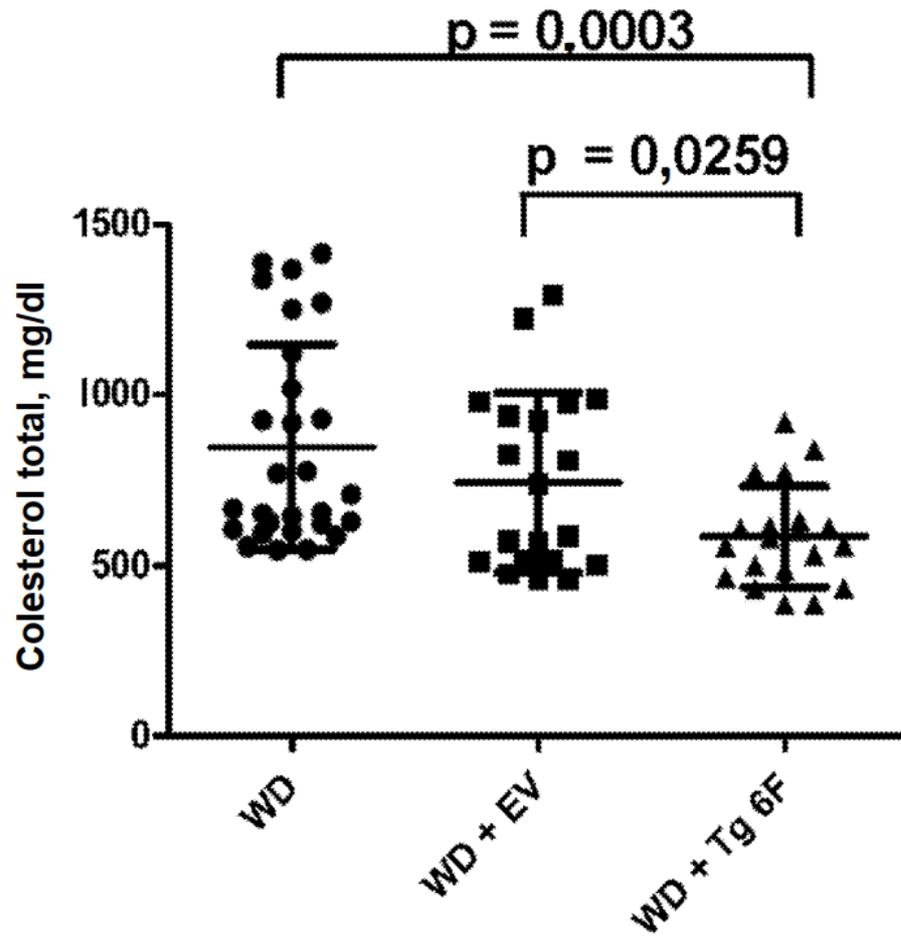


Fig. 21B

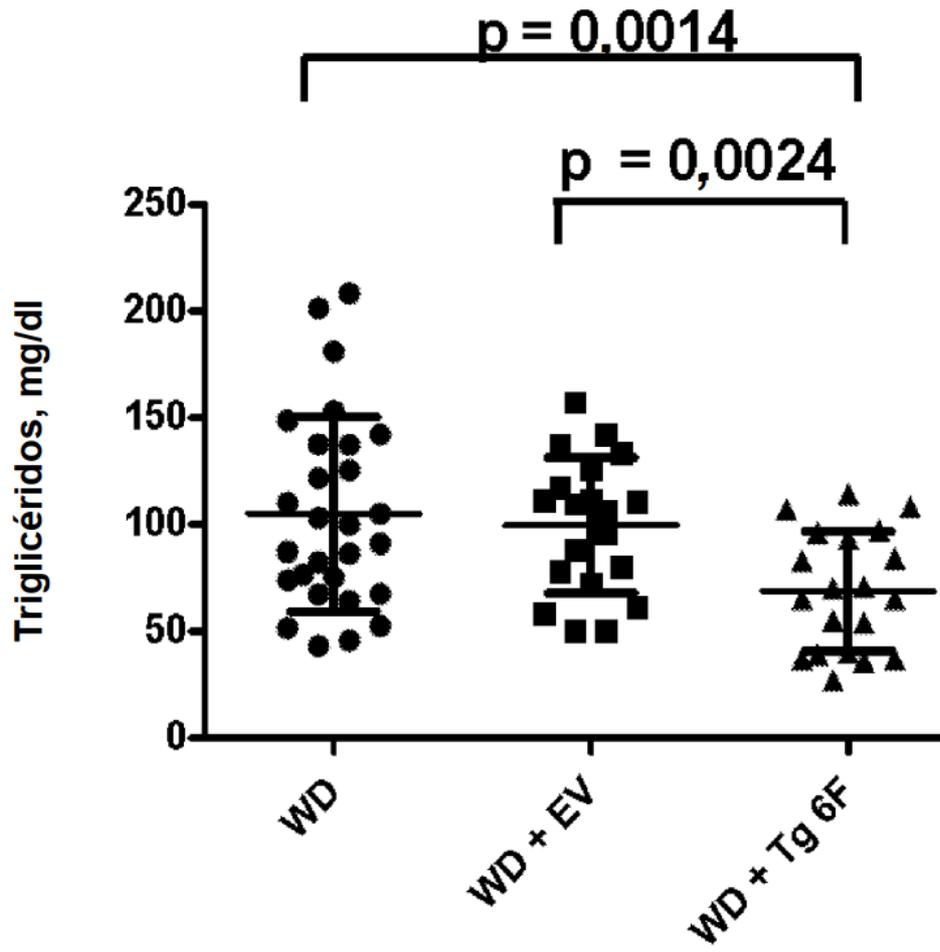


Fig. 21C

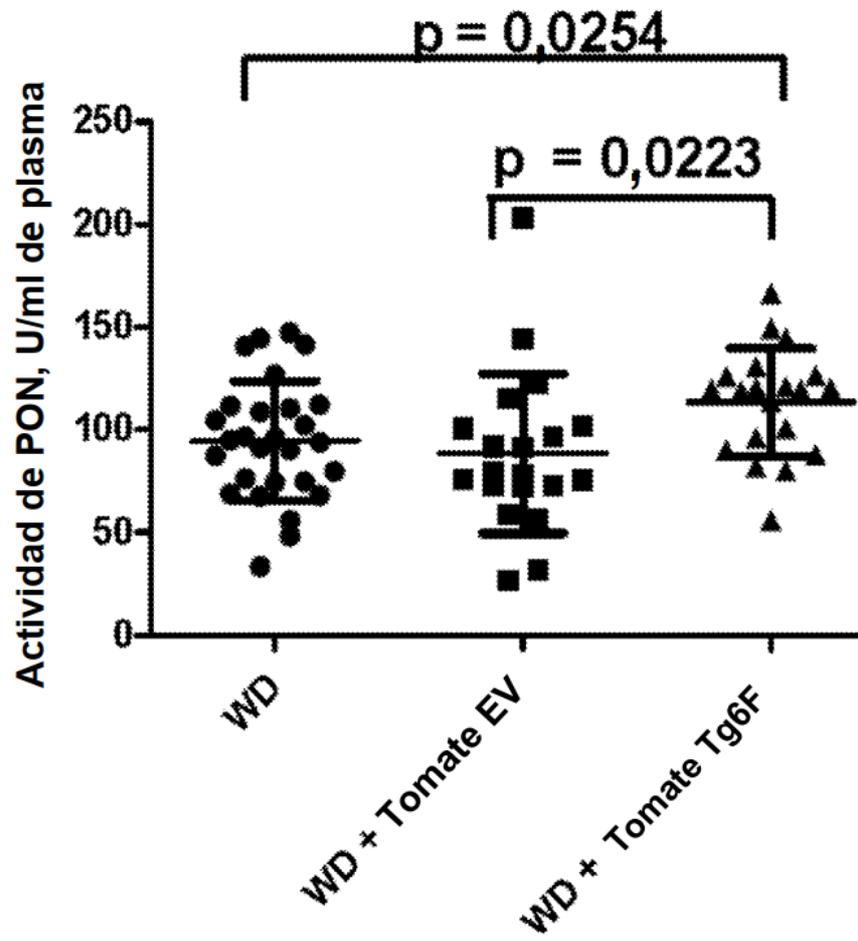


Fig. 21D

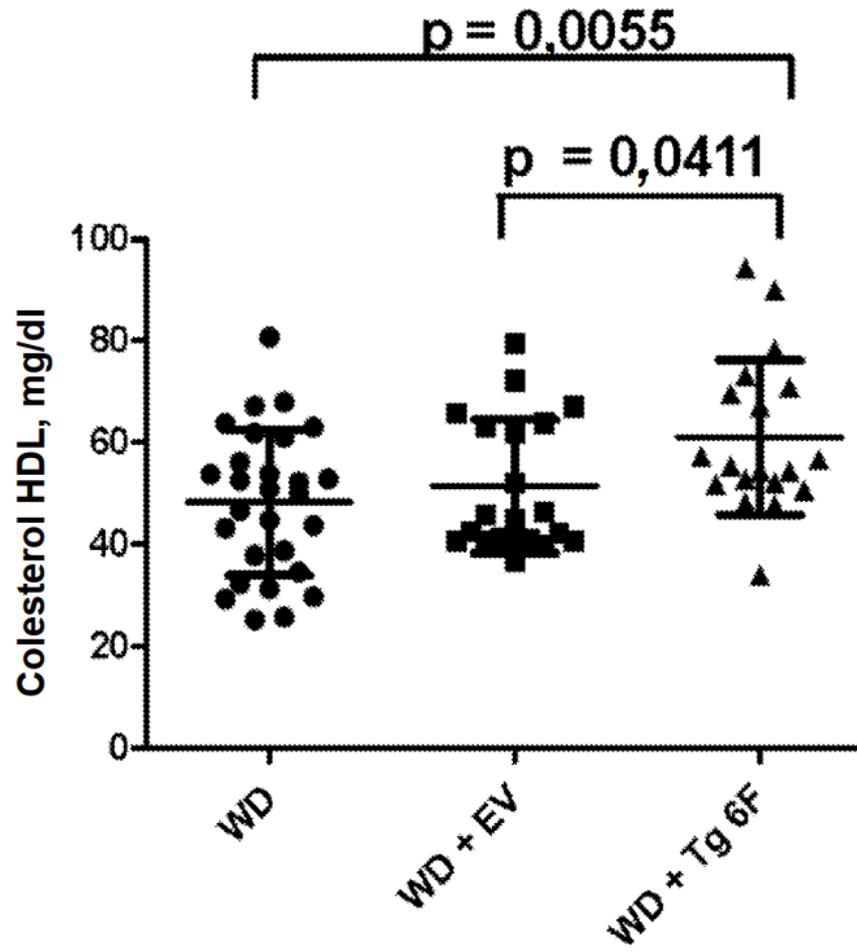


Fig. 21E

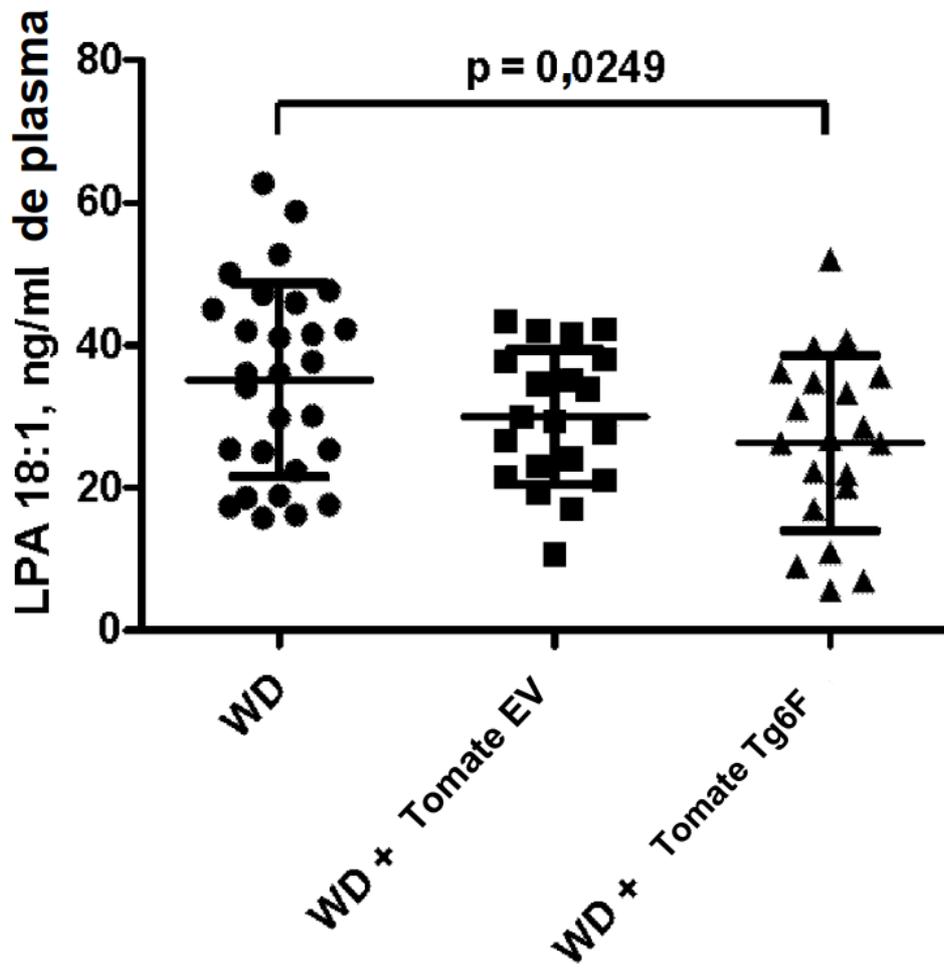


Fig. 21F

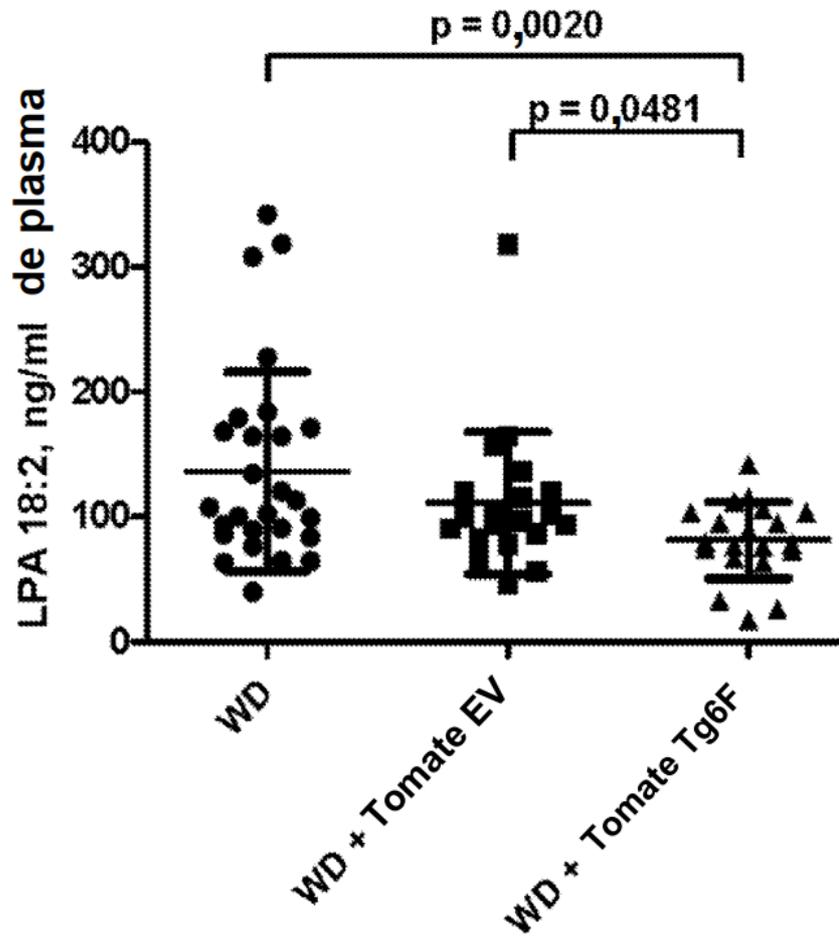


Fig. 21G

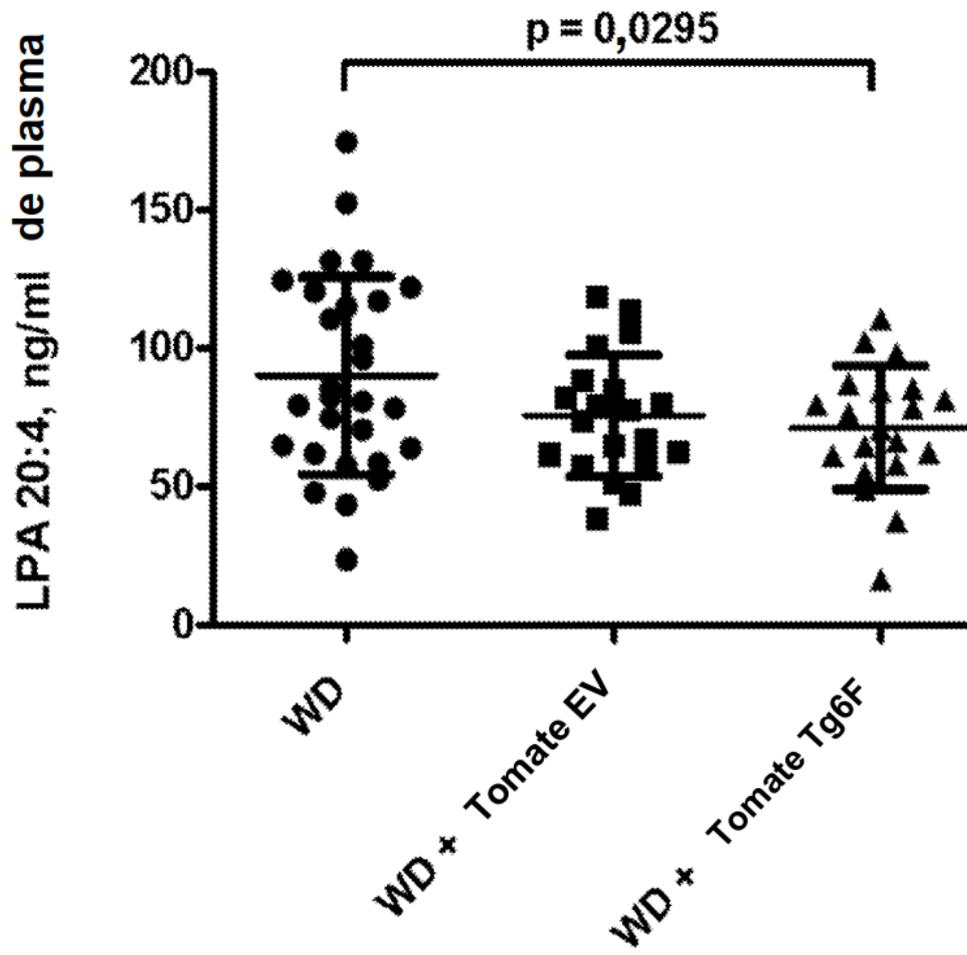


Fig. 21H

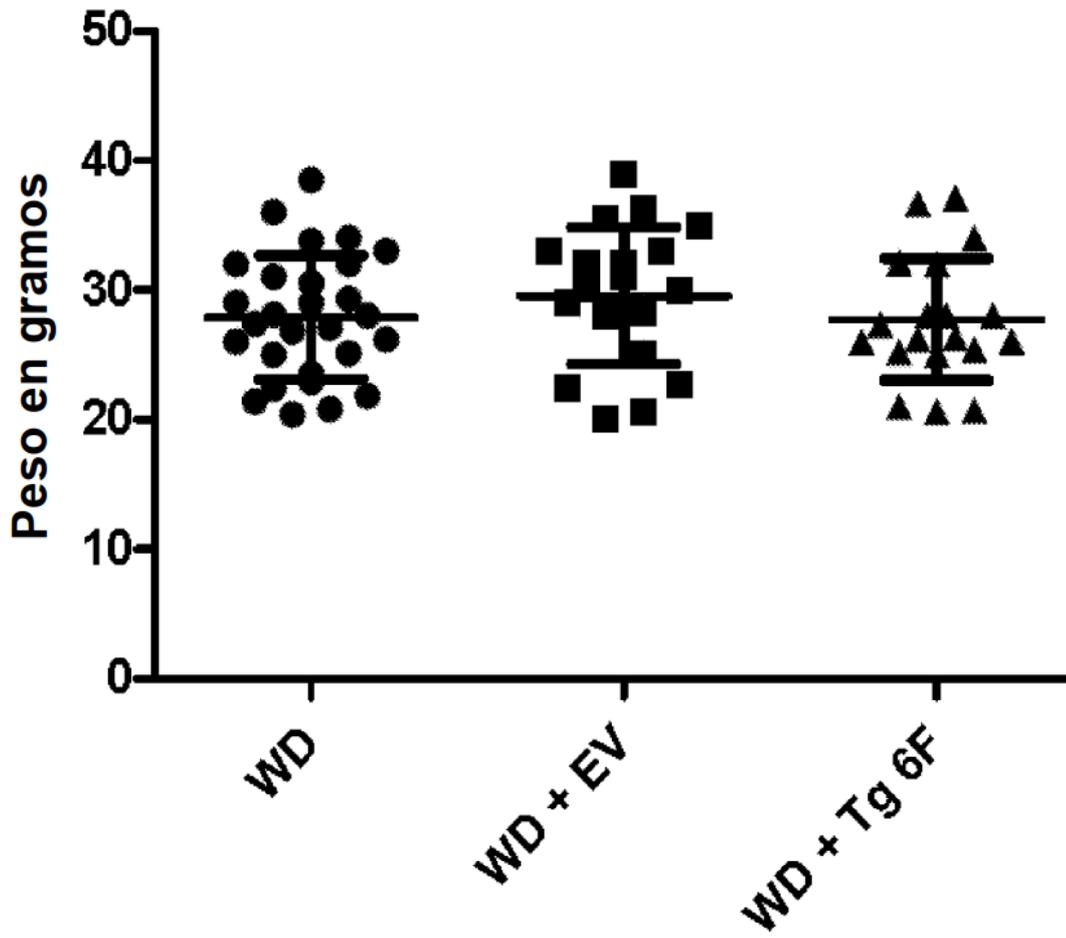


Fig. 211

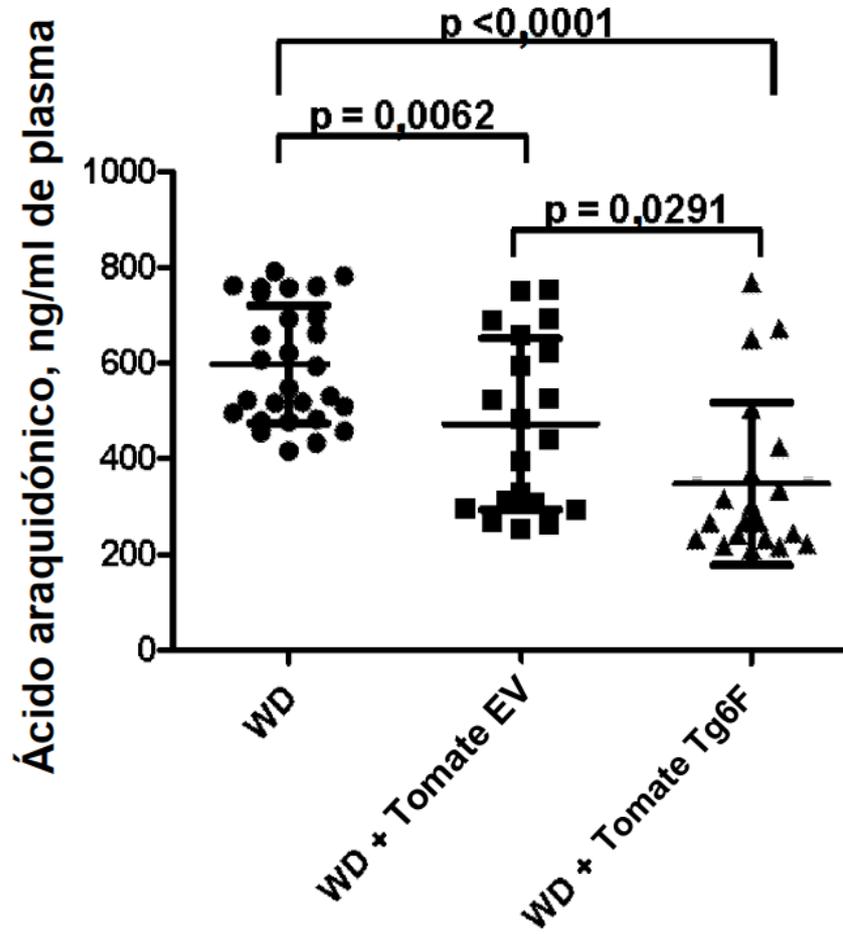


Fig. 22A

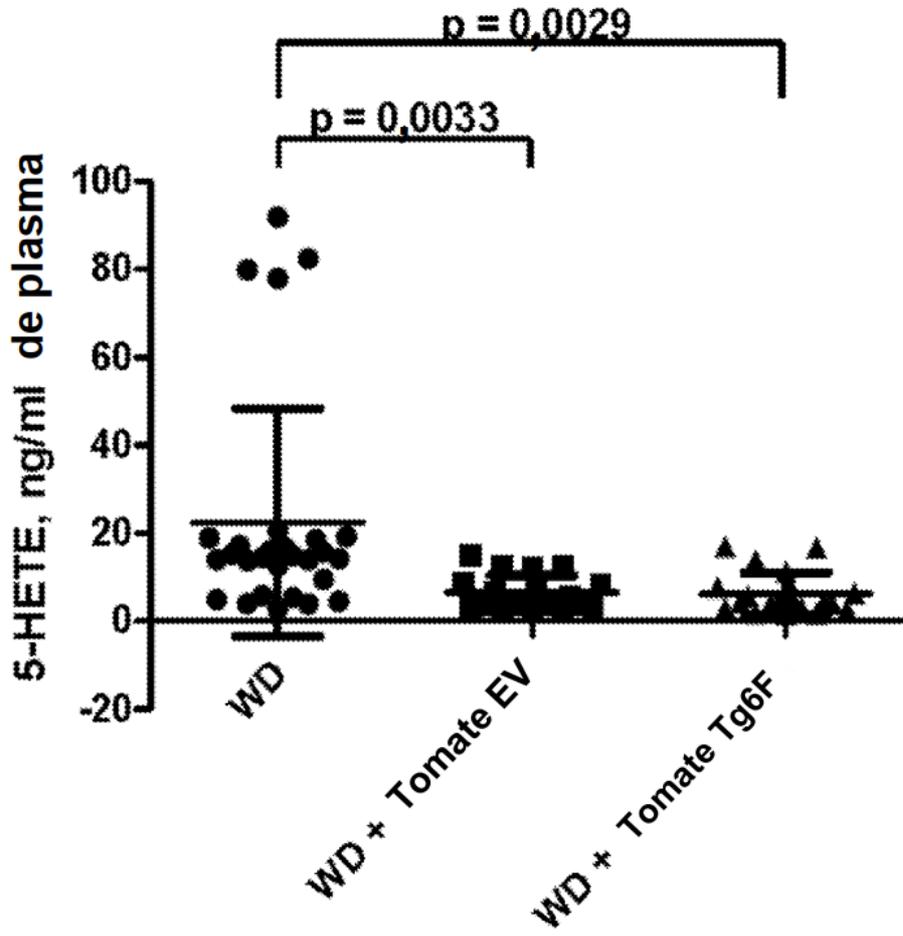


Fig. 22B

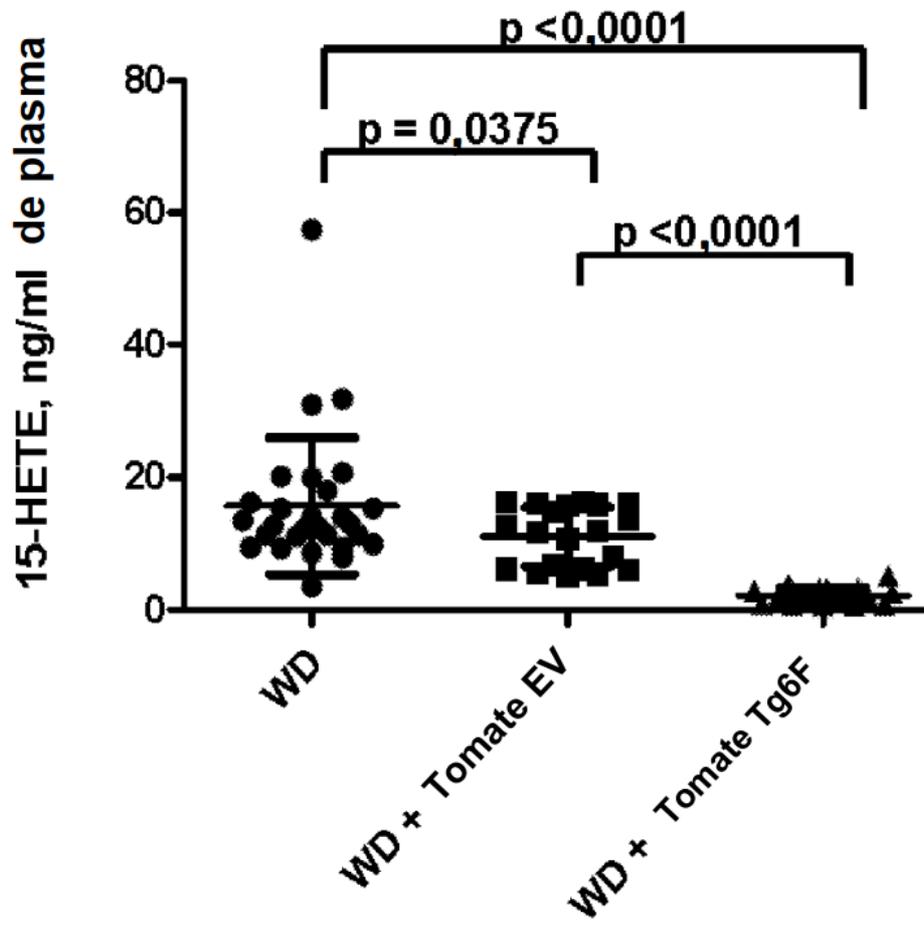


Fig. 22C

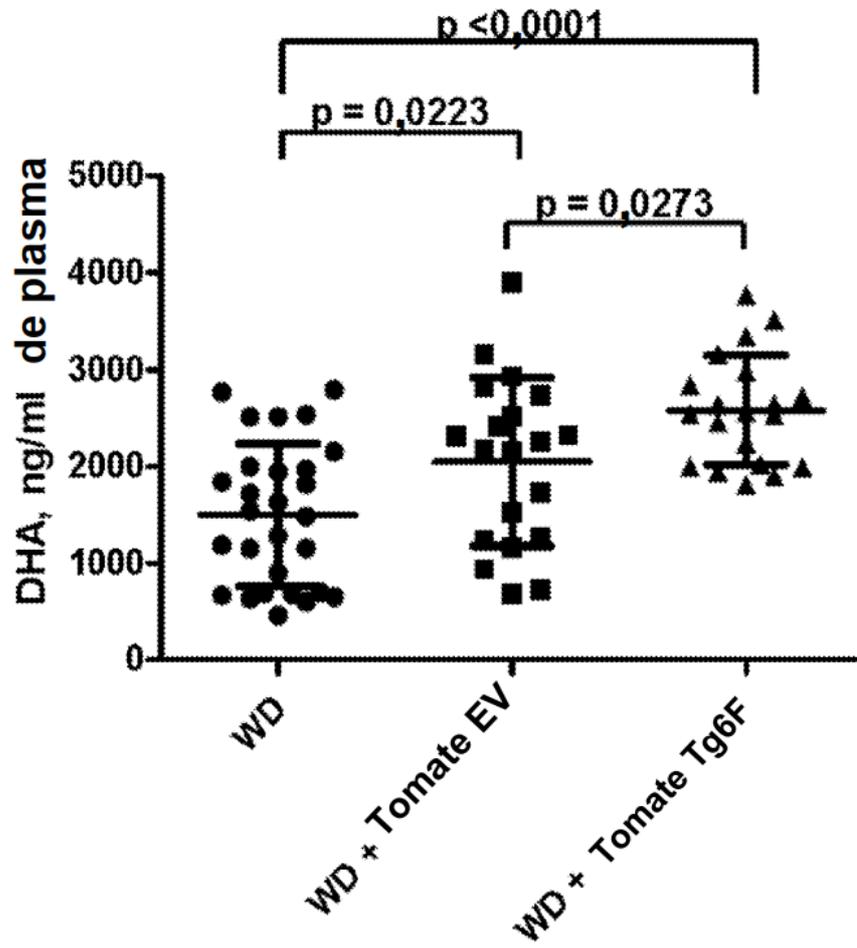


Fig. 22D

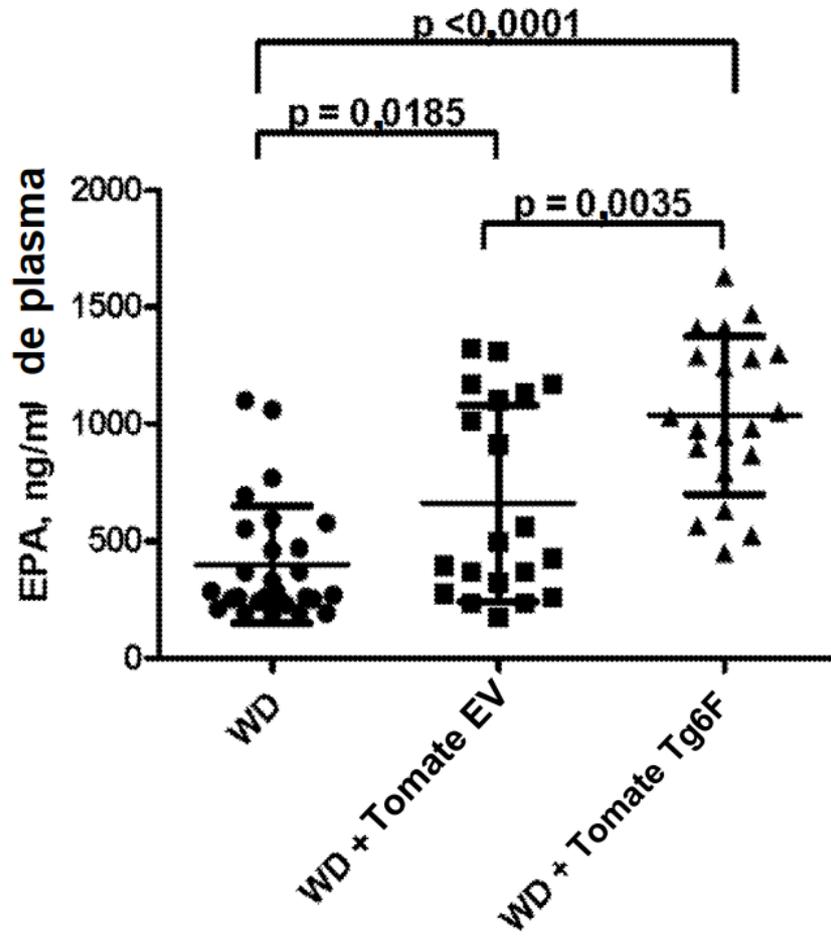


Fig. 22E

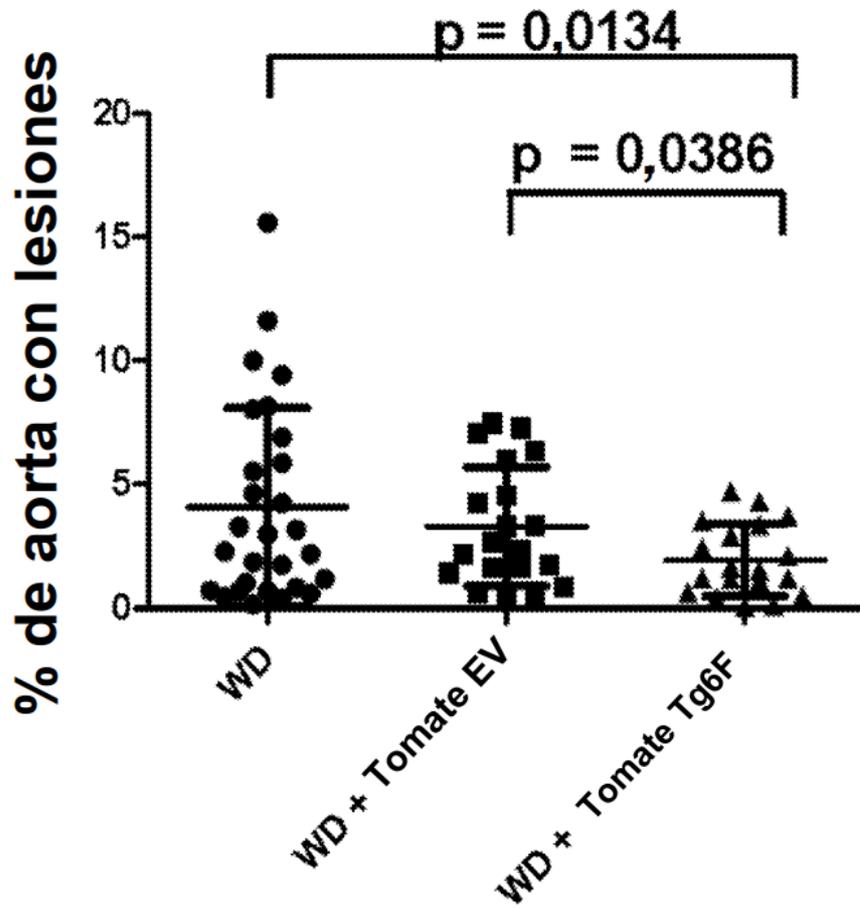


Fig. 23

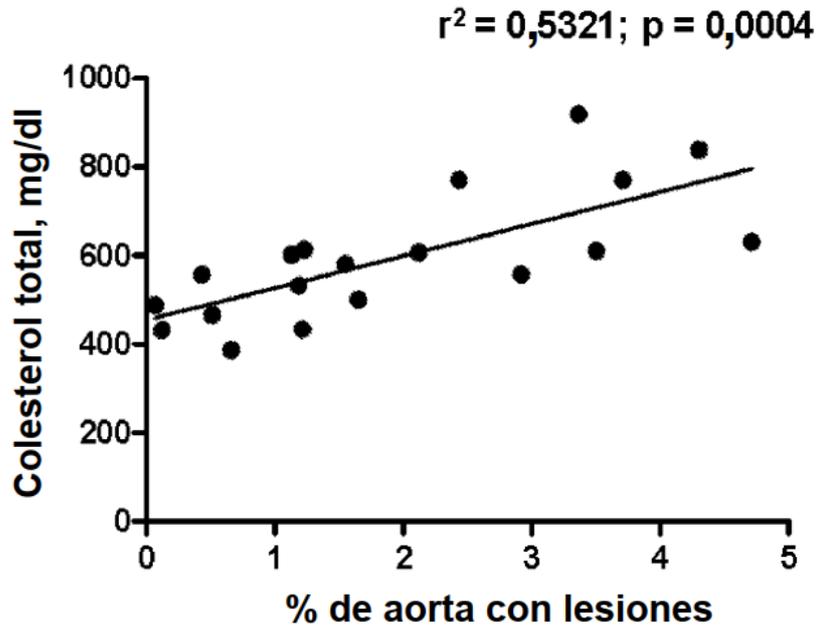


Fig. 24A

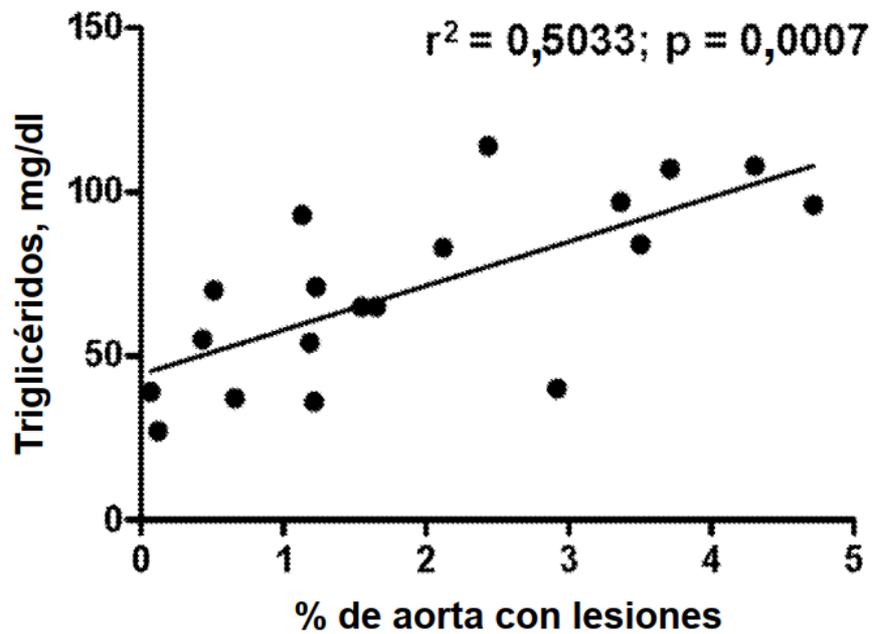


Fig. 24B

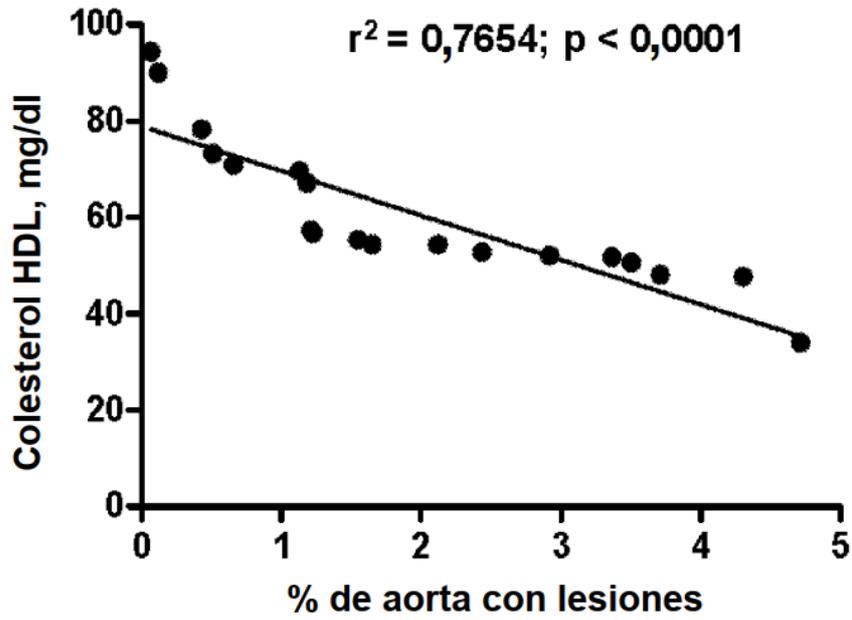


Fig. 24C

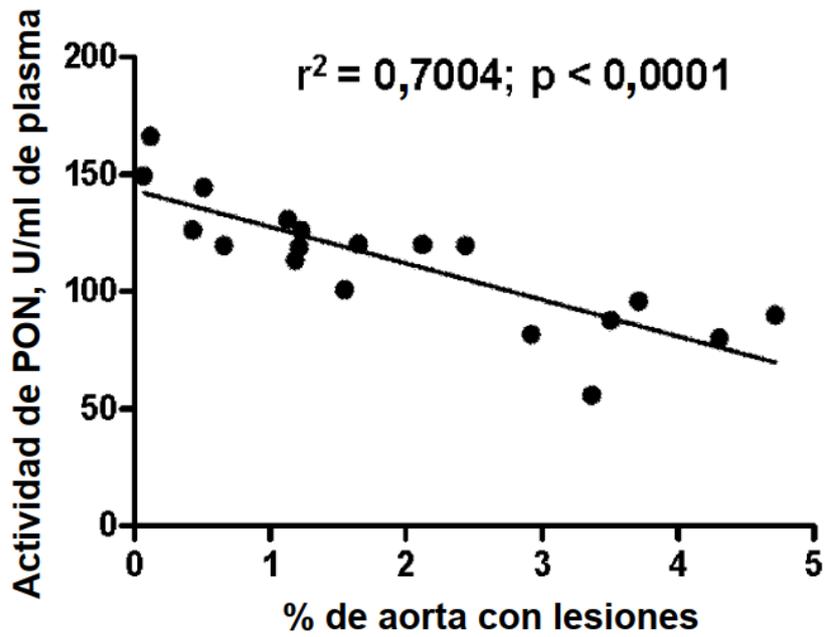


Fig. 24D

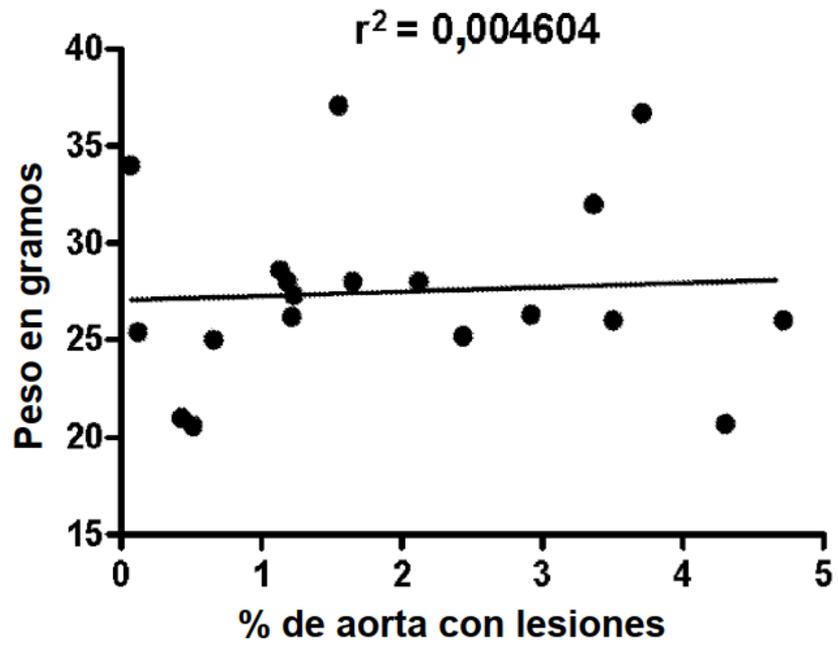


Fig. 24E

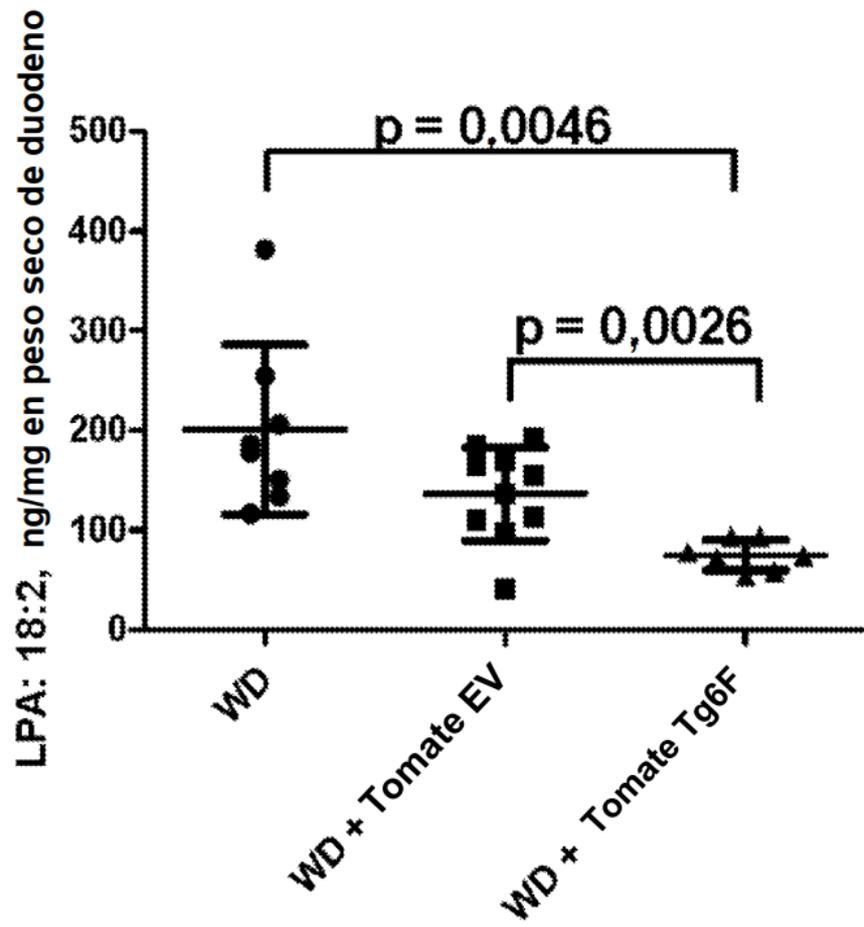


Fig. 25A

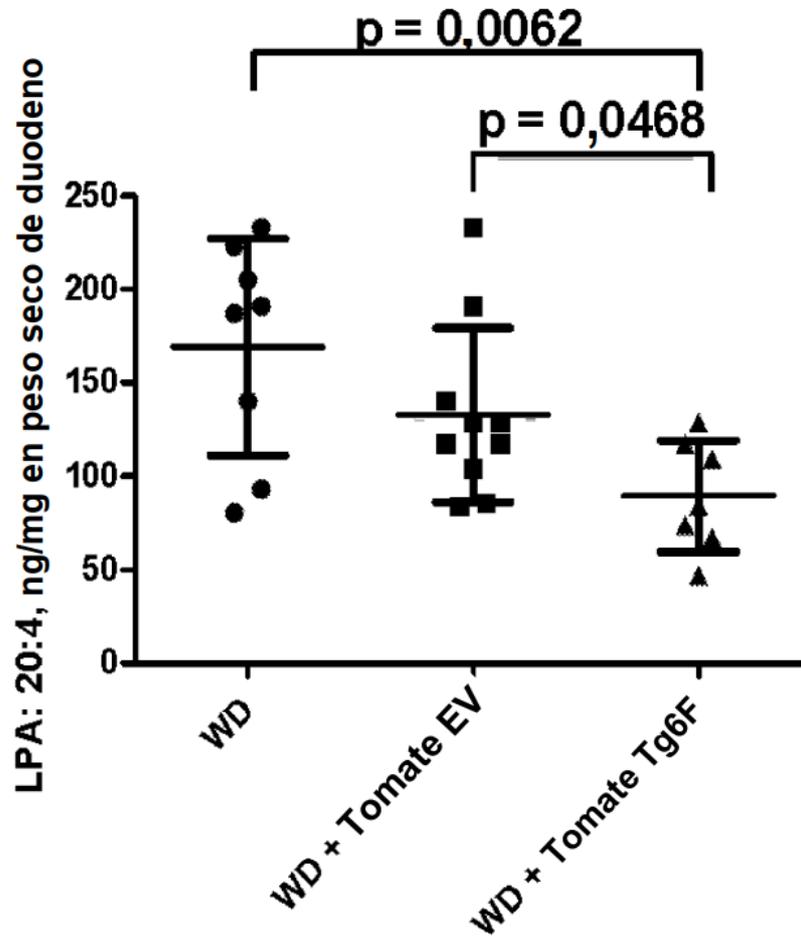


Fig. 25B

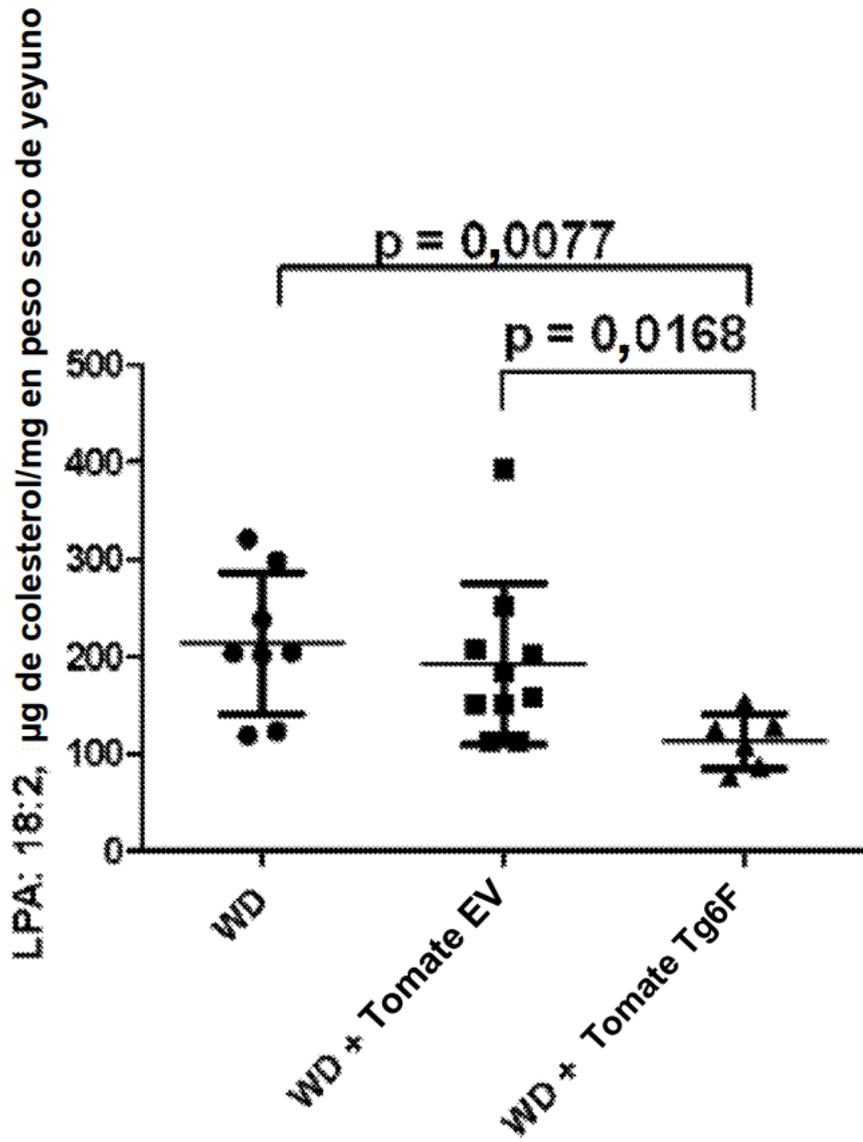


Fig. 25C

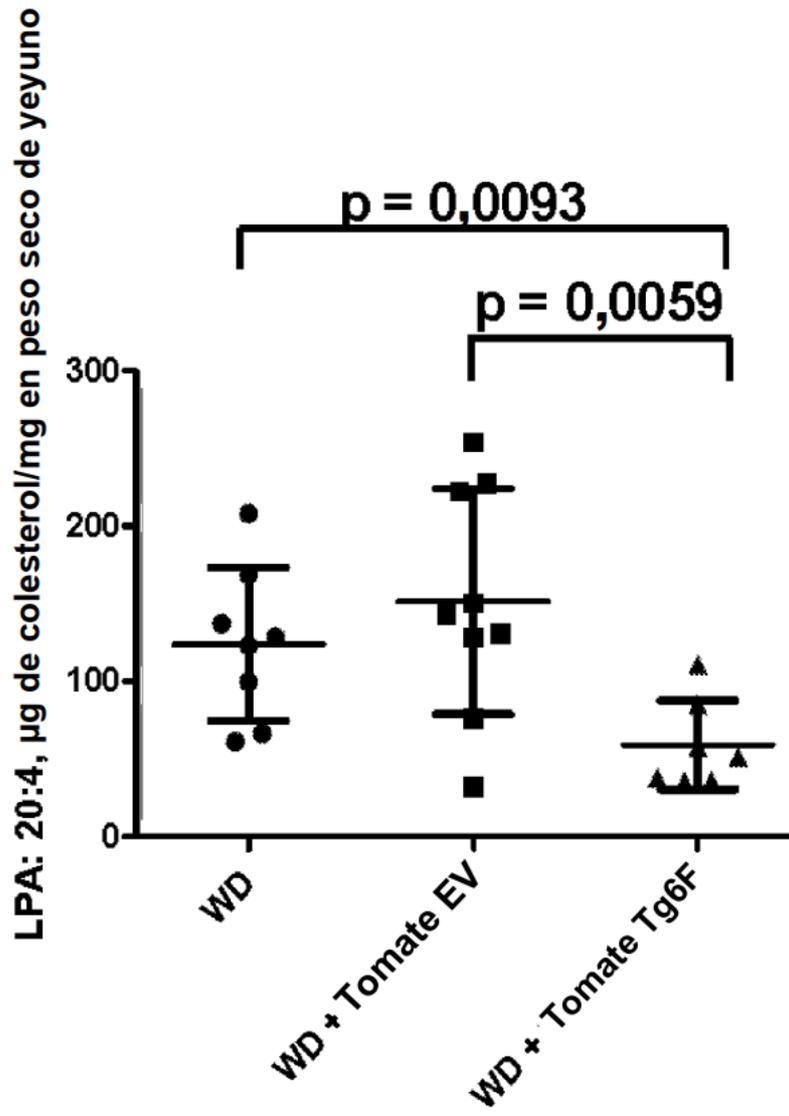


Fig. 25D

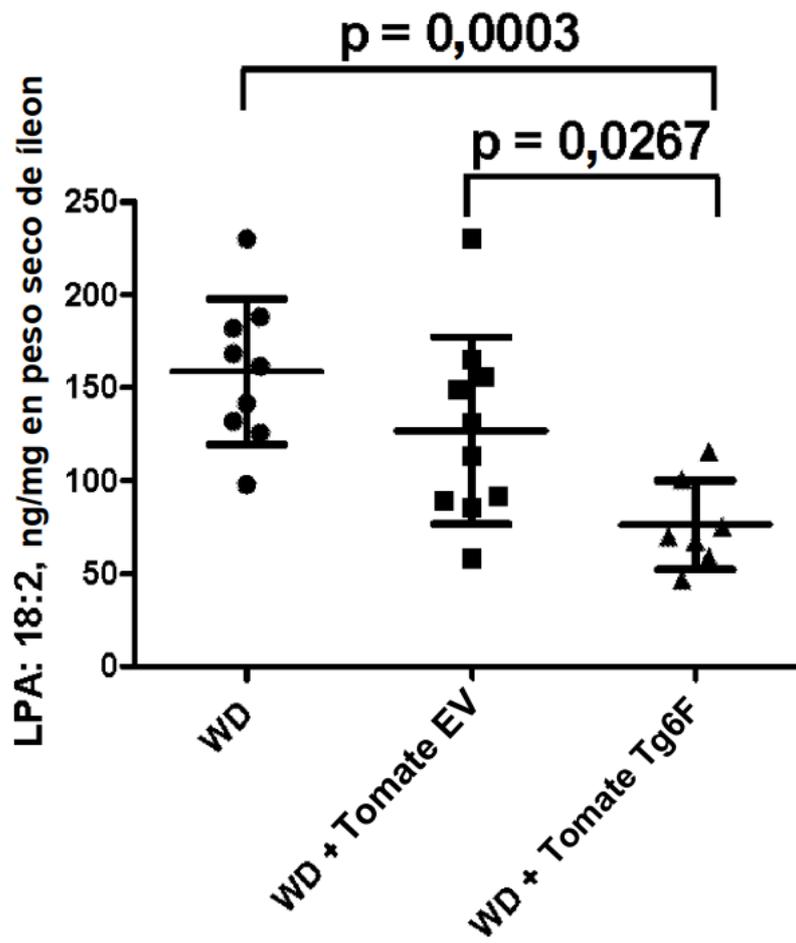


Fig. 25E

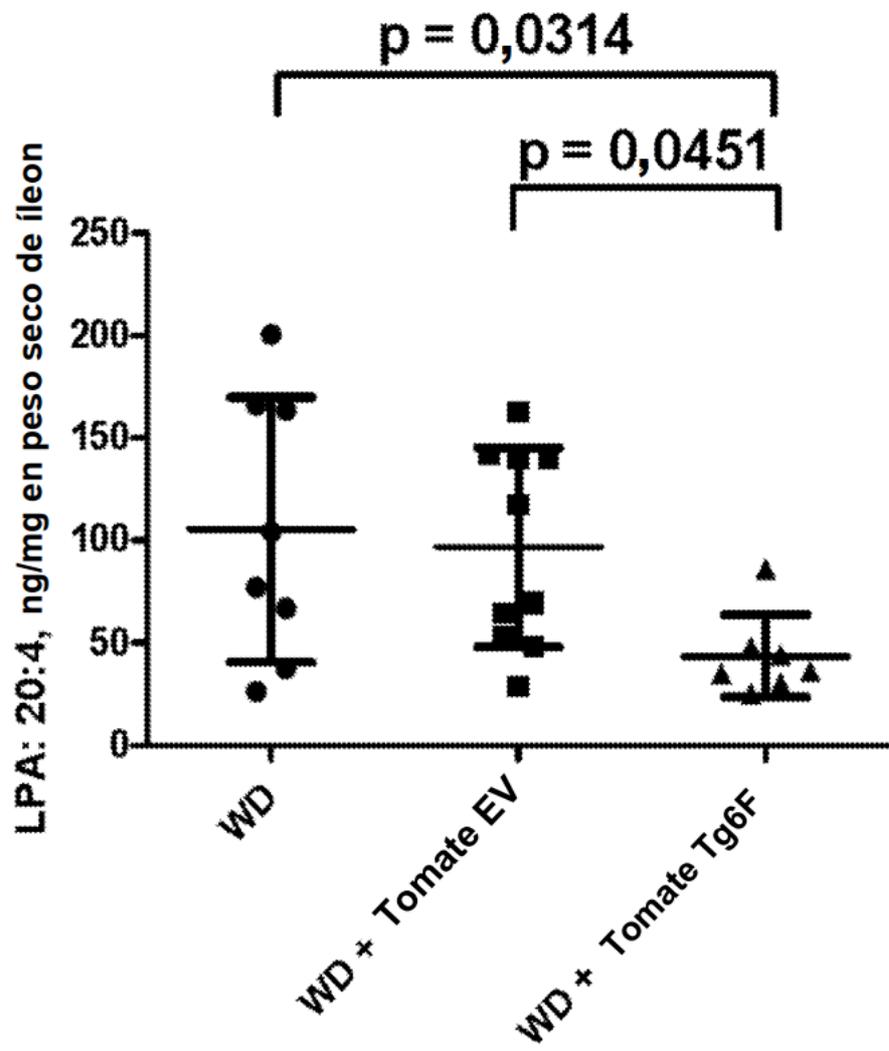


Fig. 25F

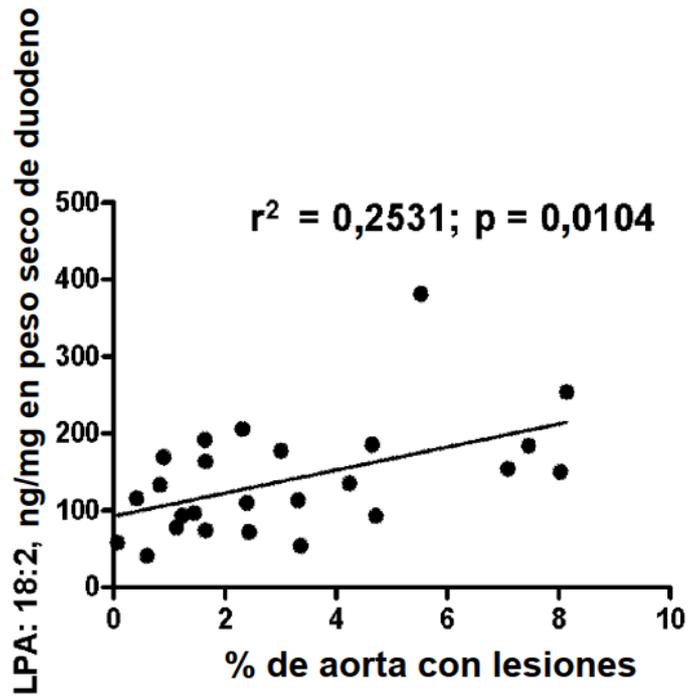


Fig. 26A

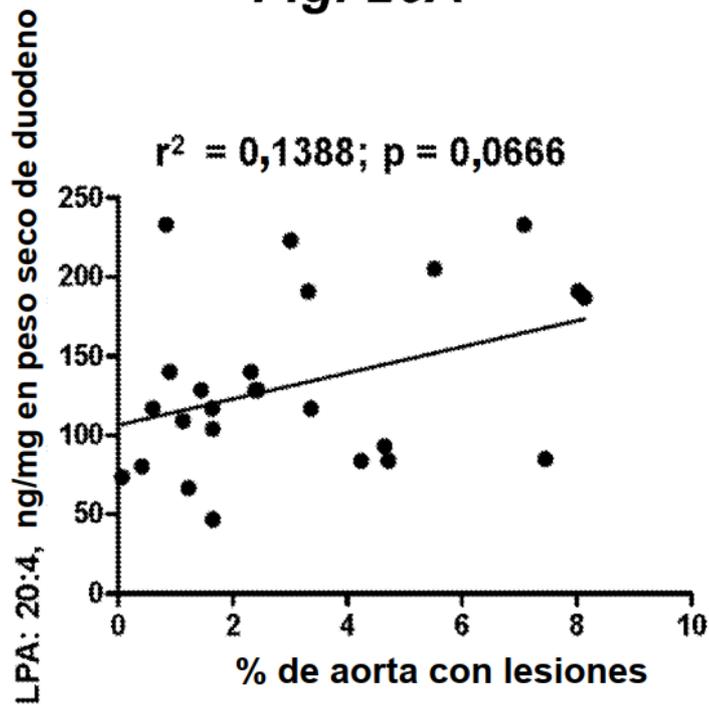


Fig. 26B

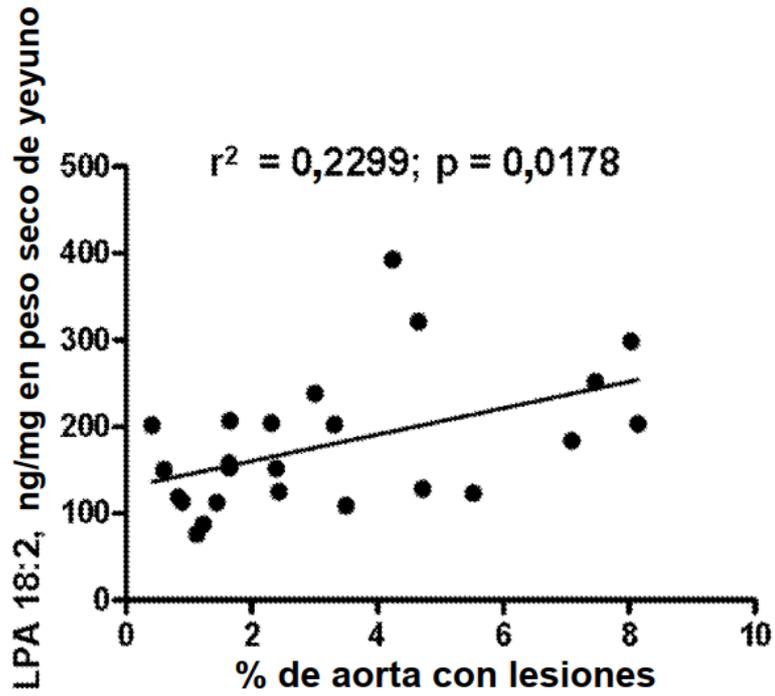


Fig. 26C

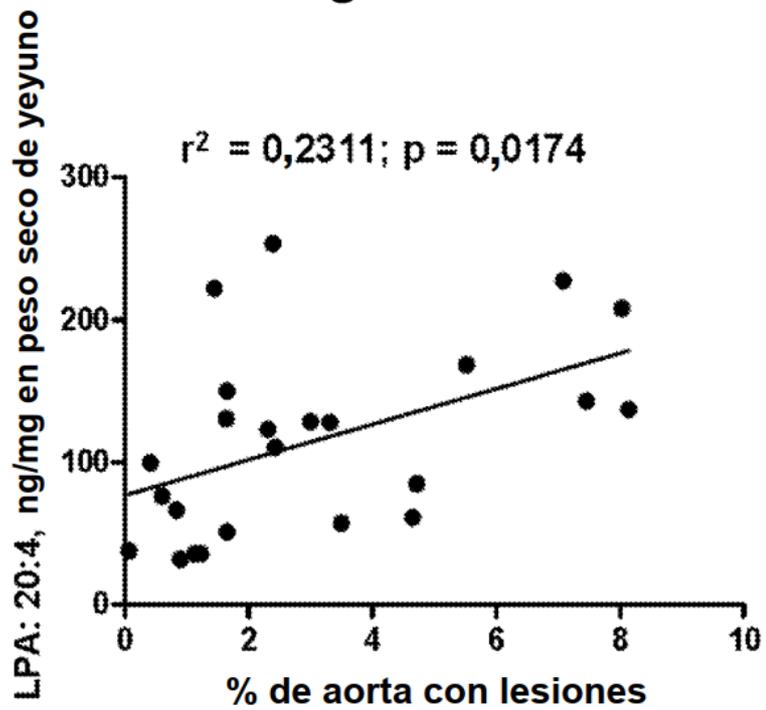


Fig. 26D

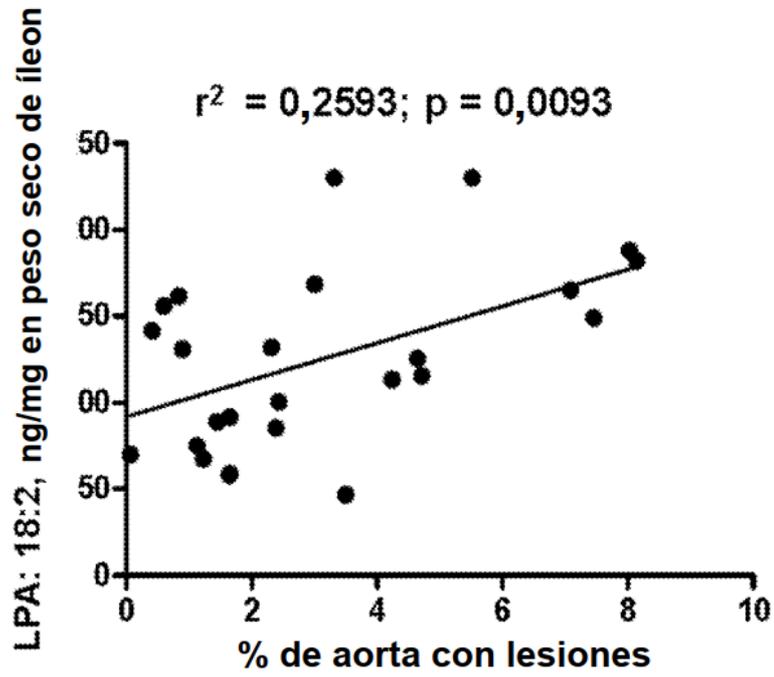


Fig. 26E

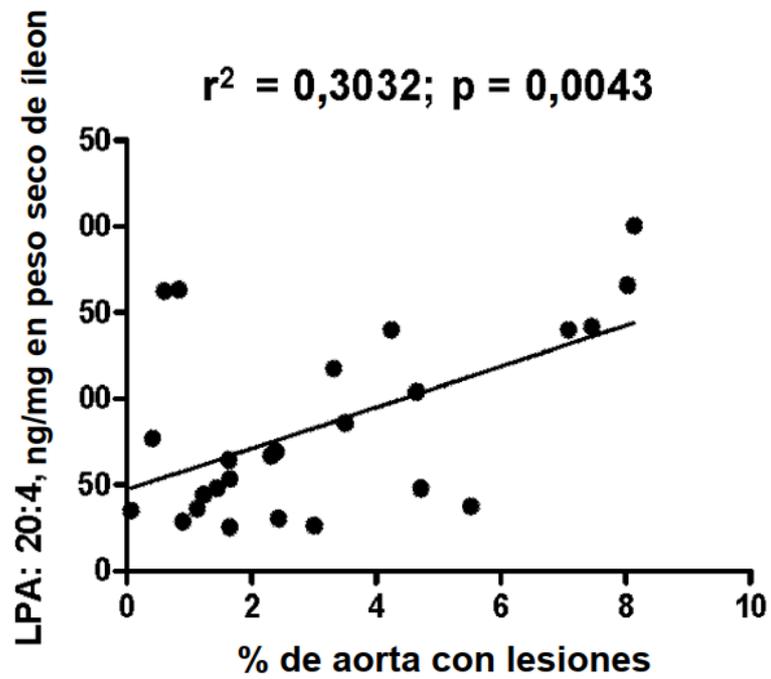


Fig. 26F



Fig. 27

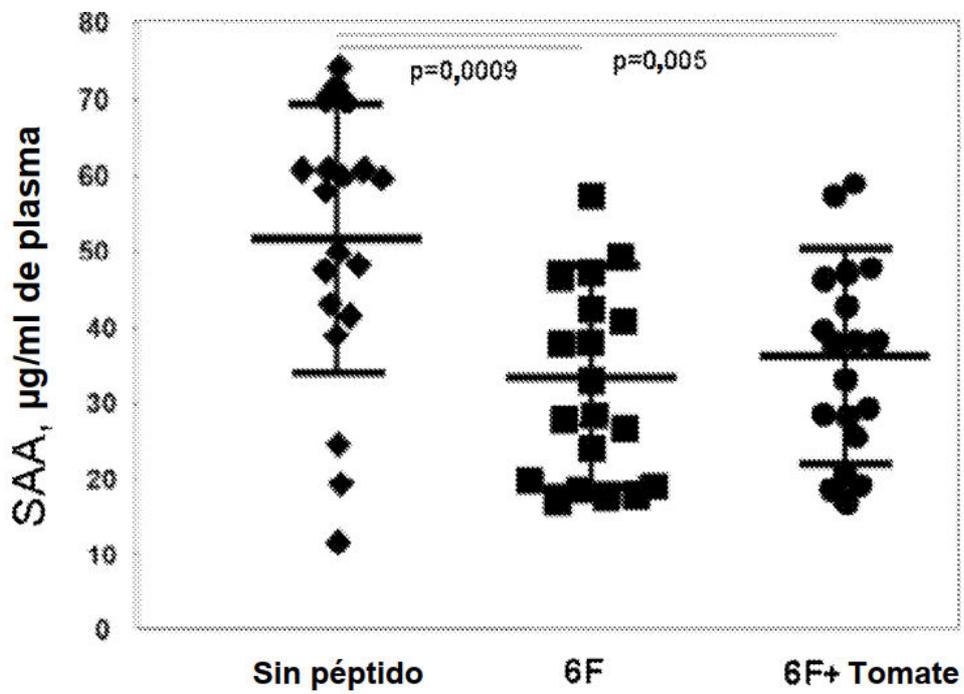


Fig. 28A

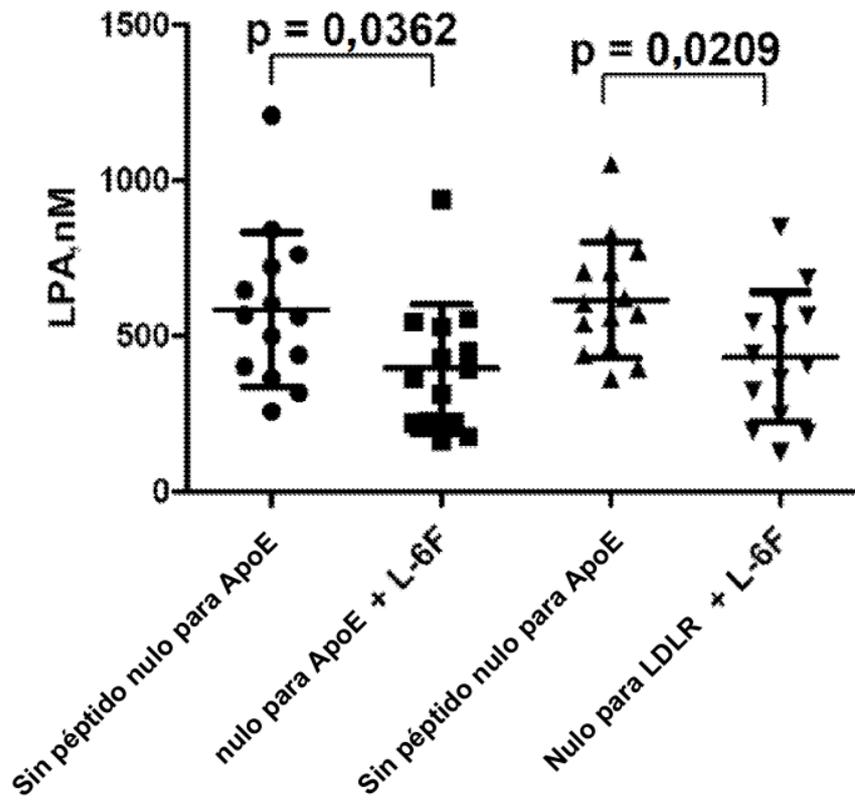


Fig. 28B

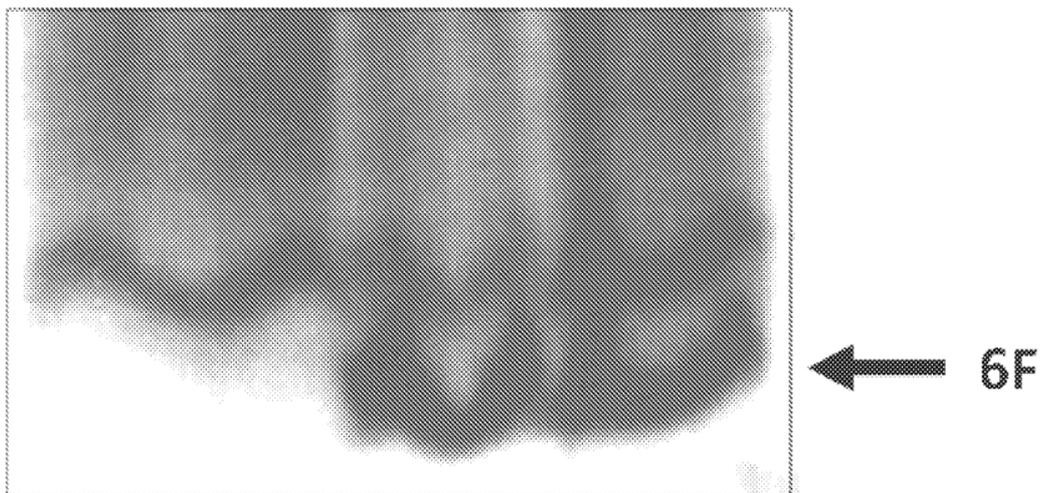


Fig. 29

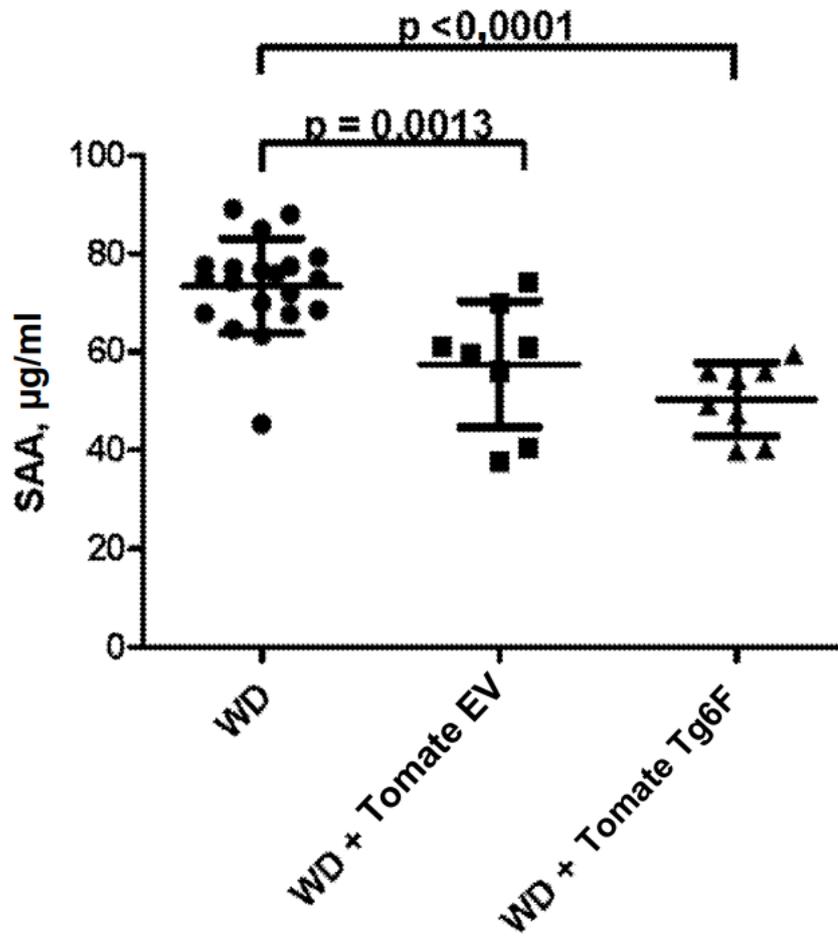


Fig. 30A

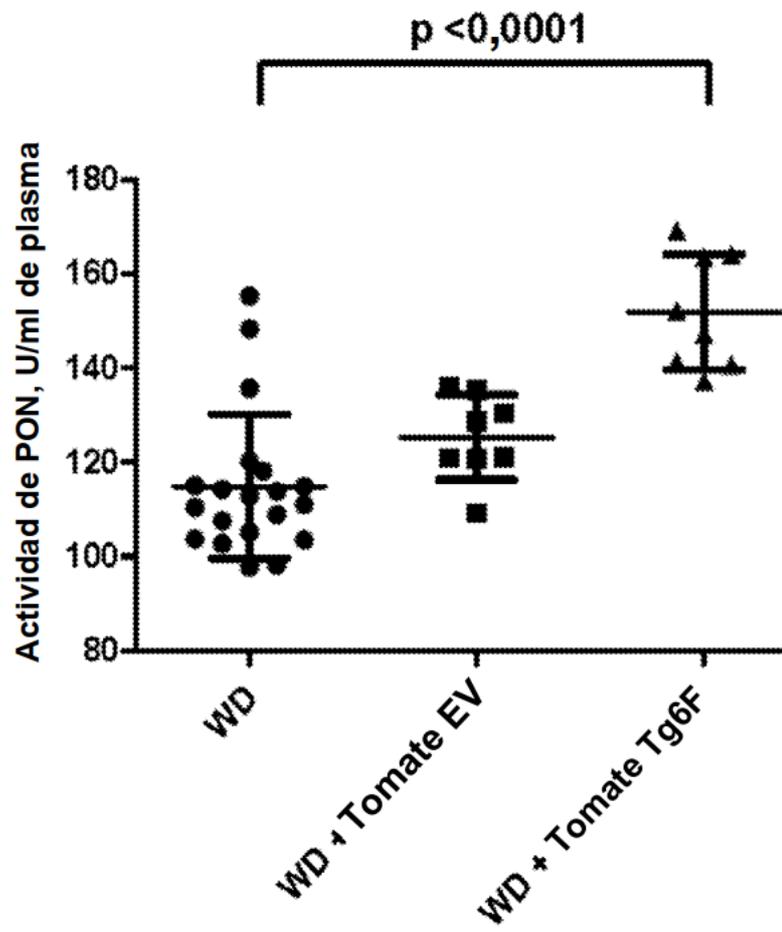


Fig. 30B

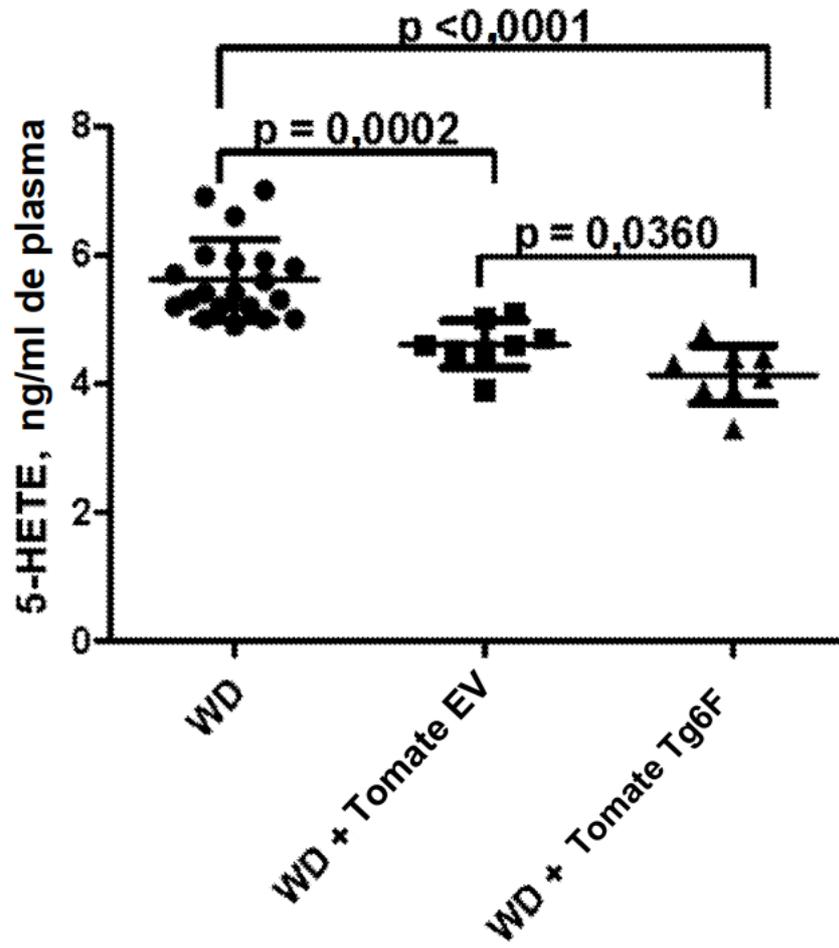


Fig. 30C

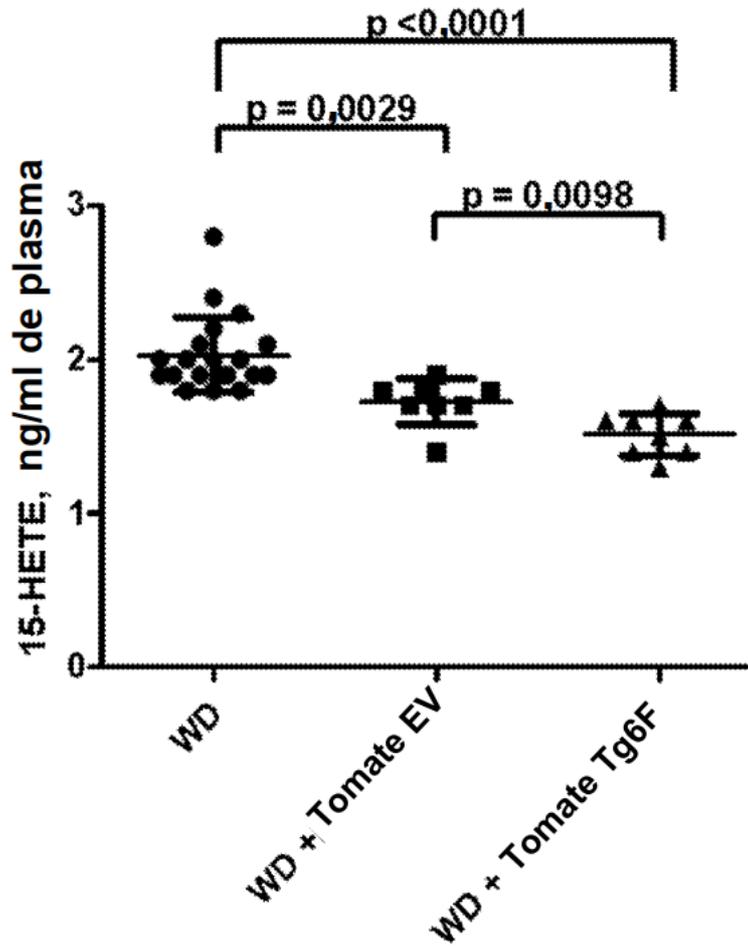


Fig. 30D

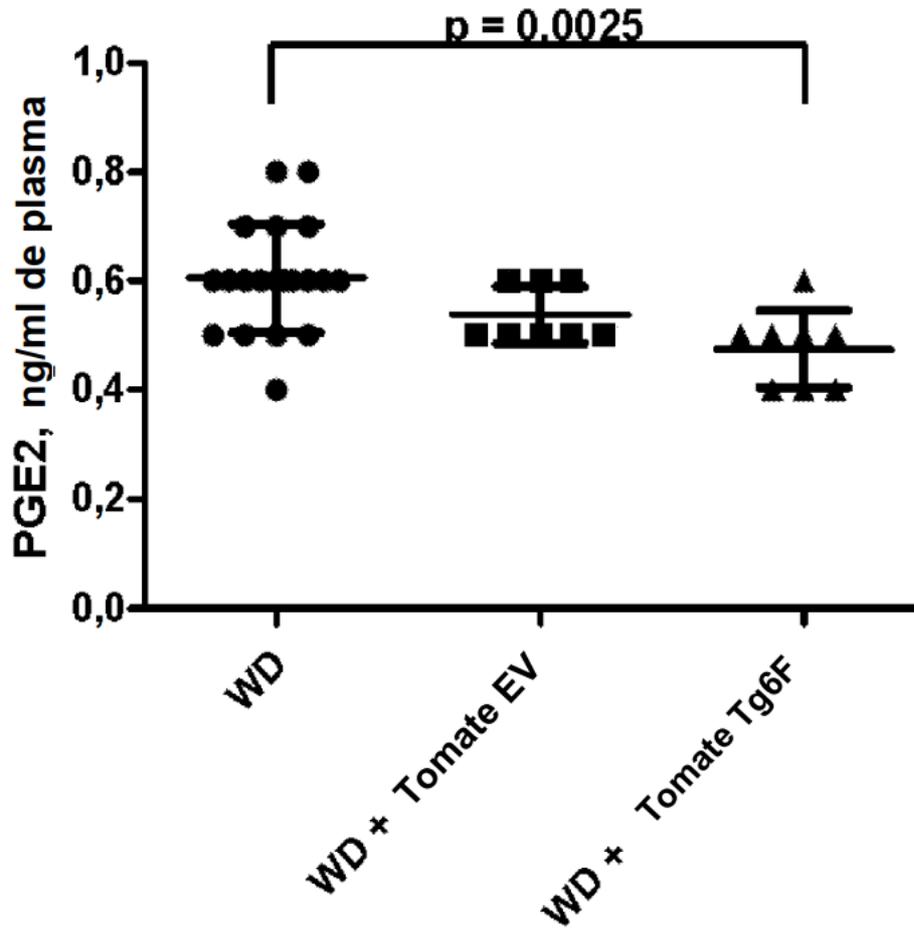


Fig. 30F

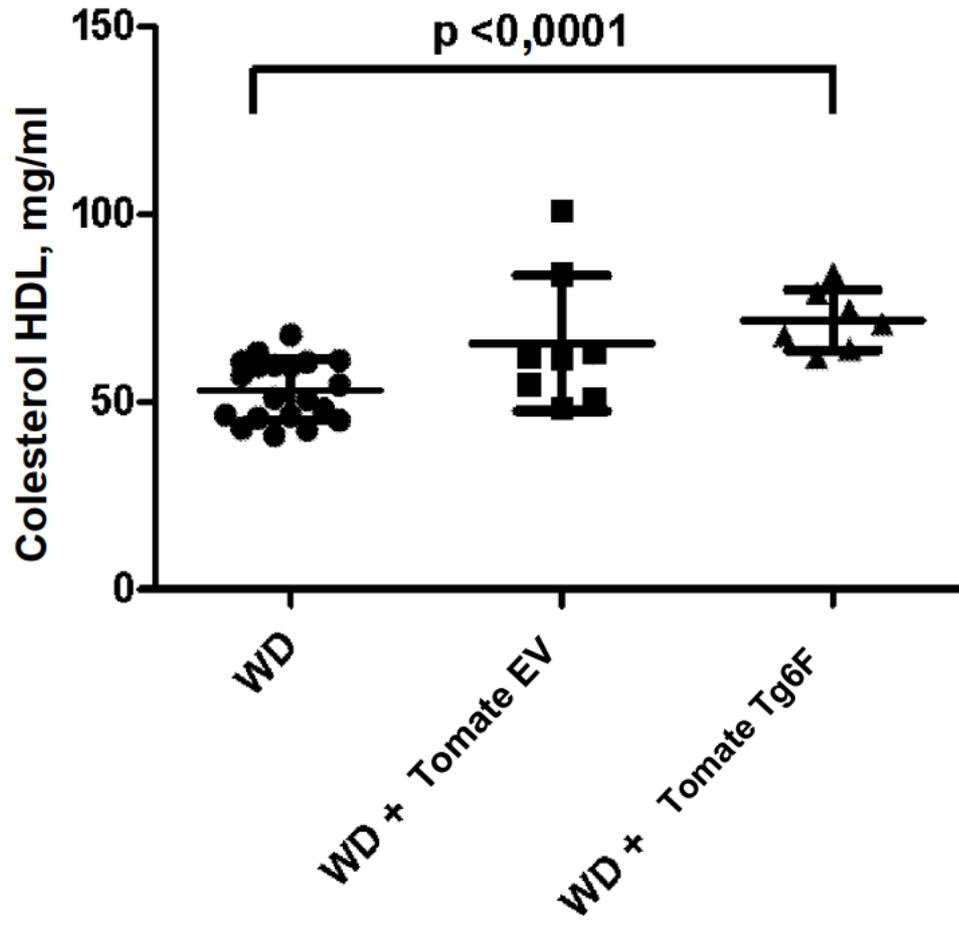


Fig. 30G

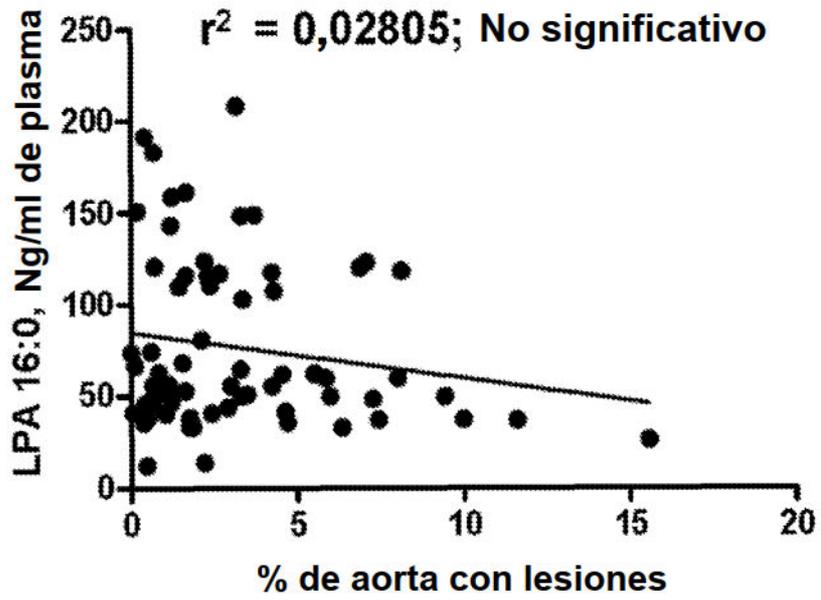


Fig. 31A

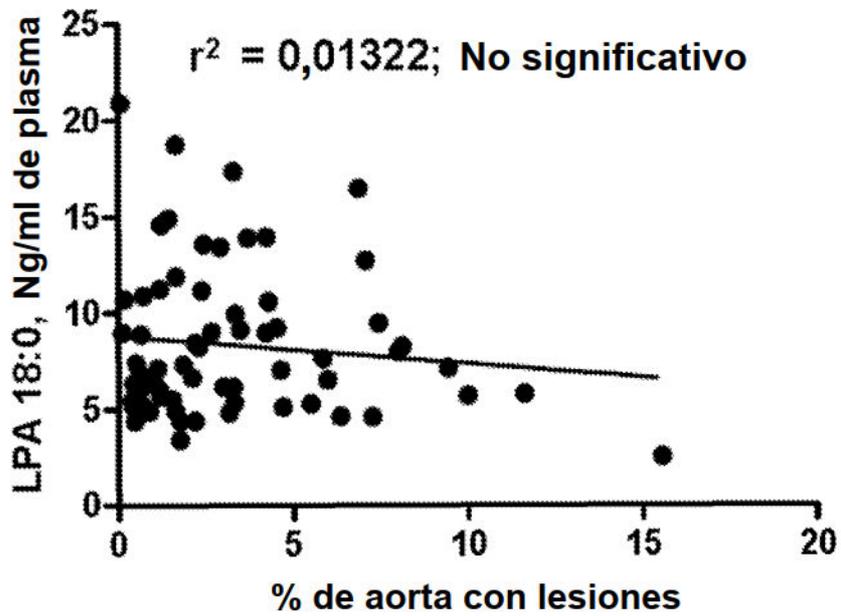


Fig. 31B

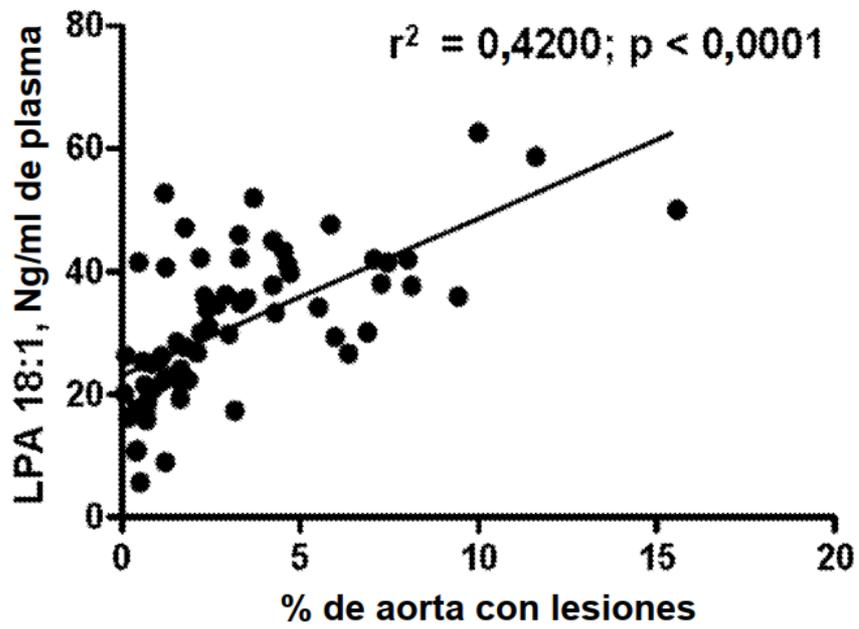


Fig. 31C

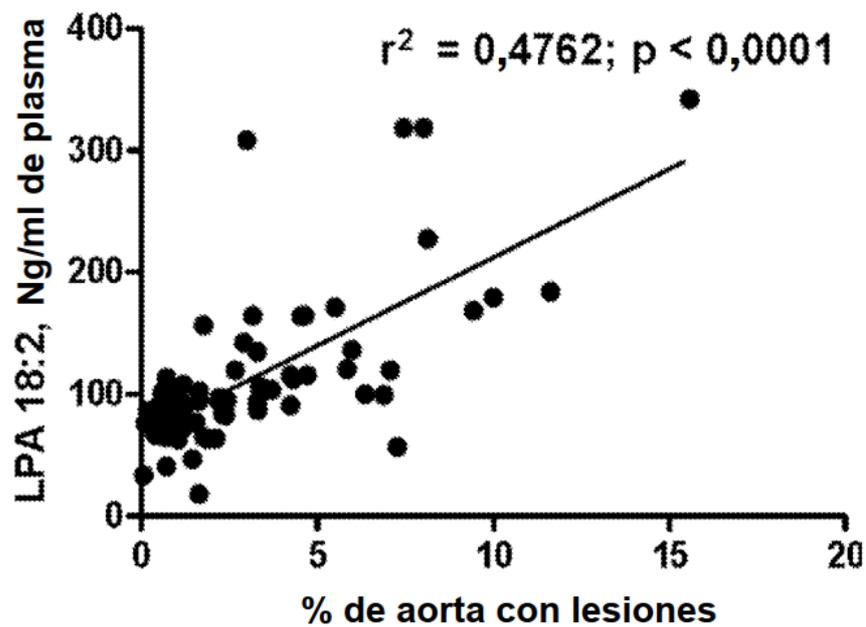


Fig. 31D

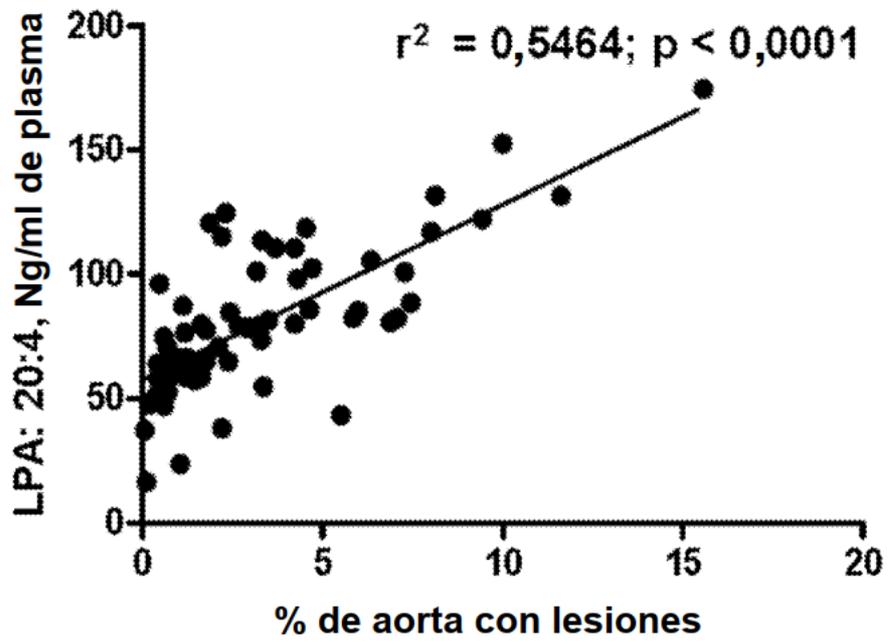


Fig. 31E

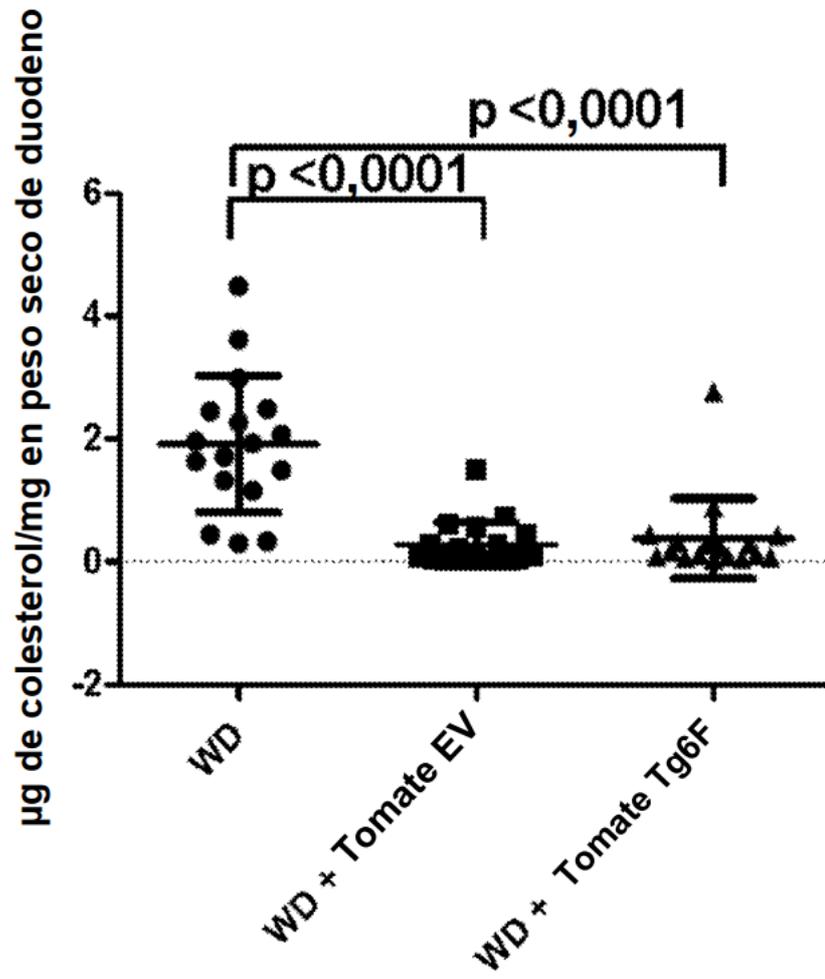


Fig. 32A

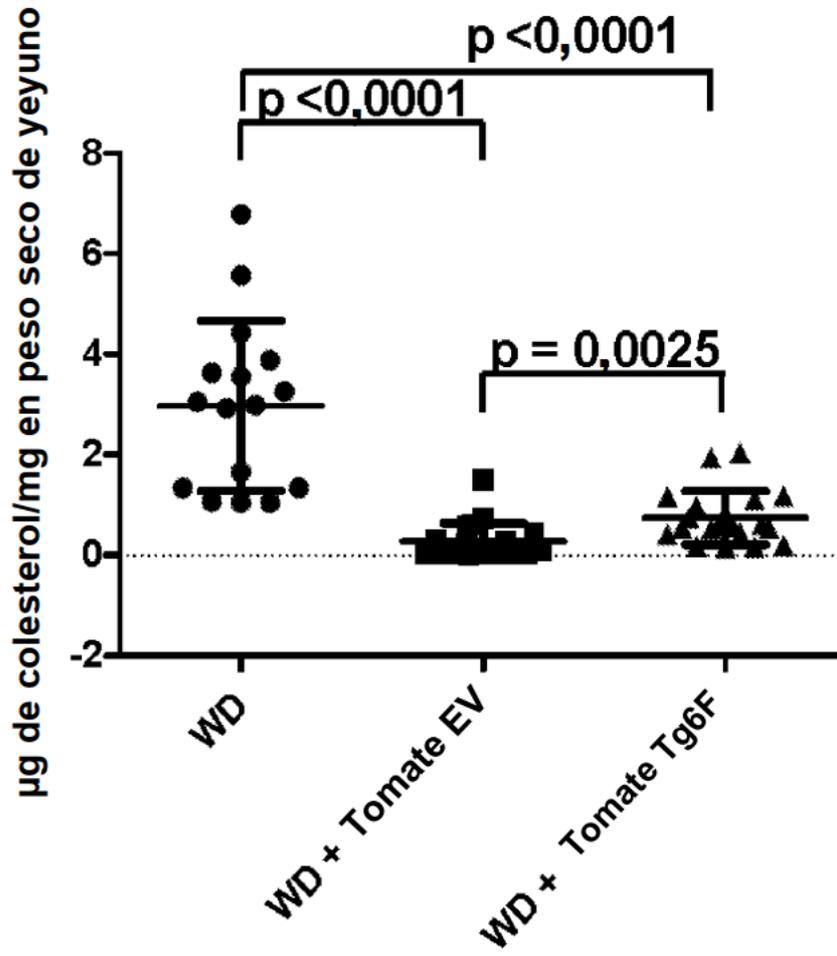


Fig. 32B

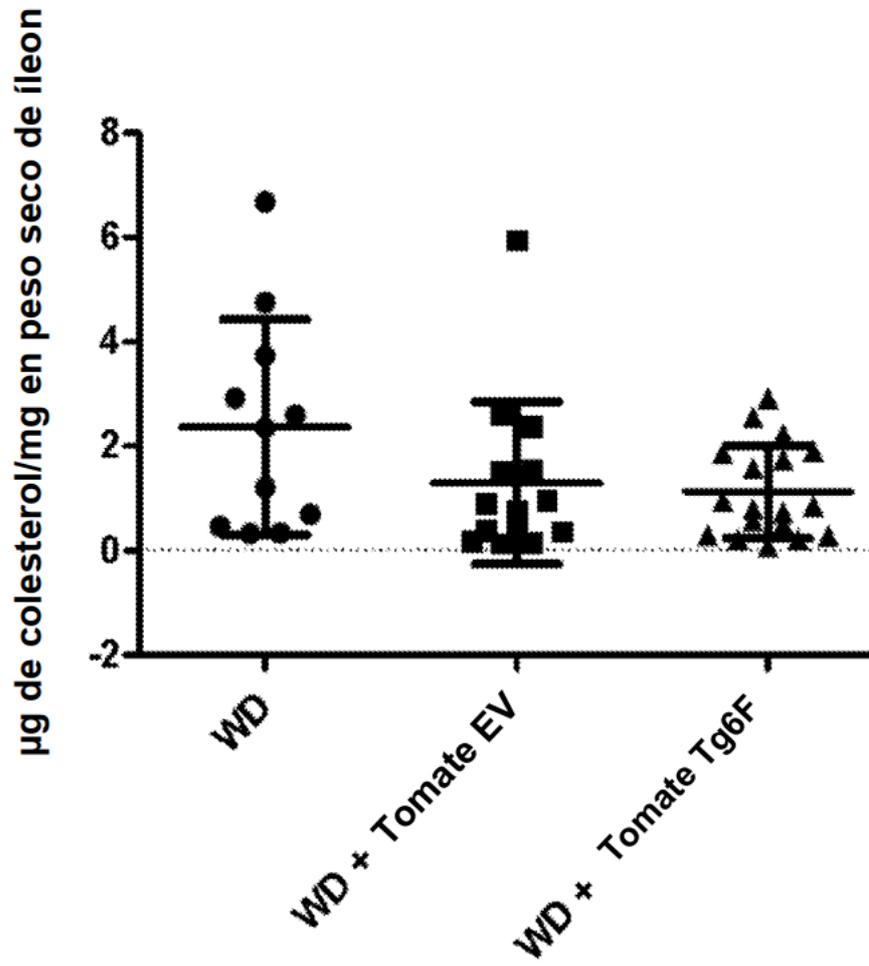
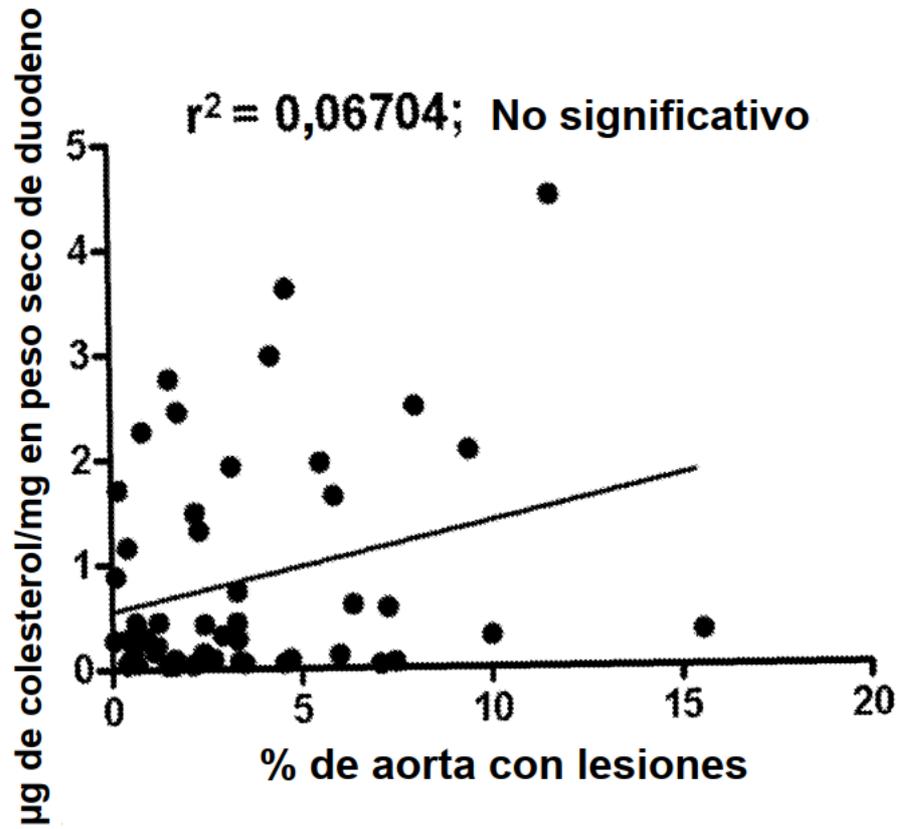
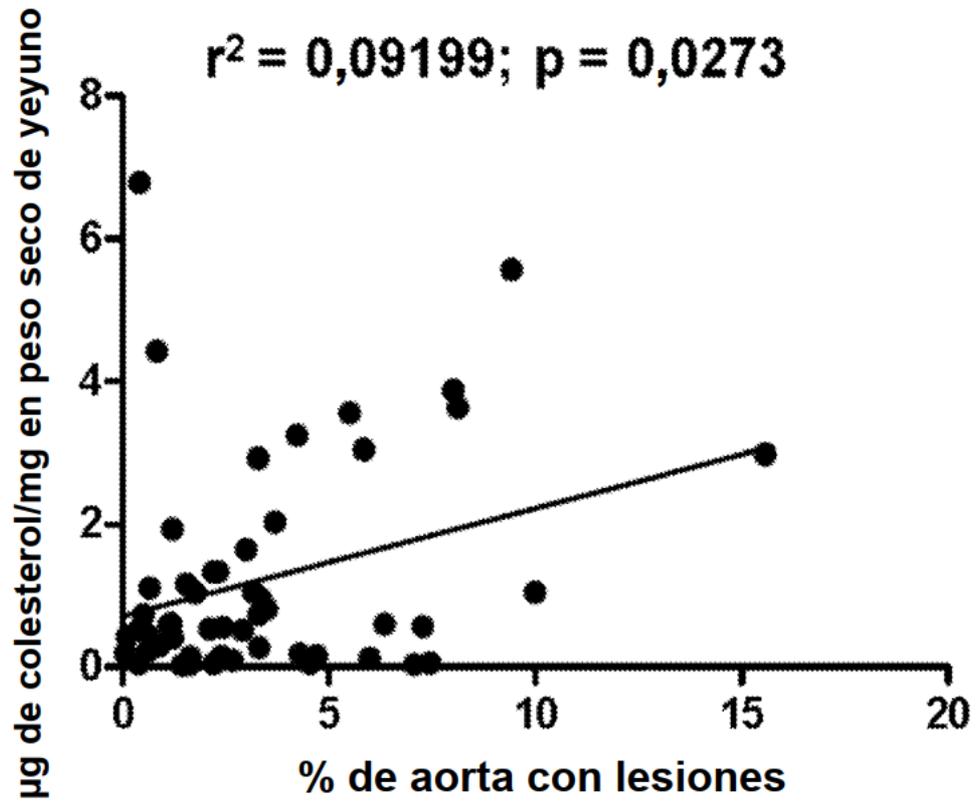


Fig. 32C





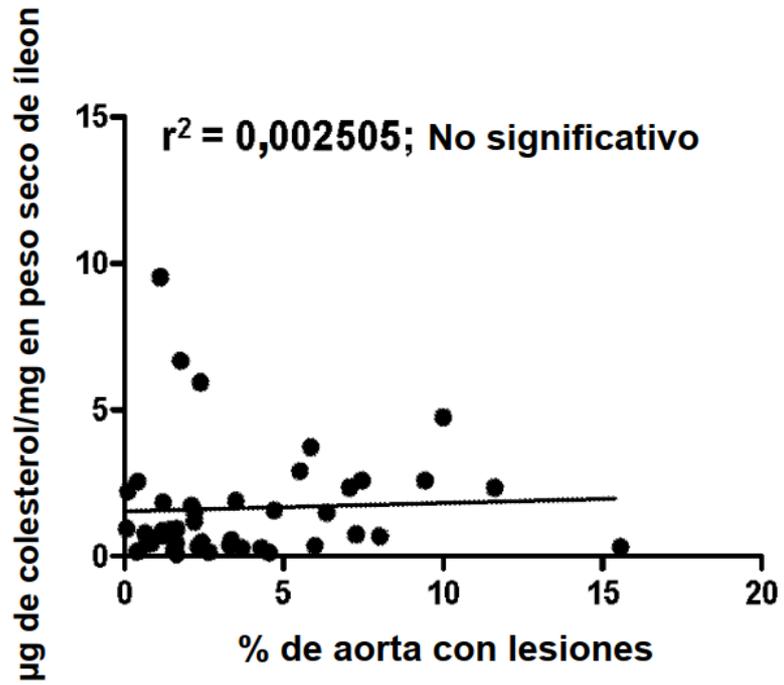


Fig. 32F

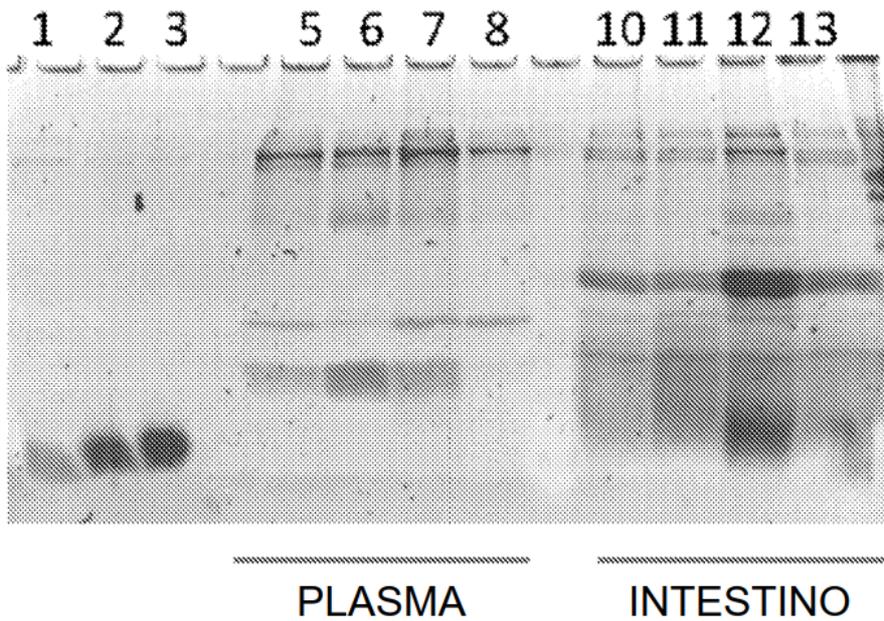


Fig. 33

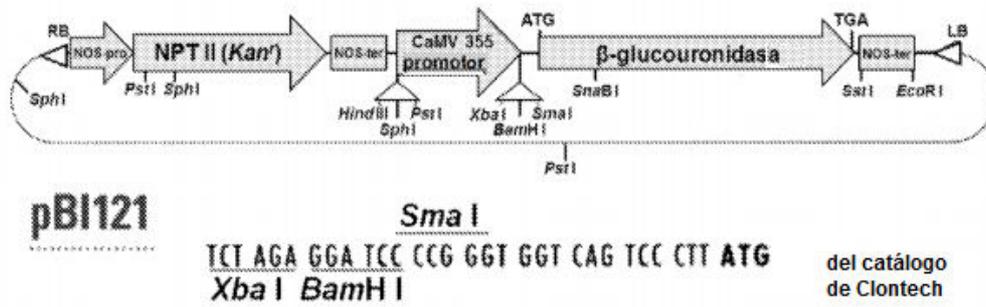


Fig. 34

```

tcctaata gattgttcat gtaattaagt tttgtggaag tgagagagtc caatthttga
aagaaaagag tcagaaaacg taatatttta aaagtctaaa tctttctaca aataagagca
aatttattta ttttttaatc caataaatat taatggagga caaattcaat tcactttggg
tgtaaaataa acttaaacca ataaccaaaag aactaataaa tcctgaagtg gaattattaa
ggataaatgt acatagacga tgaagaaata ataggttcga tgaattaata ataattaagg
atgttacaat catcatgtgc caagtatata cacaatattc tatgggattt ataatttcgt
tacttcaactt aacttttgcg taaataaaac gaattatctg atattttata ataaaacagt
taattaagaa ccatcatttt taacaacata gatataattat ttctaatagt ttaatgatac
ttttaaatct tttaaatttt atgtttcttt tagaaaataa aaattcaaaa aattaaatat
atttacaaaa actacaatca aacacaactt catatattaa aagcaaaaata tattttgaaa
atthcaagtg tcctaacaaa taagacaaga ggaaaatgta cgatgagaga cataaagaga
actaataatt gaggagtctt ataatatata ataaagttta ttagtaaaact taattattaa
ggactcctaa aatatatgat aggagaaaat gaatgggtgag agatattgga aaacttaata
attaaggatt ttaaaatata tggtaaaaaga taggcaaagt atccattatc cccttttaac
ttgaagtcta ctaggcgcatt gtgaaagtgt attttttgct acgtcatata gctataacgt
aaaaaaagaa agtaaaattt ttaatttttt ttaatatatg acatatttta aacgaaatat
aggcaaaaat gtaaatgaat agtaaaggaa acaaagatta atacttactt tgtaagaatt
taagataaat ttaaaattta atagatcaac tttacgtcta gaaagacca tatctagaag
gaatttcacg aaatcggccc ttattcgaaa ataactttta aataatgaat tttaaatttt
aagaaataat atccaatgaa taaatgacat gtagcatttt acctaaatat ttcaactatt
ttaatccaat attaatttgt tttattccca acaatagaaa gtcttggtgca gacatttaat
ctgacttttc cagtactaaa tattaatttt ctgaagattt tcgggttttag tccacaagtt
ttagtggagaa gttttgctca aatttttaggt gagaaggttt gatatttatc ttttgttaaa
ttaattttatc taggtgacta ttattttatt aagtagaaat tcatatcatt acttttgcca
acttgtagtc ataataggag taggtgtata tgatgaagga ataaacaagt tcagtgaagt
gattaaaata aaatataatt taggtgtaca tcaaaataaaa acctaaagt ttagaaaggc
accgaataat tttgcataga agatattagt aaatttataa aaataaaaga aatgtagttg
tcaagttgtc ttcttttttt tggataaaaa tagcagttgg cttatgtcat tcttttaca
cctccatgcc acttgcccaa ttattgacac ttaactaatt agtttgattc atgtatgaat
actaaataat ttttaggac tgactcaaat atttttatat tatcatagta atatttatct
aatttttagg accacttatt acttaataat aaattaacta caactatatt attgttgga
aacaacaacg ttttggttgt tatgatgaaa cgtacactat atcagtatga aaaattcaaa
acgattagta taaattatat tgaaaatttg atatttttct attcttaatc agacgtattg
ggtttcatat tttaaaagg gactaaactt agaagagaag tttgtttgaa actacttttg
tctctttctt gttcccattt ctctcttaga tttcaaaaag tgaactactt tatctctttc
ttgtttcaca ttttatttta ttctattata aatatggcat cctcatattg agatttttag
aaattattct aatcattcac agtgcaaaag a

```

Fig. 35

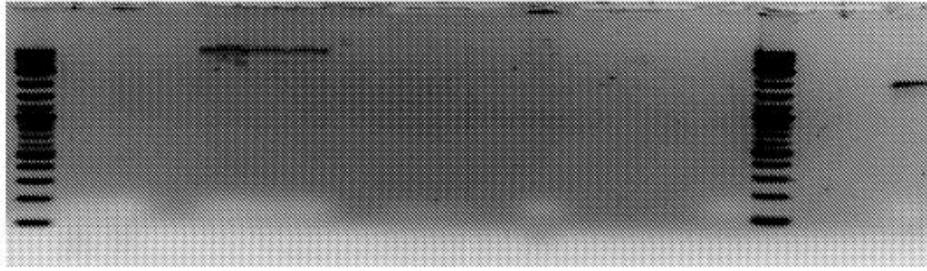
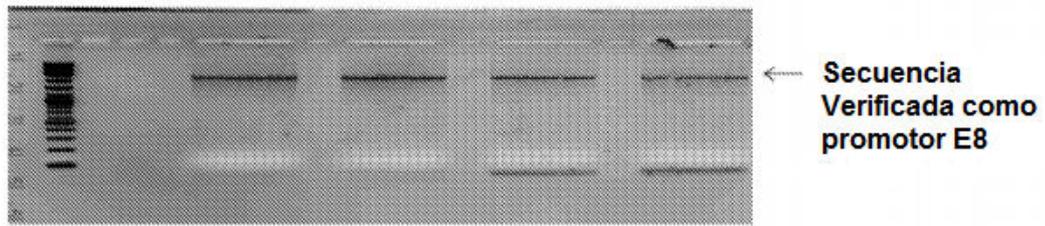


Fig. 36



FRAGMENTO de PCR de promotor E8

Fig. 37

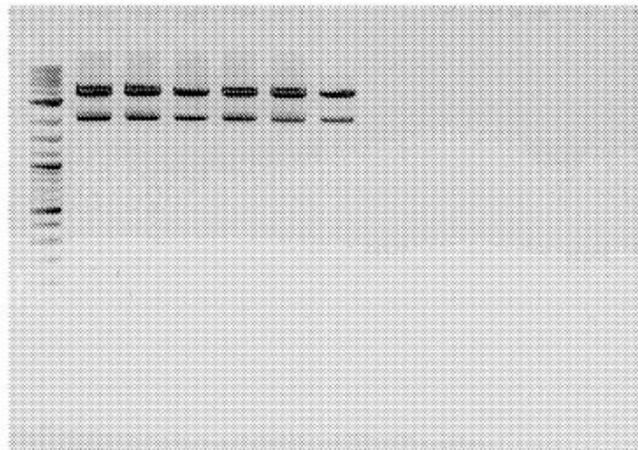


Fig. 38

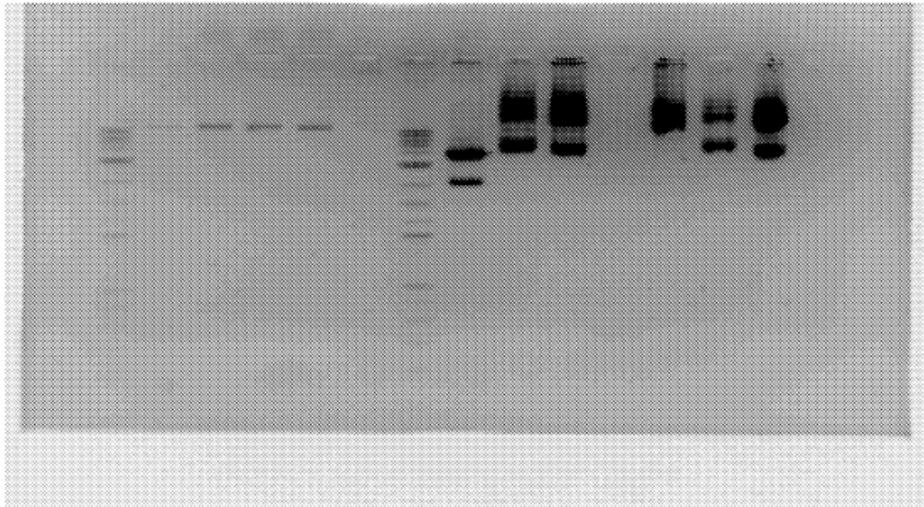


Fig. 39