

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 259**

51 Int. Cl.:

C07K 14/775 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A23L 33/18 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.05.2015** **PCT/US2015/031134**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.11.2015** **WO15175968**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2015** **E 15793647 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019** **EP 3143035**

54 Título: **Método para concentrar péptidos APOA-I-miméticos expresados de manera transgénica en las plantas**

30 Prioridad:

15.05.2014 US 201461994003 P

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

16.04.2020

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:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 754 259 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

Método para concentrar péptidos APOA-I-miméticos expresados de manera transgénica en las plantas

5 ANTECEDENTES

[0001] Los miméticos de la apolipoproteína A-I (apoA-I) que contienen solo 18 aminoácidos mostraron ser prometedores 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), y mejoró la función de HDL en humanos cuando se administra por vía oral a dosis altas a pesar de alcanzar niveles bajos de péptidos en plasma (Bloedon (2008) J. Lipid Res. 49: 1344-1352). Sin embargo, cuando se alcanzaron niveles plasmáticos altos con dosis bajas de péptido administradas por vía intravenosa o por inyección subcutánea (SQ), no se observó mejoría en la función de HDL (Watson et al. (2011) J. Lipid Res. 52: 361-373). Los estudios en ratones indicaron que el principal sitio de acción para estos péptidos es el intestino y que se requiere una dosis alta de péptido para su eficacia (Navab et al. (2011) J. Lipid Res. 52: 1200-1210; Navab et al. (2012) J. Lipid Res. 53: 437-445).

[0002] El requisito de dosis alta proporciona una barrera para uso en seres humanos debido a los costes de la síntesis química de estos péptidos. Para superar esta barrera un péptido de 18 aminoácido (péptido 6F, DWLKAFYDKFFKFFKFEFF (SEQ ID NO: 1) se expresó transgénicamente en los tomates (Chattopadhyay et al (2013) J. Lipid Res. 54: 995 a 1010). La alimentación de ratones de receptor-nulo de LDL (LDLR^{-/-}) con una dieta occidental (WD) durante 13 semanas que contiene 2,2% en peso de tomate en polvo liofilizado hecho de tomates transgénicos que expresan el péptido mimético apoA-I 6F (Tg6F) redujo los niveles plasmáticos de amiloide A en suero (SAA), redujo los niveles de colesterol total en plasma, redujo los niveles de triglicéridos en plasma, redujo los niveles de ácido lisofosfatídico (LPA) en plasma insaturado (pero no saturado), aumentó la actividad de plasma paraoxonasa-1, aumentó los niveles de colesterol HDL en plasma y disminuyó la extensión de la aterosclerosis aórtica en aproximadamente un 50% (Chattopadhyay et al. (2013) J. Lipid Res. 54: 995-1010; Getz y Reardon (2013) J. Lipid Res. 54: 878-880).

[0003] Dos horas después de que los ratones LDLR^{-/-} terminaran de comer WD que contenía Tg6F, se encontró péptido 6F intacto en el intestino delgado pero no en el plasma (Chattopadhyay et al. (2013) J. Lipid Res. 54: 995-1010). Los niveles plasmáticos de LPA insaturados (pero no saturados) se correlacionaron con el grado de aterosclerosis aórtica. Se encontró que el contenido de LPA en el tejido del intestino delgado disminuye después de la alimentación de Tg6F y el nivel de LPA (pero no el colesterol) en el tejido del intestino delgado se correlacionó con el grado de aterosclerosis aórtica (*Id.*).

[0004] Sin ninguna etapa de purificación, cuando se liofilizaron los tomates transgénicos que expresan péptido 6F, de tierra en un polvo y se alimenta a un modelo de ratón de la dislipidemia y aterosclerosis en sólo el 2,2% de un alto contenido de grasa de alto colesterol dieta en peso, los tomates transgénicos redujeron significativamente la dislipidemia, la inflamación y la aterosclerosis en los ratones. Esto proporcionó una dosis diaria de aproximadamente 40 mg/kg/día. Sin embargo, si la misma dosis fuera efectiva en un humano, requeriría que el humano coma aproximadamente 150 gramos de tomate en polvo liofilizado tres veces al día. Si bien esto es claramente posible, el volumen de tomate en polvo requerido sería de aproximadamente tres tazas tres veces al día. Por lo tanto, si bien la expresión de los péptidos de apolipoproteína A-I en las plantas supera el costo de las barreras de producción, el volumen significativo de material que se consumiría diariamente hace que el cumplimiento del paciente sea un desafío.

[0005] US 2005/0136137 enseña una composición para prevenir la aterosclerosis.

[0006] US 2013/344173 enseña la modulación de enfermedades a través de la ingeniería genética de plantas.

[0007] US 7,572,468 enseña la extracción de carotenoides a partir de material vegetal.

RESUMEN

[0008] La invención proporciona un método para concentrar los péptidos miméticos de apoA-I transgénicos expresados en una planta de tomate transgénica, comprendiendo dicho método: proporcionar un tejido de dicha planta transgénica en la que dicho tejido contiene un péptido mimético de la ApoA-I heteróloga expresada por dicha planta, y en el que dicho tejido se proporciona como un polvo sustancialmente seco; mezclar dicho polvo con una solución que comprende acetato de etilo y ácido acético para formar una mezcla de extracción; recoger la fase líquida de dicha mezcla y secar dicha fase líquida para proporcionar un extracto concentrado de polvo seco que muestra la actividad biológica de dicho mimético de apoA-I. Otras características de la invención se exponen en las reivindicaciones.

DEFINICIONES

[0009] El índice inflamatorio de HDL se refiere a la capacidad de las HDL de inhibir la actividad quimiotáctica de monocitos inducidos por LDL. En ciertas realizaciones, el índice inflamatorio de HDL se calcula comparando la actividad quimiotáctica de monocitos generada por un LDL de control estándar en ausencia y presencia del HDL de

prueba. En ausencia de la prueba HDL, la actividad quimiotáctica de monocitos se normaliza a 1,0. Si la actividad quimiotáctica de los monocitos aumenta con la adición del HDL de prueba, el índice inflamatorio de HDL es >1,0 y el HDL de prueba se clasifica como proinflamatorio. Si la actividad quimiotáctica de los monocitos disminuye con la adición del HDL de prueba, el índice inflamatorio HDL es <1,0 y el HDL se clasifica como antiinflamatorio. Una reducción en el índice inflamatorio HDL se considera una mejora en el índice inflamatorio HDL.

[0010] Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en este documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un químico artificial análogo de un correspondiente aminoácido natural, así como naturalmente polímeros de aminoácidos que se producen, sin embargo, un péptido expresado de forma recombinante típicamente consiste en aminoácidos que se encuentran todos en el organismo huésped (p. ej., aminoácidos que se producen naturalmente).

[0011] El término "un péptido helicoidal anfipático" se refiere a un péptido que comprende al menos un hélice anfipática (dominio helicoidal anfipático). Ciertos péptidos helicoidales anfipáticos contemplados en el presente documento pueden comprender dos o más hélices anfipáticas (p. ej., 3, 4, 5, etc.).

[0012] El término "hélice anfipática de clase A" se refiere a una estructura de la proteína que forma un α -hélice produciendo una segregación de caras polares y no polares con los residuos cargados positivamente que residen en la interfase polar-apolar y los residuos cargados negativamente que residen en el centro de la cara polar (véase, p. ej., Segrest et al. (1990) *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 8: 103-117).

[0013] "Apolipoproteína J" (apo J) se conoce por una variedad de nombres, incluyendo clusterina, TRPM2, GP80, y SP 40 (ver, p. ej., Fritz (1995) Pp 112 En: *Clusterin: Role in Vertebrate Development, Function, and Adaptation* (Harmony JAK Ed.), RG Landes, Georgetown, TX.). Primero se describió como una glucoproteína heterodimérica y un componente de las proteínas secretadas de las células de Sertoli de rata cultivadas (véase, p. ej., Kissinger et al. (1982) *Biol. Reprod.*; 27: 233240). El producto traducido es una proteína precursora de cadena sencilla que sufre escisión intracelular en una subunidad α 34 kDa unida por disulfuro y una subunidad β 47 kDa (véase, p. ej., Collard y Griswold (1987) *Biochem.*, 26: 3297-3303). Se ha asociado con daño celular, transporte de lípidos, apoptosis y puede estar involucrado en la eliminación de restos celulares causados por daño celular o muerte. Se ha demostrado que la clusterina se une a una variedad de moléculas con alta afinidad, incluidos lípidos, péptidos y proteínas, y la sonda hidrófoba 1-anilino-8-naftalenosulfonato (Bailey et al. (2001) *Biochem.*, 40: 11828-11840).

[0014] La clase G hélice anfipática se encuentra en las proteínas globulares, y por lo tanto, la clase nombre G. La característica de esta clase de hélice anfipática es que posee una distribución aleatoria de residuos 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 (véase, p. ej., 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 residuos cargados positiva y negativamente en la cara polar. Sin embargo, en contraste con la hélice anfipática clase G que tiene una cara no polar estrecha, esta clase tiene una cara no polar ancha que permite que esta clase se una fácilmente al fosfolípido y la clase se denomina G* para diferenciarla de la clase G de la hélice anfipática (véase, p. ej., Segrest et al. (1992) *J. Lipid Res.*, 33: 141-166; Anantharamaiah et al. (1993) Pp. 109-142 en: *The Amphipathic Helix*, Eand, RM Ed CRC Press, Boca Raton, Florida). Jones et al. han descrito programas informáticos para identificar y clasificar dominios helicoidales anfipáticos. (1992) *J. Lipid Res.* 33: 287-296) e incluyen, entre otros, el programa de rueda helicoidal (WHEEL o WHEEL/SNORKEL), el programa de red helicoidal (HELNET, HELNET/SNORKEL, HELNET/Angle), el programa para agregar ruedas helicoidales (COMBO o COMBO/SNORKEL), programa para agregar redes helicoidales (COMNET, COMNET/SNORKEL, COMBO/SELECT, COMBO/NET), programa de rueda de consenso (CONSENSUS, CONSENSUS/SNORKEL), y similares.

[0015] El término "tratar" cuando se utiliza con referencia al tratamiento de, p. ej., una patología o enfermedad se refiere a la mitigación y/o eliminación de uno o más síntomas de que la 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.

[0016] El término "mejorar" cuando se usa con respecto a "mejorar uno o más síntomas de la 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 en la formación y ruptura de la placa aterosclerótica, una reducción en eventos clínicos tales como ataque cardíaco, angina o accidente cerebrovascular, una disminución en la hipertensión, una disminución en biosíntesis proteica inflamatoria, reducción del colesterol plasmático y similares.

[0017] Una "planta transgénica" es una planta que expresa en al menos algunas de las células de la planta de un péptido heterólogo. En ciertas realizaciones, el péptido heterólogo consiste en, o comprende la secuencia de aminoácidos de una o más apolipoproteína(s) o miméticos de apolipoproteína, p. ej., un mimético apoA-I, y/o un

péptido G*, y/o un péptido apoE, p. ej., como se describe en este documento. En ciertas realizaciones, la planta transgénica es una planta que al menos una parte de la cual es comestible por un humano y/o por un mamífero no humano.

[0018] El término "actividad biológica" cuando se usa con respecto a un péptido de la apolipoproteína, un péptido de la apolipoproteína mimético, un péptido/proteína que comprende uno o más apolipoproteína y/o dominios miméticos de apolipoproteína indica que el péptido, cuando se alimenta a un mamífero reduce plasma Niveles de SAA, 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. Una planta transgénica o una porción de la misma que tiene actividad biológica indica que la planta o porción de la misma cuando se alimenta a un mamífero disminuye 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 ácidos araquidónicos y linoleicos.

[0019] 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 no encontrada normalmente en la naturaleza.

[0020] Una secuencia de codificación de ADN "heteróloga" es una secuencia de codificación estructural que no es nativa de la planta que se está transformando, o una secuencia de codificación que ha sido modificada para mejorar las características de su producto proteico. Heterólogo, 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 unido actualmente.

[0021] 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.

[0022] Un "promotor regulable" es cualquier promotor cuya actividad se ve afectada por un factor de actuación *cis* o *trans* (p. ej., un promotor de etileno-inducible tal como el promotor E8 de tomate).

[0023] Un "promotor constitutivo" es cualquier promotor que dirige la transcripción de ARN en muchos o todos los tejidos de un transformante de plantas en la mayoría de veces.

[0024] Un "promotor específico de tejido" es cualquier promotor que dirige la transcripción de ARN a niveles superiores en tipos particulares de células y tejidos (p. ej., un promotor específico de fruta).

[0025] Por "promotor" o "segmento de promotor" (p. ej., un promotor de tomate E8 o el promotor E4 o híbrido promotor E4/E8) se entiende una secuencia de ADN que funciona solamente como un promotor o como un componente de un promotor de la presente memoria para transcripción directa de un gen aguas abajo, y puede incluir promotor o segmentos de promotor derivados por medio de ligamiento con regiones de operador, mutagénesis aleatoria o controlada, adición o duplicación de secuencias potenciadoras, adición o modificación con enlazadores sintéticos, y similares.

[0026] Por un promotor de gen E4 o E8 se entiende un promotor obtenido de un gen E8 o E4 considerado para compartir una identidad de secuencia con el E8 de tomate o secuencias de genes de E4 (p. ej., como se describe en la patente de EE.UU. 6.118,049), o una región o regiones determinadas, o de un gen que tiene al menos aproximadamente 70%, preferiblemente al menos aproximadamente 80%, más preferiblemente al menos aproximadamente 85%, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 90% de identificación de secuencia, o al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia, o al menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia sobre una longitud de secuencia de polinucleótidos correspondiente a las secuencias del gen E8 de tomate o E4 de tomate.

[0027] El término "sustitución conservativa" se usa en referencia a proteínas o péptidos para reflejar las sustituciones de aminoácidos que no alteran sustancialmente la actividad (p. ej., capacidad de reducir SAA, y/o capacidad de aumentar paraoxonasa en un mamífero. Típicamente las sustituciones de aminoácidos conservadoras implican la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido con propiedades químicas similares (p. ej. carga o hidrofobicidad). Los siguientes seis grupos contienen aminoácidos que son sustituciones conservadoras 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).

[0028] Un "componente de macro-lípidos de la dieta" se refiere a un componente lipídico de la dieta de un mamífero que está típicamente presente en cantidades de miligramos por gramo de dieta. En una dieta occidental, tales componentes de macro-lípidos incluyen típicamente, pero no se limitan a, fosfolípidos tales como fosfatidilcolina y esteroides tales como colesterol. Incluso es lisofosfatidilcolina probabilidad de estar presentes en cantidades de miligramos después de actuarse sobre fosfatidilcolina en el duodeno por PLA2 y por lo tanto, en diversas realizaciones, puede ser considerado como un componente macro-lípido.

[0029] Un "componente micro-lípidos de la dieta" se refiere a un componente lipídico de la dieta de un mamífero que está presente típicamente en cantidades de microgramos (o inferior) por gramo de dieta. Los componentes

microlipídicos ilustrativos típicamente incluyen, pero no se limitan a, ácido lisofosfatídico, ácido fosfatídico y similares.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 [0030]

La Figura 1 muestra los niveles de colesterol total en plasma.

La Figura 2 muestra los niveles de triglicéridos en plasma.

10

La Figura 3A muestra el número de tumores metastásicos en los pulmones de ratones tratados con extracto de Chow, Chow + EV y Chow + T6gF producido como se describe en este documento. La Fig. 3B muestra plasma LPA 20: 4 en ratones tratados con extracto de Chow, Chow + EV y Chow + T6gF producido como se describe aquí.

15

La Figura 4, paneles AC. El acetato de etilo con ácido acético al 5% (pero no etanol al 60%) concentra eficientemente el péptido 6F producido en tomates transgénicos. Los tomates transgénicos liofilizados que expresan β -glucuronidasa (EV) o que expresan el péptido 6F (Tg6F) se extrajeron durante la noche a temperatura ambiente en acetato de etilo/ácido acético o en etanol acuoso como se describe en el Ejemplo 3 Materiales y métodos. El extracto de acetato de etilo/ácido acético se secó bajo argón; el extracto acuoso de etanol se secó al vacío como se describe en Materiales y Métodos. Los sólidos restantes se suspendieron en agua y se analizaron en geles SDS PAGE al 18% como se describe en el Ejemplo 3 Materiales y Métodos. El panel A muestra una imagen del gel teñido con Sypro Ruby de los concentrados de tomate preparados con acetato de etilo/ácido acético (100 μ g o 200 μ g de proteína por carril). El panel B muestra una imagen del gel de concentrados de tomate teñido con Sypro Ruby preparado con etanol acuoso (100 μ g de proteína por línea). El péptido 6F sintetizado químicamente auténtico a 5, 10 o 20 μ g por línea se incluyó como estándares en los paneles A y B. El panel C muestra un resumen de los resultados del análisis LC/MS del resumen de tripsina del estándar 6F auténtico (estándar 6F, parte superior del Panel C, 5 μ g), el resumen de tripsina de la banda correspondiente del carril Tg6F (Tg6F, en el centro de la Fig. 4C, 100 μ g), y el resumen de tripsina de la banda correspondiente del carril EV (EV, fondo del Panel C, 100 μ g) realizado como se describe en el Ejemplo 3 Materiales y Métodos. Para simplificar la presentación de datos, se promediaron los espectros recolectados entre 13 y 25 minutos de los tres cromatogramas. Todos los péptidos tripticos eluyeron dentro de esta ventana. Las flechas apuntan a señales identificadas en base a la concordancia de peso molecular como derivadas del péptido 6F: EFF (residuos 16-18), encontrado m/z 442,2 (detectado en Estándar 6F y Tg6F, pero no en EV), calculado para MH + 442,197 Da (monoisotópico, mi); DWLK (residuos 1-4, SEQ ID NO: 2), encontrado m/z 561,3 (detectado tanto en Estándar 6F como en Tg6F, pero no en EV), calculado para MH + 561,303 Da (mi); FFEK (residuos 10-13, SEQ ID NO: 3), encontrado m/z 570,3 (detectado tanto en Estándar 6F como en Tg6F, pero no en EV), calculado para MH + 570,292 Da (mi); AFYDK (residuos 5-9, SEQ ID NO: 4), encontrado m/z 643,3 (detectado en Tg6F, pero no en Estándar 6F o EV), calculado para MH + 643,308 Da (mi); FKEFF (residuos 14-18, SEQ ID NO: 5), encontrado m/z 717,4 (detectado en Estándar 6F y Tg6F, pero no en EV), calculado para MH + 717,361 Da (mi); DWLKAFYDK (residuos 1-9), encontrado m/z 1185,6 y 1185,7 (detectado en Estándar 6F y Tg6F, respectivamente, pero no en EV), calculado para MH + 1185,594 Da (mi); AFYDKFFEK (residuos 5-13, SEQ ID NO: 6), encontrado m/z 1194,6 y 1194,7 (detectado en Estándar 6F y Tg6F, respectivamente, pero no en EV), calculado para MH + 1194,583 Da (mi). Estos péptidos tripticos parcialmente superpuestos proporcionaron una cobertura de secuencia del 100% tanto para el estándar 6F como para la muestra Tg6F. Estos resultados son representativos de dos de dos experimentos.

45

Figuras 5A-5H. Respuesta a la dosis de concentrados de tomate en un modelo de dislipidemia en ratones. Los ratones hembra LDLR nulos de 4 a 5 meses de edad (n = 8-24 ratones por grupo) fueron alimentados con una dieta occidental (WD) o WD suplementada con 0,015%, 0,03% o 0,06% de concentrado de tomate en peso o los ratones fueron alimentados con tomates transgénicos liofilizados a partir de los cuales se hicieron los concentrados añadidos al WD al 0,55%, 1,1% o 2,2% en peso como se describe en el Ejemplo 3 Materiales y métodos. Después de dos semanas, se ayunó a los ratones durante la noche y se determinó el colesterol total en plasma y los triglicéridos como se describe en el Ejemplo 3 Materiales y métodos. Las Figs. 5A y 5B muestran los niveles de colesterol total en plasma para ratones que reciben concentrados de tomate Tg6F o EV, respectivamente. Las Figs. 5C y 5D muestran niveles de triglicéridos en plasma para ratones que reciben concentrados de tomate Tg6F o EV, respectivamente. Las Figs. 5E y 5F muestran los niveles de colesterol total en plasma para los ratones en las Figs. 5A y 5B, respectivamente, en comparación con los ratones que recibieron los tomates transgénicos liofilizados a partir de los cuales se hicieron los concentrados. Las Figs. 5G y 5H muestran niveles de triglicéridos en plasma para los ratones en las Figs. 5C y 5D, respectivamente, en comparación con los ratones que recibieron los tomates transgénicos liofilizados a partir de los cuales se hicieron los concentrados. Los datos mostrados son Media $\pm$ SEM. NS = no significativo; Tg6F = concentrado de tomate de tomates transgénicos que expresan el péptido 6F; EV = concentrado de tomate de tomates transgénicos que expresan la proteína marcadora, β -glucuronidasa. El experimento se realizó una vez.

65

Figuras 6A-6C. El concentrado de tomate que contiene el péptido 6F (Tg6F), pero no controla el concentrado de tomate (EV) redujo la metástasis de las células de cáncer de colon a los pulmones. Se inyectaron ratones BALB/c hembra de $\pm$ semanas de edad ($n = 12$ por grupo) con 2×10^4 células CT26 en 100 μ L de PBS a través de la vena de la cola como se describe en el Ejemplo 3 Materiales y métodos. Después de la inyección, los ratones se mantuvieron en comida para ratones estándar (Chow) o comida para ratones estándar que contenía 0,06% en peso del concentrado de tomate transgénico control (EV), o comida para ratones estándar que contenía 0,06% en peso del concentrado de tomate transgénico 6F (Tg6F), que proporcionó a los ratones una dosis de concentrado de tomate de < 120 mg/kg/día por ratón, que proporcionó a los ratones una dosis del péptido 6F de < 7 mg/kg/día. Después de 4 semanas, los ratones se sometieron a un sangrado terminal, y después del sacrificio, se recogieron los pulmones, se pesaron y se fijaron con la solución de Bouin, y se determinó el número de nódulos tumorales en la superficie de los pulmones como se describe en el Ejemplo 3 Materiales y métodos. La figura 6A muestra el peso de los pulmones en gramos. La figura 6B muestra el número de nódulos tumorales en la superficie de los pulmones. La Fig. 6C muestra los niveles plasmáticos de ácido lisofosfatídico 20: 4 (LPA 20: 4). Los datos mostrados son Media $\pm$ SEM; NS = No significativo. Estos resultados son representativos de dos de dos experimentos.

Figura 7A-7B. Los neutrófilos asociados a tumores se reducen drásticamente con el concentrado de tomate que contiene el péptido 6F (Tg6F), pero no con el concentrado de tomate (EV) en un modelo de ratón de células de cáncer de colon que hacen metástasis a los pulmones. Neutrófilos asociados a tumores en los pulmones de los ratones descritos en las Figs. 6A-6C se determinaron como se describe en el Ejemplo 3 Materiales y Métodos. La figura 7A muestra ejemplos representativos de cada grupo de tratamiento. La figura 7B muestra el% de área teñida para Ly6G (media $\pm$ SEM). NS = No significativo. El experimento se realizó una vez.

Figuras 8A-8E. Tanto el concentrado de tomate de control (EV) como el concentrado de tomate que contiene el péptido 6F (Tg6F) redujeron significativamente la carga tumoral de células de cáncer de ovario, pero el concentrado de tomate que contiene el péptido 6F fue significativamente más eficaz. A los ratones hembra C57BL/6J a las 9 semanas de edad ($n = 24$ por grupo) se les administró una inyección intraperitoneal que contenía 8×10^6 células ID8 en un volumen total de 0,8 μ L de DMEM (sin suplementos). Después de la inyección de las células ID8, los ratones se mantuvieron en comida para ratones estándar (Chow) o comida para ratones estándar que contenía 0,06% en peso del concentrado de tomate transgénico de control (EV), o que contenía 0,06% en peso del concentrado de tomate 6F transgénico (Tg6F), que proporcionó a los ratones una dosis del péptido 6F de ~ 7 mg/kg/día. Después de 12 semanas, los ratones se sometieron a un sangrado terminal, y después del sacrificio se determinó el número de nódulos tumorales en las superficies peritoneales y en la superficie de los órganos abdominales como se describe en el Ejemplo 3 Materiales y métodos. La figura 8A muestra el número total de nódulos tumorales en el abdomen. La figura 8B muestra el número de nódulos tumorales en la superficie de la cavidad peritoneal. La figura 8C muestra el número de nódulos tumorales en el diafragma. La figura 8D muestra el número de nódulos tumorales en la superficie del intestino. La figura 8E muestra el número de nódulos tumorales en el abdomen que tenían un tamaño mayor de 1 mm. Los datos mostrados son Media $\pm$ SEM; NS = No significativo. Estos resultados son representativos de dos de dos experimentos.

Figuras 9A-9J. Niveles de lípidos plasmáticos y de amiloide A (SAA) en suero en ratones después de la inyección intraperitoneal de células de cáncer de ovario. Los niveles de lípidos en plasma y los niveles de SAA se midieron en los ratones descritos en la figura 8A-8E. Las abreviaturas son como en la figura 8. La figura 9A muestra los niveles de colesterol total en plasma. La figura 9B muestra la correlación lineal entre los niveles de colesterol total en plasma y el número total de tumores en el abdomen. La figura 9C muestra los niveles de triglicéridos en plasma. La figura 9D muestra la correlación lineal entre los niveles de triglicéridos en plasma y el número total de tumores en el abdomen. La figura 9E muestra los niveles plasmáticos de colesterol HDL. La figura 9F muestra la correlación lineal entre los niveles plasmáticos de colesterol HDL y el número total de tumores en el abdomen. La figura 9G muestra los niveles plasmáticos de apoA-I. La figura 9H muestra la correlación lineal entre los niveles plasmáticos de apoA-I y el número total de tumores en el abdomen. La figura 9I muestra los niveles plasmáticos de amiloide A en suero (SAA). La figura 9J muestra la correlación lineal entre los niveles de SAA en plasma y el número total de tumores en el abdomen. Los datos que se muestran en los gráficos de barras son Media $\pm$ SEM; NS = No significativo. Este experimento se realizó una vez.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0031] Los métodos de concentrar actividad del péptido mimético de la apolipoproteína A-I en el material vegetal transgénico que expresa tales péptidos se proporcionan, como se define en las reivindicaciones. Fue un descubrimiento sorprendente que un protocolo de concentración simple, eficiente y económico puede reducir la cantidad de material vegetal transgénico requerido para producir una bioactividad dada hasta en un 97%.

[0032] Descubrimos previamente un medio para expresar transgénicamente péptidos miméticos apoA-I (p. ej., El péptido 6F) en varias plantas que incluyen tomates (véase, p. ej., Publicación PCT No: WO 2013/148214 A1). Sin

ningún paso de purificación, cuando los tomates transgénicos se liofilizaron, se molieron en polvo y se alimentaron a un modelo de dislipidemia y aterosclerosis en ratones con solo el 2,2% en peso de una dieta alta en grasas y colesterol, los tomates transgénicos redujeron significativamente la dislipidemia, inflamación y aterosclerosis en los ratones.

[0033] Esta cantidad que de la materia vegetal proporcionan una dosis diaria a los ratones de aproximadamente 40 mg/kg/día. La entrega de un doage equivalente a un humano requeriría que el humano coma aproximadamente 150 gramos de tomate en polvo liofilizado tres veces al día. Si bien esto es claramente posible, el volumen de tomate en polvo requerido sería de aproximadamente 3 tazas tres veces al día. Los métodos de concentración descritos en el presente documento reducen el volumen de materia vegetal (p. ej., tomate en polvo) requerido a solo 3 - 4% de ese volumen. Tal disminución dramática en el volumen hará que el cumplimiento sea mucho más probable para los pacientes.

Métodos para concentrar la actividad de Apolipoproteína A-I de péptidos expresados en plantas transgénicas.

[0034] En diversas realizaciones, los métodos de la actividad de la concentración de ApoA-I comprende proporcionar un tejido de transgénicos de planta que expresa uno o más péptidos que tienen una actividad ApoA-I que se presta el tejido como sustancialmente seco en polvo. El polvo se mezcla con una solución que comprende acetato de etilo y ácido acético o con una solución que comprende lactato de etilo y ácido láctico, para formar una mezcla de extracción. En diversas realizaciones, la mezcla se incuba (p. ej., a temperatura ambiente o a una temperatura elevada (p. ej., hasta aproximadamente 30°C, o hasta aproximadamente 35°C, o hasta aproximadamente 37°C o 38°C, o hasta aproximadamente 40°C) durante al menos 1 minuto, o al menos aproximadamente 5 minutos, o al menos aproximadamente 10 minutos, o al menos aproximadamente 15 minutos, o al menos aproximadamente 1/2 hora, o al menos aproximadamente 1 hora, o al menos aproximadamente 2 horas, o al menos aproximadamente 3 horas, o al menos aproximadamente 4 horas, o al menos aproximadamente 5 horas, o al menos aproximadamente 6 horas, o al menos aproximadamente 7 horas, o al menos aproximadamente 8 horas, o al menos aproximadamente 12 horas, o al menos aproximadamente 18 horas, o al menos aproximadamente 24 horas, o al menos aproximadamente 48 horas, o al menos aproximadamente 72 horas, o al menos aproximadamente 96 horas. En ciertas realizaciones, la mezcla puede ser agitada durante el período de incubación.

[0035] en ciertas realizaciones de la incubación se encuentra en una solución que comprende acetato de etilo y ácido acético. en ciertas formas de realización esta solución comprende de aproximadamente 1% a ácido acético aproximadamente 25%, o r aproximadamente 2% a aproximadamente 20% de ácido acético, o aproximadamente 3% a aproximadamente 15% de ácido acético, o aproximadamente 4% a aproximadamente 10% de ácido acético, o aproximadamente 4% a aproximadamente 8% de ácido acético, o de aproximadamente 4% a aproximadamente 6% de ácido acético, o aproximadamente 5% de ácido acético.

[0036] En ciertas realizaciones de la incubación se encuentra en una solución que comprende lactato de etilo y ácido láctico. En ciertas realizaciones, esta solución comprende aproximadamente 1% a aproximadamente 25% de ácido láctico, o aproximadamente 2% a aproximadamente 20% de ácido láctico, o aproximadamente 3% a aproximadamente 15% de ácido láctico, o aproximadamente 4% a aproximadamente 10% de ácido láctico, o aproximadamente 4% a aproximadamente 8% de ácido láctico, o de aproximadamente 4% a aproximadamente 6% de ácido láctico, o aproximadamente 5% de ácido láctico.

[0037] Después de la incubación, la fase líquida de la mezcla se recogió y se secó para proporcionar un polvo seco concentrado extracto que muestra la actividad biológica del péptido mimético de apoA-I. En ciertas realizaciones, esta recolección y secado pueden comprender secar la fase líquida para producir un residuo seco y, opcionalmente, resuspender dicho residuo en agua (p. ej., agua destilada, agua desionizada, agua de calidad alimentaria) o un tampón para proporcionar una mezcla resuspendida; y opcionalmente secar la mezcla resuspendida para proporcionar el extracto de polvo seco.

[0038] En diversas realizaciones las operaciones de secado se puede realizar usando cualquier procedimiento de secado convencional, incluyendo, pero no limitado a la liofilización, secado a temperatura ambiente (p. ej., bajo un gas seco tal como argón), secado a temperatura elevada, el secado a baja presión y similares.

[0039] El extracto resultante opcionalmente se puede componer con cualquiera de los componentes comestibles para administración a un sujeto.

[0040] En diversas realizaciones, el extracto resultante proporciona una actividad ApoA-I al menos 5 veces mayor por unidad de peso o al menos 10 veces mayor por unidad de peso, o al menos 15 veces mayor por unidad de peso o al menos 20 veces mayor por unidad peso que la actividad ApoA-I del material de partida de tejido vegetal seco. Las actividades ilustrativas de ApoA-I incluyen, pero no se limitan a, producir una disminución en los niveles plasmáticos de ácido liofosfatídico (LPA), y/o producir una disminución en el nivel de SAA, y/o que produce un aumento en la actividad de paroxonasa plasmática en un modelo de ratón (p. ej., como se describe aquí).

[0041] Mientras que el protocolo de concentración se ilustra con respecto a una planta de tomate transgénica que

expresa un péptido 6F heterólogo, se cree que los mismos protocolos pueden ser utilizados eficazmente con cualquiera de un número de otras plantas/tejidos de la planta que expresa uno cualquiera o más péptidos que tienen actividad de ApoA-I.

[0042] Por lo tanto, en diversas formas de realización el tejido de planta transgénica comprende un tejido de una planta transgénica, tales como tomates, zanahorias, patatas, manzanas, peras, ciruelas, melocotones, naranjas, kiwis, papayas, piñas, guayaba, lilikoi, carambola, lichi, mango, uva, granada, hojas de mostaza, col rizada, acelgas, lechuga, soja, arroz, maíz y otros granos (p. ej., trigo, arroz, cebada, bulgur, faro, kamut, kañiwa, mijo, avena, quinua, arroz, centeno, sorgo, espelta, teff, triticale y similares), bayas como fresas, arándanos, moras, bayas de goji y frambuesas, plátano, arroz, nabo, maíz, uva, higo, ciruela, papa, semillas de cártamo, nueces (p. ej., almendras, nueces, maní, anacardos, macademia, avellanas, etc.), legumbres (p. ej., alfalfa, trébol, guisantes, frijoles (incluidos los frijoles negros), lentejas, altramuces, mezquite, algarroba, soja y similares) En ciertas realizaciones, la planta se selecciona del grupo que consiste en tomate, arroz, tabaco, nabo, maíz, maíz, soja, uva, higo, ciruela, patata, zanahoria, granada, hojas de mostaza, acelga, col rizada, lechuga, brócoli y semillas de cártamo.

[0043] En ciertas realizaciones, el tejido de la planta transgénica comprenden una fruta (p. ej., un tomate). En ciertas realizaciones, el tejido de la planta transgénica comprende una semilla, una hoja, una raíz, un tubérculo, una flor y similares.

Miméticos de ApoA-I y otros péptidos para expresión en plantas y concentración usando los métodos descritos en este documento.

[0044] Habiendo demostrado que el péptido 6F cuando se expresa en una planta (p. ej., un tomate) muestra actividad biológica significativa cuando la planta o parte de planta se alimenta a un mamífero sin purificación del péptido lejos del tejido de la planta, y una actividad sustancialmente mayor cuando se concentra usando los métodos descritos anteriormente, se cree que se puede obtener un resultado similar con cualquiera de una serie de otros péptidos terapéuticos que comprenden o consisten en dominios que son secuencias de péptidos terapéuticos y estos resultados se pueden obtener por expresión de péptido(s) en otras plantas, p. ej., como se describe en este documento y en la Publicación PCT No: WO 2013/148214 A1 y en Chattopadhyay et al. (2013) J. Lipid Res., 54: 995-10101, y Navab et al. (2013) J. Lipid Res., 54: 3403-3418.

[0045] En ciertas realizaciones estos péptidos incluyen, pero no se limitan a la péptidos helicoidales anfipáticos de clase A, miméticos de péptidos helicoidales anfipáticos de clase A de apoA-I teniendo los residuos aromáticos o alifáticos en la cara no polar, ApoJ (péptidos G*), péptidos apoE, y similares, y péptidos miméticos, p. ej., como se describe a continuación.

Péptidos miméticos de ApoA-I.

[0046] En ciertas realizaciones los péptidos expresados en una planta transgénica comprenden o consisten de apoA-I miméticos de péptidos. En ciertas realizaciones, tales péptidos incluyen, pero no se limitan a, péptidos helicoidales anfipáticos de clase A, p. ej., como se describe en la Patente de Estados Unidos 6,664,230 y las Publicaciones PCT WO 02/15923 y WO 2004/034977. 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 aquí.

[0047] Los péptidos de clase A se caracterizan por formación de un α -hélice que produce una segregación de residuos polares y no polares formando de este modo una cara polar y no polar con los residuos cargados positivamente que residen en la interfaz polar-polar y los residuos cargados negativamente que residen en el centro de la cara polar (véase, p. ej., Anantharamaiah (1986) Meth. Enzymol, 128: 626-668). Se hace notar que el cuarto exón de apo A-I, cuando se pliega en 3,667 residuos/giro produce una clase de una estructura helicoidal anfipática.

[0048] Actividad biológica significativa ha sido demostrada para varios péptidos miméticos de apoA-I incluyendo, pero no limitado a, los péptidos designado 4F, retro (4F inversa), 5F, 6F, y similares. Varios péptidos de clase A inhibieron el desarrollo de lesiones en ratones susceptibles a la aterosclerosis. Además, los péptidos muestran grados de eficacia variables, pero significativos, para mitigar uno o más síntomas de las diversas patologías descritas en el presente documento. Varios de estos péptidos descritos en las solicitudes de patente PCT Nos: PCT/US2001/026497 (WO 2002/015923), PCT/US2003/032442 (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 que se muestra en la Tabla 1 o la secuencia inversa.

Tabla 1. Ciertos péptidos miméticos de ApoA-I que pueden expresarse en plantas transgénicas, p. ej., 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. Por lo tanto, p. ej., cuando se muestra la secuencia de péptidos 6F DWLKAIFYDKFFKEFFKEFF (SEQ ID NO: 1), también se contempla la secuencia de aminoácidos retro FFEKFKEFFKDYFAKLWD (SEQ ID NO: 2).

Nombre del péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
18A	DWLKAFYDKVAEKLKEAF	7
2F	DWLKAFYDKVAEKLKEAF	7
3F	DWFKAFYDKVAEKLKEAF	8
3F14	DWLKAFYDKVAEKFKEAF	9
4F	DWFKAFYDKVAEKFKEAF	3
5F	DWLKAFYDKVFEKFKEFF	10
6F	DWLKAFYDKFFEKFKEFF	1
7F	DWFKAFYDKFFEKFKEFF	11
	DWLKAFYDKVAEKLKEFF	12
Rev18A	FAEKLKEAVKDYFAKLWD	13
Rev2F	FAEKLKEAVKDYFAKLWD	13
Ref3F	FAEKLKEAVKDYFAKFWD	14
Rev4F	FAEKFKEAVKDYFAKFWD	4
Rev5F	FFEKFKEFVKDYFAKLWD	15
Rev6F	FFEKFKEFFKDYFAKLWD	2
Rev7F	FFEKFKEFFKDYFAKFWD	16
	DWLKAFYDKVFEKFKEAF	17
	DWLKAFYDKVFEKLKEFF	18
	DWLKAFYDKVAEKFKEFF	19
	DWLKAFYDKVFEKFKEFF	10
	EWLKLFYEKVLKFKKEAF	20
	EWLKAFYDKVAEKFKEAF	21
	EWLKAFYDKVAEKLKEFF	22
	EWLKAFYDKVFEKFKEAF	23
	EWLKAFYDKVFEKLKEFF	24
	EWLKAFYDKVAEKFKEFF	25
	EWLKAFYDKVFEKFKEFF	26
	AFYDKVAEKLKEAF	27
	AFYDKVAEKFKEAF	28
	AFYDKVAEKFKEAF	28
	AFYDKFFEKFKEFF	29
	AFYDKFFEKFKEFF	29
	AFYDKVAEKFKEAF	28
	AFYDKVAEKLKEFF	30
	AFYDKVFEKFKEAF	31
	AFYDKVFEKLKEFF	32
	AFYDKVAEKFKEFF	33
	KAFYDKVFEKFKEF	34
	LFYEKVLKFKKEAF	35
	AFYDKVAEKFKEAF	28
	AFYDKVAEKLKEFF	30
	AFYDKVFEKFKEAF	31
	AFYDKVFEKLKEFF	32
	AFYDKVAEKFKEFF	33
	AFYDKVFEKFKEFF	36
	DWLKALYDKVAEKLKEAL	37

(Continuación)

	Nombre del péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
5		DWFKAFYEKVAEKLKEFF	38
		DWFKAFYEKFFEKFKEFF	39
		EWLKALYEKVAEKLKEAL	40
10		EWLKAFYEKVAEKLKEAF	41
		EWFKAFYEKVAEKLKEFF	42
		EWLKAFYEKVFKEKFKEFF	43
		EWLKAFYEKFFEKFKEFF	44
15		EWFKAFYEKFFEKFKEFF	45
		DFLKAWYDKVAEKLKEAW	46
		EFLKAWYEKVAEKLKEAW	47
20		DFWKAWYDKVAEKLKEWW	48
		EFWKAWYEKVAEKLKEWW	49
		DKLKAFYDKVFEWAKEAF	50
		DKWKAVYDKFAEAFKEFL	51
25		EKLKAFYEKVFWEAKEAF	52
		EKWKAVYEKFAEAFKEFL	53
		DWLKAFVDKFAEKFEAY	54
		EKWKAVYEKFAEAFKEFL	53
30		DWLKAFVYDKVFKLKEFF	55
		EWLKAFVYEKVFKLKEFF	56
		DWLRAFYDKVAEKLKEAF	57
		EWLRAFYEKVAEKLKEAF	58
35		DWLKAFYDRVAEKLKEAF	59
		EWLKAFYERVAEKLKEAF	60
		DWLKAFYDKVAERLKEAF	61
		EWLKAFYEKVAERLKEAF	62
40		DWLKAFYDKVAEKLREAF	63
		EWLKAFYEKVAEKLREAF	64
		DWLKAFYDRVAERLKEAF	65
45		EWLKAFYERVAERLKEAF	66
		DWLRAFYDKVAEKLREAF	67
		EWLRAFYEKVAEKLREAF	68
		DWLRAFYDRVAEKLKEAF	69
50		EWLRAFYERVAEKLKEAF	70
		DWLKAFYDKVAERLREAF	71
		EWLKAFYEKVAERLREAF	72
		DWLRAFYDKVAERLKEAF	74
55		EWLRAFYEKVAERLKEAF	74
		DWLKAFYDKVAEKLKEAF <u>P</u> DWLKAFYD KVAEKLKEAF	75
60		DWLKAFYDKVAEKLKEFF <u>P</u> DWLKAFYD KVAEKLKEFF	76
		DKLKAFYDKVFEWAKEAF <u>P</u> DKLKAFYD KVFEWLKEAF	77

65

(Continuación)

Nombre del péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
	DKLKAFYDKVFEWAKEAF <u>P</u> DKLKAFYD KVFEWLKEAF	78
	DKWKAVYDKFAEAFKEFL <u>P</u> DKWKAVYD KFAEAFKEFL	79
	DWFKAFYDKVAEKFKAEAF <u>P</u> DWFKAFYD KVAEKFKAEAF	80
	DWLKAFYDKVFKLKEFF <u>P</u> DWLKAFVY DKVFKLKEFF	81
	DWLKAFYDKFAEKFKAEFF <u>P</u> DWLKAFYD KFAEKFKAEFF	82
	EWFKAFYEKVAEKFKAEAF	83
	DWFKAFYDKVAEKFK	84
	FKAFYDKVAEKFK	85
	FKAFYEKVAEKFK	86
	FKAFYDKVAEKFK	85
	FKAFYEKVAEKFK	86
	DWFKAFYDKVAEKFKAEAF	3
	EWFKAFYEKVAEKFKAEAF	83
	AFYDKVAEKFKAEAF	28
	DWFKAFYDKVAEKFK	3
	DWLKAFYDKVFEKFKAEFF	10
	EWLKAFYEKVFEKFKAEFF	43
	AFYDKVFEKFKAEFF	36
	AFYEKVFEKFKAEFF	87
	DWLKAFYDKVFEKFK	88
	EWLKAFYEKVFEKFK	89
	LKAFYDKVFEKFK	90
	LKAFYEKVFEKFK	91
[Interruptor DE] -1-4F	E WFKAFY E KVA D KFK D AF	92
[Interruptor DE] -2-4F	E WFKAFYDKVADKFK E AF	93
[Interruptor DE] -3-4F	DWFKAFY E KVA D KFKEAF	94
[Interruptor DE] -4-4F	DWFKAFY E KVAEKFK D AF	95
4F-2	D FW KAFYDKVAEKFKAEAF	96
[Interruptor DE] -1-4F-2	E FWKAFY E KVA D KFK D AF	97
[Interruptor DE] -2-4F-2	E FWKAFYDKVADKFK E AF	98
[Interruptor DE] -3-4F-2	DFWKAFY E KVA D KFKEAF	99
[Interruptor DE] -4-4F-2	DFWKAFY E KVAEKFK D AF	100
4F-3	DWFKA YF DKVAEKFKAEAF	101
[Interruptor DE] -1-4F-5	E WFKAYF E KVADKFK D AF	102
[Interruptor DE] -2-4F-5	E WFKAYFDKVADKFK E AF	103
[Interruptor DE] -3-4F-5	DWFKAYF E KVA D KFKEAF	104
[Interruptor DE] -4-4F-5	DWFKAYF E KVAEKFK D AF	105
4F-4	DWFKAF V DK Y AEKFKAEAF	106

ES 2 754 259 T3

(Continuación)

	Nombre del péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
5	[Interruptor DE] -1-4F-4	E WFKAFV E KYA D KFK D AF	107
	[Interruptor DE] -2-4F-4	E WFKAFVDKYADKFK E AF	108
	[Interruptor DE] -3-4F-4	DWFKAFV E KYA D KFKEAF	109
10	[Interruptor DE] -4-4F	DWFKAFV E KYAEKFK D AF	110
	4-F-5	DWFKAFYDK AV EKFKAEAF	111
	[Interruptor DE] -1-4F-5	E WFKAFY E KAV D KFK D AF	112
	[Interruptor DE] -2-4F-5	E WFKAFYDKAVDKFK E AF	113
15	[Interruptor DE] -3-4F-5	DWFKAFY E KAV D KFKEAF	114
	[Interruptor DE] -4-4F-5	DWFKAFY E KAVEKFK D AF	115
	4F-6	DWFKAFYDKV F EK A KEAF	116
	[Interruptor DE] -1-4F-6	E WFKAFY E KVF D KAK D AF	117
20	[Interruptor DE] -2-4F-6	E WFKAFYDKVFDKAK E AF	118
	[Interruptor DE] -3-4F-6	DWFKAFY E KVF D KAKEAF	119
	[Interruptor DE] -4-4F-6	DWFKAFY E KVFEEKAK D AF	120
	4F-7	DWFKAFYDKVAEK A KE F F	121
25	[Interruptor DE] -1-4F-7	E WFKAFY E KVA D KAK D FF	122
	[Interruptor DE] -2-4F-7	E WFKAFYDKVADKAK E FF	123
	[Interruptor DE] -3-4F-7	DWFKAFY E KVA D KAKEFF	124
30	[Interruptor DE] -4-4F-7	DWFKAFY E KVAEKAK D FF	125
	4F-8	DWFKAFYDKVAEKFK FA	126
	[Interruptor DE] -1-4F-8	E WFKAFY E KVA D KFK D FA	127
	[Interruptor DE] -2-4F-8	E WFKAFYDKVADKFK E FA	128
35	[Interruptor DE] -3-4F-8	DWFKAFY E KVA D KFKEFA	129
	[Interruptor DE] -4-4F-8	DWFKAFY E KVAEKFK D FA	130
	4F-9	D A FKA FYDKVAEKFK E W F	131
	[Interruptor DE] -1-4F-9	E AFKAFY E KVA D KFK D WF	132
40	[Interruptor DE] -2-4F-9	E AFKAFYDKVADKFK E WF	133
	[Interruptor DE] -3-4F-9	DAFKAFY E KVA D KFKEWF	134
	[Interruptor DE] -4-4F-9	DAFKAFY E KVAEKFK D WF	135
	4F-10	D A FKA FYDKV W EKFKAEAF	136
45	[Interruptor DE] -1-4F-10	E AFKAFY E KVV D KFK D AF	137
	[Interruptor DE] -2-4F-10	E AFKAFYDKVWDKFK E AF	138
	[Interruptor DE] -3-4F-10	DAFKAFY E KVV D KFKEAF	139
50	[Interruptor DE] -4-4F-10	DAFKAFY E KVVWEKFK D AF	140
	4F-11	D Y FKA F W DKVAEKFKAEAF	141
	[Interruptor DE] -1-4F-11	E YFKAFW E KVA D KFK D AF	142
	[Interruptor DE] -2-4F-11	E YFKAFWDKVADKFK E AF	143
55	[Interruptor DE] -3-4F-11	DYFKAFW E KVA D KFKEAF	144
	[Interruptor DE] -4-4F-11	DYFKAFW E KVAEKFK D AF	145
	4F-12	DW A KAFYDKVAEKFK F F	146
	[Interruptor DE] -1-4F-12	E WAKAFY E KVA D KFK D FF	147
60	[Interruptor DE] -2-4F-12	E WAKAFYDKVADKFK F F	148
	[Interruptor DE] -3-4F-12	DWAKAFY E KVA D KFKEFF	149
	[Interruptor DE] -4-4F-12	DWAKAFY E KVAEKFK D FF	150
65	4F-13	DWFKA A YDKVAEKFK F F	151

(Continuación)

	Nombre del péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
5	[Interruptor DE] -1-4F-13	E WFKAAAY E KVA D KFK D FF	152
	[Interruptor DE] -2-4F-13	E WFKAAAYDKVADKFK E FF	153
	[Interruptor DE] -3-4F-13	DWFKAAAY E KVA D KFKEFF	154
	[Interruptor DE] -4-4F-13	DWFKAAAY E KVAEKFK D FF	155
10	4F-14	DWFK A FADKVAEKFK E Y F	156
	[Interruptor DE] -1-4F-14	E WFKAFA E KVA D KFK D YF	157
	[Interruptor DE] -2-4F-14	E WFKAFADKVADKFK E YF	158
	[Interruptor DE] -3-4F-14	DWFKAFA E KVA D KFKEYF	159
	[Interruptor DE] -4-4F	DWFKAFA E KVAEKFK D YF	160
15	4F-15	DWFKAFYDK A AEKFKE V F	161
	[Interruptor DE] -1-4F-15	E WFKAFY E KAA D KFK D VF	162
	[Interruptor DE] -2-4F-15	E WFKAFYDKAADKFK E VF	163
	[Interruptor DE] -3-4F-15	DWFKAFY E KAA D KFKEVF	164
20	[Interruptor DE] -4-4F-15	DWFKAFY E KAAEKFK D VF	165
	4F-16	DW Y KAF F DKVAEKFK E AF	166
	[Interruptor DE] -1-4F-16	E WYKAFF E KVA D KFK D AF	167
	[Interruptor DE] -2-4F-16	E WYKAFFDKVADKFK E AF	168
	[Interruptor DE] -3-4F-16	DWYKAFF E KVA D KFKEAF	169
25	[Interruptor DE] -4-4F-16	DWYKAFF E KVAEKFK D AF	170
	4F-17	DW V KAFYDK F AEKFKEAF	171
	[Interruptor DE] -1-4F-17	E WVKAFFY E KFA D KFK D AF	172
	[Interruptor DE] -2-4F-17	E WVKAFFYDKFADKFK E AF	173
	[Interruptor DE] -3-4F-17	DWVKAFFY E KFA D KFKEAF	174
30	[Interruptor DE] -4-4F-17	DWVKAFFY E KFAEKFK D AF	175
	4F-18	DWFKAF F DKVAEK Y KEAF	176
	[Interruptor DE] -1-4F-18	E WFKAFF E KVA D KYK D AF	177
	[Interruptor DE] -2-4F-18	E WFKAFFDKVADKYK E AF	178
35	[Interruptor DE] -3-4F-18	DWFKAFF E KVA D KYKEAF	179
	[Interruptor DE] -3-4F-18	DWFKAFF E KVA D KYKEAF	180
	4F-19	DWFKAF F DKVAEKFK E A Y	181
	[Interruptor DE] -1-4F-19	E WFKAFF E KVA D KFK D AY	182
	[Interruptor DE] -2-4F-19	E WFKAFFDKVADKFK E AY	183
40	[Interruptor DE] -3-4F-19	DWFKAFF E KVA D KFKEAY	184
	[Interruptor DE] -4-4F-19	DWFKAFF E KVAEKFK D AY	185
	4F-20	DWFKAFYDKFAEK F KEA V	186
	[Interruptor DE] -1-4F-20	E WFKAFY E KFA D KFK D AV	187
	[Interruptor DE] -2-4F-20	E WFKAFYDKFADKFK E AV	188
45	[Interruptor DE] -3-4F-20	DWFKAFY E KFA D KFKEAV	189

(Continuación)

Nombre del péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
[Interruptor DE] -4-4F-20	DWFKAFY E KFAEKFK D AV	190
4F-21	D K FKAFYDKVAEKF W EAF	191
[Interruptor DE] -1-4F-21	E KFKAFY E KVA D KFW D AF	192
[Interruptor DE] -2-4F-21	E KFKAFYDKVADKFW E AF	193
[Interruptor DE] -3-4F-21	DKFKAFY E KVA D KFW EAF	194
[Interruptor DE] -4-4F-21	DKFKAFY E KVAEKFW D AF	195
4F-22	D KW KAFYDKVAEKF F EAF	196
[Interruptor DE] -1-4F-22	E KWKAFY E KVA D KFF D AF	197
[Interruptor DE] -2-4F-22	E KWKAFYDKVADKFF E AF	198
[Interruptor DE] -3-4F-22	DKWKAFY E KVA D KFFEAF	199
[Interruptor DE] -4-4F-22	DKWKAFY E KVAEKFF D AF	200
4F-23	D K FKAFYDK W AE V FKEAF	201
[Interruptor DE] -1-4F-23	E KFKAFY E KWA D VFK D AF	202
[Interruptor DE] -2-4F-23	E KFKAFYDKWADVFK E AF	203
[Interruptor DE] -3-4F-23	DKFKAFY E KWA D VFKEAF	204
[Interruptor DE] -4-4F-23	DKFKAFY E KWA EVFK D AF	205
4F-24	D K FKAFYDKVAE FW KEAF	206
[Interruptor DE] -1-4F-24	E KFKAFY E KVA D FWK D AF	207
[Interruptor DE] -2-4F-24	E KFKAFYDKVADFWK E AF	208
[Interruptor DE] -3-4F-24	DKFKAFY E KVA D FWKEAF	209
[Interruptor DE] -4-4F-24	DKFKAFY E KVAEFWK D AF	210
Rev-4F	FAEKFK EAVKDYFAKFW	4
[Interruptor DE] -1-Rev-4F	FA D KFK D AVK E YFAKFW E	211
[Interruptor DE] -2-Rev-4F	FA D KFKEAVKDYFAKFW E	212
[Interruptor DE] -3-Rev-4F	FAEKFK D AVK E YFAKFW	213
[Interruptor DE] -4-Rev-4F	FAEKFK D AVKDYFAKFW E	214
Rev-4F-1	F W EKFK EAVKDYFAKF A D	215
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-1	FW D KFK D AVK E YFAKFA E	216
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-1	FA D KFKEAVKDYFAKFW E	212
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-1	FAEKFK D AVK E YFAKFW	213
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-1	FAEKFK D AVKDYFAKFW E	214
Rev-4F-2	F F EKFK EAVKDYFAK A WD	217
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-2	FF D KFK D AVK E YFAKAW E	218
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-2	FF D KFKEAVKDYFAKAW E	219
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-2	FFEKFK D AVK E YFAKAW	220
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-2	FFEKFK D AVKDYFAKAW E	221
Rev-4F-3	FAEK A KE F VKDYFAKFW	222
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-3	FA D KAK D FVK E YFAKFW E	223

(Continuación)

5		Nombre del péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
		[Interruptor DE] -2-Rev-4F-3	FA D KAKEFVKDYFAKFW E	224
		[Interruptor DE] -3-Rev-4F-3	FAEKAK D FVK E YFAKFWD	225
		[Interruptor DE] -4-Rev-4F-3	FAEKAK D FVKDYFAKFW E	226
10		Rev-4F-4	FAEKFKE VA KDYFAKFWD	227
		[Interruptor DE] -1-Rev-4F-4	FA D KFK D VAK E YFAKFW E	228
		[Interruptor DE] -2-Rev-4F-4	FA D KFKEVAKDYFAKFW E	229
		[Interruptor DE] -3-Rev-4F-4	FAEKFK D VAK E YFAKFWD	230
		[Interruptor DE] -4-Rev-4F-4	FAEKFK D VAKDYFAKFW E	231
15		Rev-4F-5	FAEKFKEA Y KD V FAKFWD	232
		[Interruptor DE] -1-Rev-4F-5	FA D KFK D AYK E VFAKFW E	233
		[Interruptor DE] -2-Rev-4F-5	FA D KFKEAYKDYFAKFW E	234
		[Interruptor DE] -3-Rev-4F-5	FAEKFK D AYK E VFAKFWD	235
20		[Interruptor DE] -4-Rev-4F-5	FAEKFK D AYKDYFAKFW E	236
		Rev-4F-6	FAEKFKEAVKD FY AKFWD	237
		[Interruptor DE] -1-Rev-4F-6	FA D KFK D AVK E FYAKFW E	238
		[Interruptor DE] -2-Rev-4F-6	FA D KFKEAVKDYFAKFW E	239
		[Interruptor DE] -3-Rev-4F-6	FAEKFK D AVK E FYAKFWD	240
25		[Interruptor DE] -4-Rev-4F-6	FAEKFK D AVKDYFAKFW E	241
		Rev-4F-7	FAEK F W EAVKDYFAK F K D	242
		[Interruptor DE] -1-Rev-4F-7	FA D KFW D AVK E YFAKFK E	243
		[Interruptor DE] -2-Rev-4F-7	FA D KFWEAVKDYFAKFK E	244
		[Interruptor DE] -3-Rev-4F-7	FAEKFW D AVK E YFAKFKD	245
30		[Interruptor DE] -4-Rev-4F-7	FAEKFW D AVKDYFAKFK E	246
		Rev-4F-8	AF EKFKEAVKDYFAKFWD	247
		[Interruptor DE] -1-Rev-4F-8	AF D KFK D AVK E YFAKFW E	248
		[Interruptor DE] -2-Rev-4F-8	AF D KFKEAVKDYFAKFW E	249
35		[Interruptor DE] -3-Rev-4F-8	AFEKFK D AVK E YFAKFWD	250
		[Interruptor DE] -4-Rev-4F-8	AFEKFK D AVKDYFAKFW E	251
		Rev-F-9	V AEKFKEA F KDYFAKFWD	252
		[Interruptor DE] -1-Rev-4F-9	VA D KFK D AFK E YFAKFW E	253
		[Interruptor DE] -2-Rev-4F-9	VA D KFKEAFKDYFAKFW E	254
40		[Interruptor DE] -3-Rev-4F-9	VAEKFK D AFK E YFAKFWD	255
		[Interruptor DE] -4-Rev-4F-9	VAEKFK D AFKDYFAKFW E	256
		Rev-4F-10	Y AEKFKEAVKD F FAKFWD	257
		[Interruptor DE] -1-Rev-4F-10	YA D KFK D AVK E FFAKFW E	258
		[Interruptor DE] -2-Rev-4F-10	YA D KFKEAVKDFFAKFW E	259
45		[Interruptor DE] -3-Rev-4F-10	YAEKFK D AVK E FFAKFWD	260
		[Interruptor DE] -4-Rev-4F-10	YAEKFK D AVKDFFAKFW E	261

50

55

60

65

(Continuación)

Nombre del péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
Rev-4F-11	A AEKFKE F VKDYFAKFW D	262
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-11	AA D KFK D FVK E YFAKFW E	263
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-11	AA D KFKEFVKDYFAKFW E	264
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-11	AAEKFK D FVK E YFAKFW D	265
Interruptor DE] -4-Rev-4F-11	AAEKFK D FVKDYFAKFW E	266
Rev-4F-12	F F EK A KEAVKDYFAKFW D	267
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-12	FF D KAK D AVK E YFAKFW E	268
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-12	FF D KAKEAVKDYFAKFW E	269
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-12	FFEKAK D AVK E YFAKFW D	270
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-12	FFEKAK D AVKDYFAKFW E	271
Rev-4F-13	F Y EKFKAEVKD A FAKFW D	272
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-13	FY D KFK D AVK E AFAKFW E	273
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-13	FY D KFKEAVKDAFAKFW E	274
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-13	FYEKFK D AVK E AFAKFW D	275
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-13	FYEKFK D AVKDAFAKFW E	276
Rev-4F-14	F V EKFKEA A KDYFAKFW D	277
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-14	FV D KFK D AAK E YFAKFW E	278
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-14	FV D KFKEAAKDYFAKFW E	279
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-14	FVEKFK D AAK E YFAKFW D	280
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-14	FVEKFK D AAKDYFAKFW E	281
Rev-4F-15	FAEK Y KEAVKD F FAKFW D	282
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-15	FA D KYK D AVK E FFAKFW E	283
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-15	FA D KYKEAVKDFFAKFW E	284
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-15	FAEKYK D AVK E FFAKFW D	285
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-15	FAEKYK D AVKDFFAKFW E	286
Rev-4F-16	FAEK V KEA F KDYFAKFW D	287
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-16	FA D KVK D AFK E YFAKFW E	288
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-16	FA D KVKEAFKDYFAKFW E	289
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-16	FAEKVK D AFK E YFAKFW D	290
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-16	FAEKVK D AFKDYFAKFW E	291
Rev-4F-17	FAEKFK E Y VKD A FAKFW D	292
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-17	FA D KFK D YVK E AFAKFW E	293
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-17	FA D KFKEYVKDAFAKFW E	294
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-17	FAEKFK D YVK E AFAKFW D	295
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-17	FAEKFK D YVKDAFAKFW E	296
Rev-4F-18	FAEKFKEA F KDY V AKFW D	297
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-18	FA D KFK D AFK E YVAKFW E	298
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-18	FA D KFKEAFKDYVAKFW E	299

(Continuación)

Nombre del péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-18	FAEKFK D AFK E YVAKFWD	300
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-18	FAEKFK D AFKDYVAKFW E	301
Rev-4F-19	FAEKFKEA F KDYFAK V WD	302
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-19	FA D KFK D AFK E YFAKVV E	303
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-19	FA D KFKEAFKDYFAKVV E	304
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-19	FAEKFK D AFK E YFAKVWD	305
Interruptor DE] -4-Rev-4F-19	FAEKFK D AFKDYFAKVV E	306
Rev-4F-20	FAEKFKEAVKD F FAK Y WD	307
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-20	FA D KFK D AVK E FFAKYW E	308
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-20	FA D KFKEAVKDFFAKYW E	309
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-20	FAEKFK D AVK E FFAKYWD	310
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-20	FAEKFK D AVKDFFAKYW E	311
Rev-4F-21	W AEK F FEAVKDYFAKF K D	312
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-7	WA D KFF D AVK E YFAKFK E	313
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-7	WA D KFFEAVKDYFAKFK E	314
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-7	WAEKFF D AVK E YFAKFKD	315
Interruptor DE] -4-Rev-4F-7	WAEKFF D AVKDYFAKFK E	316
Rev-4F-22	FAEK W F EAVKDYFAKF K D	317
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-22	FA D KWF D AVK E YFAKFK E	318
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-22	FA D KWFEAVKDYFAKFK E	319
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-22	FAEKWF D AVK E YFAKFKD	320
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-22	FAEKWF D AVKDYFAKFK E	321
Rev-4F-23	FAEK V EA W KDYFAKF K D	322
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-23	FA D KVF D AWK E YFAKFK E	323
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-23	FA D KFVEAVKDYFAKFK E	324
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-23	FAEKVF D AWK E YFAKFKD	325
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-23	FAEKVF D AVKDYFAKFK E	326
Rev-4F-24	F Y EK F A EAVKD W FAKF K D	327
[Interruptor DE] -1-Rev-4F-24	FY D KFA D AVK E WFAKFK E	328
[Interruptor DE] -2-Rev-4F-24	FY D KFAEAVKDWFAKFK E	329
[Interruptor DE] -3-Rev-4F-24	FYEKFA D AVK E WFAKFKD	330
[Interruptor DE] -4-Rev-4F-24	FYEKFA D AVKDWFAKFK E	331
[A-5 >H] 4F	DWFK H FYDKVAEKFKAEF	332
[A-5 >H, DE conmutado] 4F	E WFK H FY E KVA D KFK D AF	333
[A-5 >H, D-1 >E] 4F	E WFK H FYDKVAEKFKAEF	334
[A-5 >H, D-8 >E] 4-F	DWFK H FY E KVAEKFKAEF	335
[A-5 >H, E-12 >D] 4F	DWFK H FYDKVA D KFKEAF	336
[A-5 >H, E-16 >D] 4F	DWFK H FYDKVAEKFK D AF	337

(Continuación)

5		Nombre del péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
		[F-3 >H, A-5 >F] -4F	DW H K F F YDKVAEKFKKEAF	338
		[F-3 >H, A-5 >F, DE conmutado] -4F	E W H K F F Y E KVA D KFK D AF	339
10		[F-3 >H, A-5 >F, D-1 >E] -4F	E W H K F F YDKVAEKFKKEAF	340
		[F-3 >H, A-5 >F, D-8 >E] -4F	DW H K F F Y E KVAEKFKKEAF	341
		[F-3 >H, A-5 >F, E-12 >D] -4F	DW H K F F YDKVA D KFKKEAF	342
		[F-3 >H, A-5 >F, E-16 >D] -4F	DW H K F F YDKVAEKFK D AF	343
		[A-5 >F, F-6 >H] 4F	DWFK FH YDKVAEKFKKEAF	344
15		[A-5 >F, F-6 >H, DE conmutado] 4F	E WFK FH Y E KVA D KFK D AF	345
		[[A-5 >F, F-6 >H, D-1 >E] 4F	E WFK FH YDKVAEKFKKEAF	346
		[A-5 >F, F-6 >H, D-8 >E] 4F	DWFK FH Y E KVAEKFKKEAF	347
		[A-5 >F, F-6 >H, E-12 >D] 4F	DWFK FH Y D KVADKFKKEAF	348
20		[A-5 >F, F-6 >H, E-16 >D] 4F	DWFK FH YDKVAEKFK D AF	349
		[A-5 >V, V-10 >H] 4F	DWFK V FYDK H AEKFKKEAF	350
		[A-5 >V, V-10 >H, DE conmutado] 4F	E WFK V FY E K H A D KFK D AF	351
25		[A-5 >V, V-10 >H, D-1 >E] 4F	E WFK V FYDK H AEKFKKEAF	352
		[A-5 >V, V-10 >H, D-8 >E] 4F	DWFK V FY E K H AEKFKKEAF	353
		[A-5 >V, V-10 >H, E-12 >D] 4F	DWFK V FYDK H A D KFKKEAF	354
		[A-5 >V, V-10 >H, E16 >D] 4F	DWFK V FYDK H AEKFK D AF	355
30		[[A-17 >H] 4F	DWFKAFYDKVAEKFK E H F	356
		[A-17 >H, DE conmutado] 4F	E WFKAFY E KVA D KFK DH F	357
		[[A-17 >H, D-1 >E] 4F	E WFKAFYDKVAEKFK E H F	358
		[[A-17 >H, D-8 >E] 4F	DWFKAFY E KVAEKFK E H F	359
		[[A-17 >H, E-12 >D] 4F	DWFKAFYDKVA D KFK E H F	360
35		[[A-17 >H, E16 >D] 4F	DWFKAFYDKVAEKFK DH F	361
		[A-17 >F, F-18 >H] 4F	DWFKAFYDKVAEKFK FH	362
		[A-17 >F, F-18 >H, DE conmutado] 4F	E WFKAFY E KVA D KFK DFH	363
40		[A-17 >F, F-18 >H, D-1 >E] -4F	E WFKAFYDKVAEKFK E FH	364
		[A-17 >F, F-18 >H] 4F	DWFKAFYDKVAEKFK E FH	365
		[A-17 >F, F-18 >H, D-8 >E] -4F	DWFKAFY E KVAEKFK E FH	366
45		[A-17 >F, F-18 >H, E-12 >D] 4F	DWFKAFYDKVAEKFK E FH	367
		[A-17 >F, F-18 >H], E-16 >D] -4F	DWFKAFYDKVAEKFK DFH	368

(Continuación)

5	Nombre del péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
	Rev-4F	FAEKFKAEAVKDYFAKFW	4
	[A-2 >H] Rev-4F	F H EKFKEAVKDYFAKFW	369
	Rev- [A-2 >H, D >E] -4F	F H EKFKEAVK E YFAKFW E	370
10	Rev- [A-2 >H, E >D] 4F	F HD KFK D AVKDYFAKFW	371
	[A-2 >H, DE conmutado] Rev- 4F	F HD KFK D AVK E YFAKFW E	372
	[A-2 >H, E-3 >D] Rev-4F	F HD KFKEAVKDYFAKFW	373
	[A-2 >H, E-7 >D] Rev-4F	F H EKFK D AVKDYFAKFW	374
15	[A-2 >H, D-11 >E] Rev-4F	F H EKFKEAVK E YFAKFW	375
	[A-2 >H, D-18 >E] Rev-4F	F H EKFKEAVKDYFAKFW E	376
	[F-1 >H, A-2 >F] Rev-4F	HF EKFKEAVKDYFAKFW	377
20	[F-1 >H, A-2 >F, DE conmutado] Rev-4F	HFD KFK D AVK E YFAKFW E	378
	[F-1 >H, A-2 >F, D >E] Rev-4F	HF EKFKEAVK E YFAKFW E	379
	[F-1 >H, A-2 >F, E-3 >D] Rev- 4F	HFD KFKEAVKDYFAKFW	380
25	[F-1 >H, A-2 >F, E-7 >D] Rev- 4F	HF EKFK D AVKDYFAKFW	381
	[F-1 >H, A-2 >F, D-11 >E] Rev-4F	HF EKFKEAVK E YFAKFW	382
30	[F-1 >H, A-2 >F, D-18 >E] Rev-4F	HF EKFKEAVKDYFAKFW E	383
	[A-2 >F, F-5 >H] Rev D-4F	F F EK H KEAVKDYFAKFW	384
	[A-2 >F, F-5 >H, DE conmutado] Rev D-4F	F FD K H K D AVK E YFAKFW E	385
35	[A-2 >F, F-5 >H, D >E] Rev D-4F	F F EK H KEAVK E YFAKFW E	386
	[A-2 >F, F-5 >H, E >D] Rev D- 4F	F FD K H K D AVK D YFAKFW	387
	[A-2 >F, F-5 >H, E-3 >D] Rev D-4F	F FD K H KEAVKDYFAKFW	388
40	[A-2 >F, F-5 >H, D-11 >E] Rev D-4F	F F EK H KEAVK E YFAKFW	389
	[A-2 >F, F-5 >H, D-18 >E] Rev D-4F	F F EK H KEAVKDYFAKFW	390
45	[A-2 >V, V-9 >H] Rev D-4F	F V EKFKEA H KDYFAKFW	391
	[A-2 >V, V-9 >H, DE conmutado] Rev D-4F	F VD KFK D A H K E YFAKFW E	392
	[A-2 >V, V-9 >H, D >E] Rev D-4F	F V EKFKEA H K E YFAKFW E	393
50	[A-2 >V, V-9 >H, E >D] Rev D-4F	F VD KFK D A H KDYFAKFW	394

55

60

65

(Continuación)

5	Nombre del péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
	[A-2 >V, V-9 >H, E-3 >D] Rev D-4F	F VD KFKEA H KDYFAKFW D	395
10	[A-2 >V, V-9 >H, E-7 >D] Rev D-4F	F V EKFK D A H KDYFAKFW D	396
	[A-2 >V, V-9 >H, D-11 >E] Rev D-4F	F V EKFKEA H K E YFAKFW D	397
	[A-2 >V, V-9 >H, D-18 >E] Rev D-4F	F V EKFKEA H KDYFAKFW E	398
15	[A-8 >H] Rev-4F	FAEKFK H VKDYFAKFW D	399
	[A-8 >H, DE conmutado] Rev- 4F	FA D KFK DH VK E YFAKFW E	400
	[A-8 >H, D >E] Rev-4F	FAEKFK H VK E YFAKFW E	401
20	[A-8 >H, E >D] Rev-4F	FA D KFK DH VKDYFAKFW D	402
	[A-8 >H, E-3 >D] Rev-4F	FA D KFKE H VKDYFAKFW D	403
	[A-8 >H, E-7 >D] Rev-4F	FAEKFK DH VKDYFAKFW D	404
	[A-8 >H, D-11 >E] Rev-4F	FAEKFK H VK E YFAKFW D	405
	[A-8 >H, D-18 >E] Rev-4F	FAEKFK H VKDYFAKFW E	406
25	[A-8 >F, F-13 >H] Rev-4F	FAEK F KEFVKDY H AKFW D	407
	[A-8 >F, F-13 >H, DE conmutado] Rev-4F	FA D KFK DF VK E Y H AKFW E	408
	[A-8 >F, F-13 >H, E-3 >D] Rev-4F	FA D KFKE F VKDY H AKFW D	409
30	[A-8 >F, F-13 >H, E-7 >D] Rev-4F	FAEKFK DF VKDY H AKFW D	410
	[A-8 >F, F-13 >H, E >D] Rev- 4F	FA D KFK DF VKDY H AKFW D	411
35	[A-8 >F, F-13 >H, D >E] Rev- 4F	FAEKFK F VK E Y H AKFW E	412
	[A-8 >F, F-13 >H, D-11 >E] Rev-4F	FAEKFK F VK E Y H AKFW D	413
	[A-8 >F, F-13 >H, D-18 >E] Rev-4F	FAEKFK F VKDY H AKFW E	414
40	[A-8 >F, F16 >H] Rev.-4F	FAEKFK F VKDYFAK H WD	415
	[A-8 >F, F16 >H, DE conmutado] Rev. -4F	FA D KFK DF VK E YFAK H WE	416
	[A-8 >F, F16 >H, D >E] Rev.- 4F	FAEKFK F VK E YFAK H W E	417
45	[A-8 >F, F16 >H, E >D] Rev.- 4F	FA D KFK DF VKDYFAK H WD	418
	[A-8 >F, F16 >H, E-3 >D] Rev.-4F	FA D KFKE F VKDYFAK H WD	419
50	[A-8 >F, F16 >H, E-7 >D] Rev.-4F	FAEKFK DF VKDYFAK H WD	420

55

60

65

(Continuación)

	Nombre del péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
5	[A-8 >F, F16 >H, D-11 >E] Rev.-4F	FAEKFKE F VK E YFAK H WD	421
	[A-8 >F, F16 >H, D-18 >E] Rev.-4F	FAEKFKE F VKDYFAK H W E	422
	Rev- [D >E] -4F	FAEKFKEAVK E YFAKFW E	423
10	Rev- [E >D] 4F	FA D KFK D AVKDYFAKFW	424
	Rev-R4-4F	FAE R FREAVKDYFAKFW	425
	Rev-R6-4F	FAEKF R EAVKDYFAKFW	426
	Rev-R10-4F	FAEKFKEAV R DYFAKFW	427
	Rev-R14 -4F	FAEKFKEAVKDYFA R FWD	428
15	Rev- [D >E] -4F	FAEKFKEAVK E YFAKFW E	429
	Rev- [E >D] 4F	FA D KFK D AVKDYFAKFW	430
	Rev-R4-4F	FAE R FREAVKDYFAKFW	431
	Rev-R6-4F	FAEKF R EAVKDYFAKFW	432
20	Rev-R10-4F	FAEKFKEAV R DYFAKFW	433
	Rev-R14 -4F	FAEKFKEAVKDYFA R FWD	428
	Rev- [D >E] -4F	FAEKFKEAVK E YFAKFW E	434
	Rev- [E >D] 4F	FA D KFK D AVKDYFAKFW	435
	Rev-R4-4F	FAE R FREAVKDYFAKFW	436
25	Rev-R6-4F	FAEKF R EAVKDYFAKFW	437
	Rev-R10-4F	FAEKFKEAV R DYFAKFW	438
	Rev-R14 -4F	FAEKFKEAVKDYFA R FWD	428
	Rev-R4-4F	FAE R FREAVKDYFAKFW	439
30	Rev-R6-4F	FAEKF R EAVKDYFAKFW	440
	Rev-R10-4F	FAEKFKEAV R DYFAKFW	441
	Rev-R14 -4F	FAEKFKEAVKDYFA R FWD	428
	Rev- [D >E] -4F	FAEKFKEAVK E YFAKFW E	442
	Rev- [E >D] 4F	FA D KFK D AVKDYFAKFW	443
35	Rev-R4-4F	FAE R FREAVKDYFAKFW	444
	Rev-R6-4F	FAEKF R EAVKDYFAKFW	445
	Rev-R10-4F	FAEKFKEAV R DYFAKFW	446
	Rev-R14 -4F	FAEKFKEAVKDYFA R FWD	428
	Rev3F-2	LF EKFAEAFKDYVAKWKD	447
40	RevR4-3F-2	LFERFAEAFKDYVAKWKD	448
	RevR10-3F2	LF EKFAEAFRDYVAKWKD	449
	RevR15-3F-2	LF EKFAEAFKDYVARWKD	450
	Rev R17-3F-2	LF EKFAEAFKDYVAKWRD	451
45	Rev [D >E] 3F2	LF EKFAEAFKEYVAKWKE	452

(Continuación)

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Nombre del péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
Rev [E >D] 3F-2	LFDKFADAFKDYVAKWKD	453
Rev- [E3 >D] -3F-2	LFDKFAEAFKDYVAKWKD	454
Rev- [E7 >D] -3F-2	LFEKFADAFKDYVAKWKD	455
Rev [D11 >E] 3F-2	LFEKFAEAFKEYVAKWKD	456
Rev- [D18 >E] 3F-2	LFEKFAEAFKDYVAKWKE	457
Rev3F-1	FAEKAWFVKDYFAKLKD	458
RevR4-3F-1	FAERAWFVKDYFAKLKD	459
RevR10-3F-1	FAEKAWFVKDYFAKLKD	460
RevR15-3F-1	FAEKAWFVKDYFAKLKD	461
RevR17-3F-1	FAEKAWFVKDYFAKLKD	462
Rev [D >E] 3F-1	FAEKAWFVKDYFAKLKE	463
Rev [E >D] 3F-1	FADKAWDFVKDYFAKLKD	464
Rev [E3 >D] -3F -1	FADKAWFVKDYFAKLKD	465
Rev [E7 >D] 3F -1	FAEKAWDFVKDYFAKLKD	466
Rev- [D11 >E] 3F-1	FAEKAWFVKDYFAKLKD	467
Rev- [D18 >E] 3F-1	FAEKAWFVKDYFAKLK E	468
Rev-5F	FFEKFKEFVKDYFAKLWD	15
Rev- [D >E] 5F	FFEKFKEFVK E YFAKLW E	469
Rev- [E >D] 5F	FF D KFK D FVKDYFAKLWD	470
Rev-R4-5F	FFE R FKEFVKDYFAKLWD	471
Rev-R6-5F	FFEKF R EFVKDYFAKLWD	472
Rev-R10-5F	FFEKFKEFV R DYFAKLWD	473
Rev-R15-5F	FFEKFKEFVKDYFA R LWD	474
Rev- [E3 >D] -5F	FF D KFKEFVKDYFAKLWD	475
Rev- [E7 >D] 5F	FFEKF D FVKDYFAKLWD	476
Rev- [D11 >E] -5F	FFEKFKEFVK E YFAKLWD	477
Rev- [D18 >E] -5F	FFEKFKEFVKDYFAKLW E	478
Rev-5F-2	F L EKKEFVKDYFAK F WD	479
Rev- [D >E] -5F-2	FLEKFKEFVK E YFAKFW E	480
Rev- [E >D] -5F-2	FL D KFK E FVKDYFAKFW	481
Rev- [E3 >D] -5F-2	FL D KFKEFVKDYFAKFW	482
Rev- [E7 >D] -5F-2	FLEKF D FVKDYFAKFW	483
Rev- [D11 >E] -5F-2	FLEKFKEFVK E YFAKFW	484
Rev- [D18 >E] -5F-2	FLEKFKEFVKDYFAKFW E	485
Rev-R4-5F-2	FLE R FKEFVKDYFAKFW	486
Rev-R6-5F-2	FLEKF R EFVKDYFAKFW	487
RevR10-5F-2	FLEKFKEFV R DYFAKFW	488
Rev-R16-5F-2	FLEKFKEFVKDYFA R FWD	489

(Continuación)

Nombre del péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
Rev-6F	F F EK F KE FF KDYFAKLWD	2
Rev- [D >E] -6F	FFEKFKEFFK E YFAKLW E	490
Rev- [E >D] -6F	FF D KFK D FFKDYFAKLWD	491
Rev-R4-6F	FFE R FKEFFKDYFAKLWD	492
Rev-R6-6F	FFEKF R EFFFKDYFAKLWD	493
Rev-R10-6F	FFE K FKEFF R DYFAKLWD	494
Rev-R14-6F	FFERFKEFFKDYFA R LWD	495
Rev- [E3 >D] -6F	FF D KFKEFFKDYFAKLWD	496
Rev- [E7 >D] -6F	FFEKFK D FFKDYFAKLWD	497
Rev- [D11 >E] -6F	FFEKFKEFFK E YFAKLWD	498
Rev- [D18 >E] -6F	FFEKFKEFFKDYFAKLW E	499
Rev-4F	FAEKFKAEVKDYFAKFW	4
Rev- [D >E] -4F	FAEKFKAEVK E YFAKFW E	500
Rev- [E >D] 4F	FA D KFK D AVKDYFAKFW	501
Rev-R4-4F	FAE R FREAVKDYFAKFW	502
Rev-R6-4F	FAEK R EAVKDYFAKFW	503
Rev-R10-4F	FAEKFKAEV R DYFAKFW	504
Rev-R14 -4F	FAEKFKAEVKDYFA R FWD	428
4F-2	DKWKAVYDKFAEAFKEFF	505
[D >E] -4F-2	EKWKAVYEKFAEAFKEFF	506
[E >D] -4F-2	DKWKAVYDKFA D AFK D FF	507
R2-4F-2	D R WKAVYDKFAEAFKEFF	508
R4-4F-2	DKW R AVYDKFAEAFKEFF	509
R9-4F-2	DKWKAVYD R FAEAFKEFF	510
R14-4F-2	DKWKAVYDKFAEAF R EFF	511
Rev4F-2	FFEKF AEAFKDYVAKWKD	512
Rev- [D >E] -4F-2	FFEKF AEAFK E YVAKWK E	513
Rev- [E >D] -3F-2	FF D KFA D AFKDYVAKWKD	514
Rev-R4-4F-2	FFE R FAEAFKDYVAKWKD	515
Rev-R10-4F-2	FFERFAEAF R DYVAKWKD	516
Rev-R15-4F-2	FFEKF AEAFKDYVA R WKD	517
Rev-R17-4F-2	FFE R FAEAFKDYVAKW R D	518
Rev- [E3 >D] -4F-2	FF D KFAEAFKDYVAKWKD	519
Rev- [E7 >D] -4F-2	FFEKFA D AFKDYVAKWKD	520
Rev- [D11 >E] -4F-2	FFERFAEAFK E YVAKWKD	521
Rev- [D18 >E] -4F-2	FFERFAEAFKDYVAKWK E	522
Rev-7F	FFEKFKEFFKDYFAKFW	16
Rev- [E >D] -7F	FF D KFK D FFKDYFAKFW	523

(Continuación)

Nombre del péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
Rev- [D >E] -7F	FFEKFKEFFK E YFAKFW E	524
Rev-R4-7F	FFE R FKEFFKDYFAKFW	525
Rev-R6-7F	FFEKF R EFFKDYFAKFW	526
Rev-R10-7F	FFEKFKEFF R DYFAKFW	527
Rev-R14-7F	FFEKFKEFFKDYFA R FWD	528
Rev- [E3 >D] -7F	FF D KFEFFKDYFAKFW	529
Rev- [E7 >D] 7F	FFEKF D FFKDYFAKFW	530
Rev- [D11 >E] -7F	FFEKFKEFFK E YFAKFW	531
Rev- [D18 >E] -7F	FFEKFKEFFKDYFAKWE	532
	EVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSW FEPLVE	533
	EVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSW FE	534
	EVRSKLEEWFAAFREFAEFLARLKS	535
	PVLDLFRELLNELLEALKQKLK	536
	DWLKAFYDKVAEKLKEAF- P- DWAKAAYDKAAEKAKEAA	537
	EELKEKLEELKEKLEEKL-P- EELKEKLEELKEKLEEKL	538
	EELKAKLEELKAKLEEKL-P- EELKAKLEELKAKLEEKL	539
	EKLKALLEKLLAKLKELL P- EKLKALLEKLLAKLKELL	540
	EWLKELEKLLLEKLEKELL-P- EWLKELEKLLLEKLEKELL	541
	EKFKELEKLFLEKFKELL-P- EKFKELEKLFLEKFKELL	542
	EKLKELEKLLLELLKKLL-P- EKLKELEKLLLELLKKLL	543
	EKLKELEKLLKAKLEELL-P- EKLKELEKLLKAKLEELL	544
	EKLKELEKLLAKLKELL-P- EKLKELEKLLAKLKELL	545
	EKFKELEKLLLEKLEKELL-P- EKFKELEKLLLEKLEKELL	546
	EKLKAKLEELKAKLEELL-P- EKLKAKLEELKAKLEELL	547
	EELKELLKELLKKLEKLL-P- ELKELLKELLKKLEKLL	548

(Continuación)

	Nombre del péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
5		EELKKLLEELLKKLKELL-P- EELKKLLEELLKKLKELL	549
10		EKLKELLEKLLEKLKELL-A- EKLKELLEKLLEKLKELL	550
		EKLKELLEKLLEKLKELL-AA- EKLKELLEKLLEKLKELL	551
15		EKLKAKLEELKAKLEELL-P- EKAKAALEEAKAKAEELA	552
		EKLKAKLEELKAKLEELL-P- EHAKAALEEAKCKAEELA	553
20		DHLKAFYDKVACKLKEAF-P- DWAKAAYDKAAEKAKEAA	554
25		DWLKAFYDKVAEKLKEAF-P- DHAKAAYDKAACKAKEAA	555
		DWLKAFYDKVACKLKEAF-P- DWAKAAYNKAAEKAKEAA	556
30		DHLKAFYDKVAEKLKEAF-P- DWAKAAYDKAAEKAKEAA	557
		VLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQ	558
	(3F ^{Cn})	DKWKAVYDKFAEAFKEFL	51
35	(3F ^{In})	DKLKAFYDKVFEWAKEAF	50

Apo-J (péptidos G*).

[0049] También se descubrió que los péptidos que imitan los dominios helicoidales anfipáticos de apoJ también son capaces de mitigar uno o más síntomas de la aterosclerosis y/o otras patologías descritas en este documento. La apolipoproteína J posee una amplia cara no polar denominada dominios helicoidales anfipáticos similares a proteínas globulares o G*. La hélice anfipática clase G se encuentra en las proteínas globulares, y por lo tanto, el nombre de clase G. Esta clase de hélice anfipática se caracteriza por una distribución aleatoria de residuos cargados positivamente y negativamente en la cara polar con una cara no polar estrecha. Debido a la cara no polar estrecha, esta clase no se asocia fácilmente con fosfolípidos. El G* de la hélice anfipática posee características similares, pero no idénticas, a la hélice anfipática G. Similar a la hélice anfipática de clase G, los péptidos de clase G* poseen una distribución aleatoria de residuos cargados positiva y negativamente en la cara polar. Sin embargo, en contraste con la hélice anfipática clase G que tiene una cara no polar estrecha, esta clase tiene una cara no polar ancha que permite que esta clase se una fácilmente al fosfolípido y la clase se denomina G* para diferenciarla de la clase G de la hélice anfipática.

[0050] Un número de péptidos anfipáticos G* adecuados se describen la Patente de Estados Unidos N°: 6.930,085, y 7,638,494, y en la publicación PCT No: PCT/US03/09988 (WO 2003/086326). 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 dominios helicoidales anfipáticos G* de apo J que pueden expresarse en plantas transgénicas, p. ej., como se describe en el presente documento. Para cada secuencia enumerada en esta tabla, también se contempla la forma retro de la secuencia. Así, p. ej., cuando se muestra la secuencia DQYYLRVTTVA (SEQ ID NO: 559), también se contempla la secuencia de aminoácidos AVTTVRLYYQD (SEQ ID NO: 601).

Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
DQYYLRVTTVA	559
ECKPCLKQTCMKFYARVCR	560
FSRASSIIDELFQD	561
IQNAVNGVKQIKTLIEKTNEE	562
LLEQLNEQFNWVSRLANL	5
LLEQLNEQFNWVSRLANLTEGE	563
LLEQLNEQFNWVSRLANLTQGE	564
LVGRQLEEFLL	6
MNGDRIDSLLN	565
NELQEMSNQGSKYVNKEIQNAVNGV	566
PCLKQTCMKFYARVCR	567
PFLEMIHEAQQAMD	568
PGVCNETMMALWEECK	569
PKFMETVAEKALQEYRKKHRE	570
PSGVTEVWKLFD	571
PSQAKLRRELDLQVAERLTRYNELLSYQ	572
PTEFIREGDDD	573
QQTHMLDVMQD	574
RKTLLSNLEEAKKKKEDALNETRESETKLKEL	575
RMKDQCDKCREILSV	576

Péptidos miméticos ApoE

[0051] Péptidos miméticos ApoE también se han demostrado tener actividades similares a las descritas anteriormente para péptidos miméticos ApoA-I, particularmente con respecto a la disfunción neurológica y/o ocular (véase, p. ej., 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. y Experimental Therapeutics 334: 106-115; Klein y Yakel (2004) Neurosci., 127: 563-567; Laskowitz y col. (2007) J. of Neurotrauma 24: 1093-1107; Christensen y col. (2011) J. Immunol., 186: 2535-2542; Croy y col. (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 de apoE o una secuencia dual de ApoE/ApoA-I que se muestra en la Tabla 3 o la secuencia inversa.

Tabla 3. Ciertos péptidos de ApoE que pueden expresarse en plantas transgénicas, p. ej., como se describe en el presente documento. Para cada secuencia enumerada en esta tabla, también se contempla la forma retro de la secuencia. Por lo tanto, p. ej., cuando se muestra la secuencia GIKKFLGSIWKFIKAFVG (SEQ ID NO: 578), también se contempla la secuencia de aminoácidos GVFAKIFKWISGLFKKIG (SEQ ID NO: 577).

Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
Péptidos de ApoE:	
GIKKFLGSIWKFIKAFVG	578
GFKKFLGSWAKIYKAFVG	579
GFRRFLGSWARIYRAFVG	580
TEELRVRLASHLRKLRKRL	581
TEELRVRLASHLRKLRK	582
LRVRLASHLRKLRKRL	583
RLASHLRKLRKRL	584
SHLRKLRKRL	585
LRKLRKRL	586
LRKLRKRLLRKLRKRL	587
LRKLRKRLLRKLRKRLLRKLRKRL	588
RQIKIWFQNRMMKWKCLRVRLASHLRKLRKRL	589
LRVRLASHLRKLRKRL	590
EELRVRLASHLRKLRKRLRDADDLQKRLAVYEEQAQQIRLQAEAFQARL KSWFEPLVEDM	591
CEELRVRLASHLRKLRKRLRDADDLQKRLAVY	592
LRKLRKRLRDADDLRLKLRKRLRDADDL	593
TEELRVRLASHLRKLRKRL	594
TEELRVRLASHLEKLRKRL	595
TEELRVRLASHLRELKRL	596
LREKKLRVSALRTHRLELRL	597
Péptidos miméticos dobles ApoE y ApoA-I:	
LRKLRKRLRDWLKAFYDKVAEKLKEAF	598
LRRLRRRLRDWLKAFYDKVAEKLKEAF	599
RRRRRRRRRRDWLKAFYDKVAEKLKEAF	600

[0052] Se ha demostrado que en ciertas realizaciones, la unión del dominio de la apolipoproteína de unión al receptor E (apoE) a una hélice anfipática de clase A puede mejorar la internalización y degradación de LDL por los fibroblastos y puede reducir el colesterol plasmático y restaurar la función endotelial (véase, p. ej., Datta et al. (2000) Biochemistry 39: 213-220; Gupta et al. (2005) Circulation 111: 3112-3118).

[0053] Por consiguiente, en ciertas realizaciones, cualquiera de los péptidos descritos en este documento, cuando se expresa en un transgénico de la planta, se puede expresar como un péptido que comprende también un dominio de apoE unión al receptor (véase, p. ej., SEQ ID NOS: 598-600 para ejemplos ilustrativos).

[0054] En diversas realizaciones, los péptidos que comprenden un dominio oxpholipin tales como Arg-Glu-Dpa-Thr-Gly-Leu-AlaTrp-Glu-Trp-Trp-Arg-Thr-Val (SEQ ID NO: 602), donde Dpa (3,3'-difeníl alanina) se sustituye con Trp, Phe o Ala también se contemplan. Los péptidos de oxfolipina están descritos por Ruchala et al. (2010) PLoS ONE 5 (4): e10181 y en la publicación PCT no: PCT/US2010/046534 (WO/2011/031460), y cuando dichos péptidos incorporan 3,3'-difenílalanina, este residuo se sustituye con Trp, Phe o Ala.

[0055] Además de las secuencias enumeradas en las Tablas 1, 2 y 3 secuencias de aminoácidos que comprenden 1 sustitución conservadora, 2 sustituciones conservadoras, 3 sustituciones conservadoras, 4 sustituciones conservativas, 5 sustituciones conservadoras, 6 sustituciones conservadoras, 7 sustituciones conservadoras, 8 se contemplan sustituciones conservadoras, 9 sustituciones conservadoras o 10 sustituciones conservadoras.

[0056] 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 las partes de la planta se administran a un mamífero, un experto en la materia reconocerá que muchos otros péptidos pueden también expresarse en tales plantas y se alimenta a un mamífero para proporcionar una utilidad similar.

Construcción y propagación de plantas transgénicas.

[0057] La construcción y la propagación de plantas transgénicas que expresan péptidos ApoA-I o miméticos de los mismos y adecuados para la concentración de la actividad de ApoA-I como se describe en el presente documento se detalla en la publicación PCT No: WO 2013/148214 A1 y en Chattopadhyay et al. (2013) J. Lipid Res., 54: 995-10101, y Navab et al. (2013) J. Lipid Res., 54: 3403-3418. Los métodos típicamente implican la construcción de un vector (p. ej., un vector plasmídico) o un fragmento de ADN al unir operativamente una secuencia de ADN que codifica el péptido (s) de interés (p. ej., péptidos que comprenden ApoA-I, y/o G*, y/o Dominio (s) ApoE) a un promotor funcional de la planta capaz de dirigir la expresión del péptido en la planta y luego transformar una célula de la planta con el vector plasmídico o fragmento de ADN. Cuando se prefiera, el método puede extenderse para producir plantas transgénicas a partir de las células transformadas incluyendo una etapa de regeneración de una planta transgénica a partir de la célula vegetal transgénica. Las plantas resultantes proporcionan tejidos, cuyos extractos que tienen actividad ApoA-I se pueden producir usando los métodos descritos en este documento.

[0058] También se describen a continuación métodos ilustrativos, pero no limitativos, de la producción de tales plantas transgénicas.

Ácidos nucleicos y vectores que expresan los péptidos de interés.

[0059] Típicamente, el uso del codón del ácido nucleico que es para expresar la secuencia de aminoácidos deseada se selecciona para reflejar el uso óptimo de codones en esa planta. Los expertos en la materia conocen métodos para optimizar el uso de codones para la expresión de un ácido nucleico en un organismo huésped particular, y numerosas herramientas de software están disponibles para tal optimización. Por ejemplo, las tablas de codones están disponibles en la Base de datos de uso de codones, mantenida por el Departamento de Investigación Genética de Plantas en Kazusa, Japón (ver, p. ej., www.kazusa.or.jp/codon/).

[0060] En ciertas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico de codones optimizados se incorpora en un vector de expresión (p. ej., un plásmido). Típicamente, la secuencia de ácido nucleico está operativamente unida (puesta bajo control de) un promotor capaz de dirigir la expresión de la secuencia de ácido nucleico en la planta huésped.

Promotores

[0061] Los promotores que se sabe o se ha descubierto que causan la transcripción de un gen extraño en células de plantas son bien conocidos para los expertos en la técnica. Dichos promotores incluyen, p. ej., promotores de origen viral y promotores de origen vegetal. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles, y en diversas realizaciones, son promotores específicos de tejido. En diversas realizaciones, se contempla cualquiera de estos promotores para la expresión de un péptido descrito aquí en una planta/tejido vegetal.

[0062] Los promotores más comúnmente usados para la sobreexpresión constitutiva en plantas se derivan de fuentes de virus de plantas, tales como el mosaico de la coliflor (CaMV) 35S (Odell et al (1985) Nature, 313: 810-812). Este promotor, al igual que los promotores similares derivados de virus usados en sistemas vegetales, se cosecha de genomas virales de ADN bicatenarios, que usan la ARN polimerasa nuclear del huésped y no parecen depender de ningún producto génico viral de acción 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 transgen de interés. El promotor CaMV 35S puede conducir altos niveles de expresión transgénica en dicotiledóneas y monocotiledóneas (Battraw y Hall (1990) Plant Mol. Biol. 15: 527-538; Benfey et al. (1990) EMBO J. 9: 1677-1684). En diversas realizaciones, se puede usar el promotor 35S de tamaño completo (-941 a +9 pb) (Odell et al. (1985) Nature, 313: 810-812) o varios fragmentos tales como un fragmento de 2343 pb. Otros promotores virales también son bien conocidos por los expertos en la materia. Estos incluyen, entre otros, el promotor del virus del mosaico venoso de la yuca (CsVMV) (véase, p. ej., 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) (véase, p. ej., Schenk et al. (2001) Plant Mol. Biol. 47: 399-412), promotor del virus del mosaico de mirabilis (MMV) (véase, p. ej., Dey y Maiti (1999) Plant Mol. Biol. 40: 771-782), el promotor del virus del mosaico de la figwort (FMV) (véase, p. ej., Sanger et al. (1990) Plant Mol. Biol. 14: 433-443; Maiti et al. (1997) Transgenic Res. 6: 143-156) y similares.

[0063] Promotores de plantas endógenos también se utilizan regularmente para dirigir altos niveles constitutivos de expresión de los transgenes (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) e impulsa la expresión en prácticamente todos los tejidos excepto el xilema cuando se transforma de nuevo en arroz. Los promotores de ubiquitina, p. ej., el promotor de ubiquitina 1 de maíz (pUbi) han proporcionado una alta expresión de genes heterólogos en protoplastos de maíz. El promotor de maíz Ubi1: fusión GUS se ha utilizado en arroz (Cornejo *et al.* (1993) *Plant Mol. Biol.* 23: 567-581) El promotor del gen Ubi.U4 también se ha demostrado para conducir actividad alta expresión (Garbarino *et al.* (1995) *Plant Physiol.* 109: 1371-1378).

[0064] Se conoce un número de tejidos específicos (*p. ej.*, específicos a frutas, semillas/granos, tubérculos/sistemas de almacenamiento de raíces, floretes/flores, hojas/tejido verde, anteras/polen, y similares) Los promotores ilustrativos, pero no limitativos específicos de fruta incluyen, p. ej., promotores del 1-aminociclopropano-1-carboxilato El gen (ACC) oxidasa, el gen E8 y los genes de poligalacturonasa (PG) se han caracterizado en manzana (Atkinson *et al.* (1998) *Planta 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 transgénica 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 impulsar 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 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 en la biosíntesis de carotenoides y también está codificada por un solo gen en 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 (frutas, pétalos, anteras) (Corona *et al.* (1996) *Plant J.* 9: 505-512).

[0065] La expresión del transgén específica a la semilla se ha utilizado para una serie de aplicaciones de ingeniería genética. Los promotores ilustrativos de semillas específicas incluyen, pero no se limitan a, los promotores de diversas proteínas de almacenamiento de semillas. Otros promotores específicos de semillas incluyen, p. ej., 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 heliantina de girasol (Nunberg *et al.* (1994) *Plant Cell* 6: 473-486), y similares. Uno de los promotores específicos de semillas mejor caracterizados y más comúnmente utilizados es el gen de la β -faseolina de frijol francés (véase, p. ej., 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, entre otros, los promotores de hordeína específicos de endospermo en 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 unido a gránulos (*gbss1*) en trigo (Kluth *et al.* (2002) *Plant Mol. Biol.* 49: 669-682).

[0066] Tubérculos/promotores específicos de raíz de almacenamiento incluyen, pero no se limitan a los miembros de la familia de patatas de clase I patatin, B33 y PAT 21 (Jefferson *et al.* (1990); Liu *et al.* (1991), el almidón de patata unida a gránulo promotor de sintasa (GBSS), promotores de batata, esporamina y β -amilasa (Maeo *et al.* (2001) *Plant Mol. Biol.* 46: 627-637), p. ej., el promotor gSPO-A1 (Ohta *et al.* (1991). *mol Gen. Genet* 225: 369-378).

[0067] Los promotores específicos de nódulos de las raíces asociadas a legumbre - rhizobium incluyen promotores de genes expresados temprano en la organogénesis nódulo (genes ENOD) (véase, p. ej., 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 tardíos de nodulina (véase, p. ej., Sandal *et al.* (1987) *Nucleic Acids Res.* 15: 1507-1519; Stougaard *et al.* (1987) *EMBO J.* 6: 3565-3569), promotores de leghemoglobina, el promotor de *sesbania rostrata* leghemoglobina *glb3* (véase, p. ej., Szabados y col. (1990) *Plant Cell* 2: 973-986; Szczyglowski y col. (1996) *Planta Mol. Biol.* 31: 931-935), y similares.

[0068] Se describen promotores específicos de raíz, p. ej., Yamamoto *et al.* (1991) *Plant Cell* 3: 371-382. Los promotores específicos de la raíz sin plantas incluyen los promotores de los genes de loci de enraizamiento (rol) que se encuentran en el plásmido Ri (inductor de la raíz) de *A. rhizogenes* (*p. ej.*, 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.

[0069] Los promotores específicos de las hojas/tejidos verdes incluyen, pero no se limitan a, los promotores de la multigene *rbcS* familia que codifican la subunidad pequeña de carboxilasa ribulosa-1,5-bisfosfato como el promotor de guisante *rbcS*-3A, el promotor de alfalfa *rbcS*, el promotor de Rubisco, promotores de los genes de la proteína de unión a clorofila a/b (Cab) (*p. ej.*, promotor CAB2) (Piechulla *et al.* (1998) *Plant Mol. Biol.* 38: 655-662), promotor RAC de alfalfa 1532 pb, y similares.

[0070] Los ejemplos ilustrativos, pero no limitantes de promotores específicos de tejido se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4 muestra ilustrativa, pero ejemplos de promotores específicos de tejido no limitativo.

Tejido	Promotores ilustrativos
Fruta específica	Manzana ACC oxidasa Tomate poligalactouronidasa Tomate <i>E8</i> Tomate <i>PDS</i>
Tejido verde específico	Guisante <i>rbcS-3A</i> Arabidopsis <i>CAB2</i> Alfalfa <i>RAC</i>
Nódulo específico	<i>Vicia faba</i> <i>VfEnod12</i> Frijol <i>NVP30</i> <i>S. rostrata</i> <i>leghemoglobina</i>
Raíz específica	<i>A. rhizogenes</i> <i>rolD</i> Dominio A, CaMV 35S Tobacco <i>TobRB7</i>
Tubérculo/órgano de almacenamiento específico	<i>Patata patatina B33</i> <i>Patata patatina PAT21</i> <i>Patata GBSS</i>
Semilla específica	<i>Alubias beta-faseolina</i> Algodón alfa-globulina Trigo <i>gbss1</i> <i>Zma10 Kz</i> o <i>Zmag12</i> (gen de zeína de maíz) <i>Zmag12</i> (gen de glutelina de maíz)
Recubrimiento de semillas específico	Guisante <i>GsGNS2</i>
Floral específico	<i>Crisantemo UEP1</i> Frijol <i>CHS15</i> <i>Petunia EPSPS</i>
Polen específico	Maíz <i>ZMC5</i> Tomate <i>lat 52</i>
Pistilo específico	Pera <i>PsTL1</i> <i>Patata SK2</i>

[0071] En ciertas realizaciones, el (los) péptido(s) descrito(s) se expresa(n) bajo el control del promotor CaMV. Como se usa aquí, la frase promotor "CaMV 35S" incluye variaciones de promotor CaMV 35S, p. ej., promotores derivados por medio de ligaciones con regiones operadoras, mutagénesis aleatoria o controlada, etc.). En ciertas realizaciones, los péptidos descritos aquí se expresan bajo el control del promotor E8. En ciertas realizaciones, los péptidos descritos en este documento se expresan bajo el control del promotor de la planta de tomate híbrido E4/E8 (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos 6,118,049).

Vectores

[0072] Como se indicó anteriormente, el ácido nucleico que codifica el péptido descrito en este documento se coloca en un vector (p. ej., un vector plásmido) bajo el control del promotor deseado. En ciertas realizaciones, el vector (p. ej., el vector plasmídico) puede codificar adicionalmente uno o más marcadores seleccionables (p. ej., un marcador de resistencia a antibióticos tal como el gen *npt II* para la resistencia a la kanamicina) y marcadores que confieren selección por higromicina, estreptomycinina, espectinomycinina o fosfotricina. 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-glucorotranscisa, luciferasa de luciérnaga, luciferasa bacteriana, treonina deshidratasa, metalotioneína i1, epsp sintasa, fosfotricina acetil transferasa, acetolactato sintasa, bromoxinil nitrilasa y similares.

[0073] En ciertas realizaciones, el vector puede codificar un péptido señal (p. ej., *ALPAH- A11- Phahaseolus vulgaris*). Secuencias que se pueden proporcionar incluyen, p. ej., una secuencia líder (p. ej., para permitir la secreción o el direccionamiento vacuolar) y las señales de terminación de la traducción.

[0074] Más generalmente, se conocen varios vectores para la transformación de células vegetales y la expresión de genes heterólogos a los expertos en la técnica. Por ejemplo, las estructuras de una amplia gama de plásmidos que han demostrado su eficacia en (a) la transformación de plantas y la expresión de genes heterólogos, incluidas las construcciones que confieren resistencia a la kanamicina, higromicina, estreptomycinina, espectinomycinina y fosfotricina,

o que confieren β -glucuronidasa (GUS) Jones et al. (1992) Transgenic Res., 1: 285-297 describen la expresión del gen). Construcciones de vectores binarios que transportan polienlazadores de los tipos pUC y Bluescript, plásmidos que permiten la expresión de cualquier marco de lectura heterólogo de cualquiera de las nopalinas sintasa (nos) o promotores de octopina sintasa (ocs), así como el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, usando las secuencias de poliadenilación de nopalina sintasa o octopina sintasa 3', también se presentan en esta referencia. Estas construcciones permiten una elección de orientación del transgen de interés resultante, en relación con la orientación del gen marcador de selección. La mayoría de los plásmidos descritos por Jones *et al.* (*supra.*) están disponibles públicamente/comercialmente.

[0075] Los ejemplos ilustrativos y no limitativos de vectores incluyen el vector pRL200 que se ha utilizado para transformar de manera estable lechuga (véase, p. ej., Kanamoto et al (2006) Transgenic Res., 15: 205-217), el pCMB1/1381-GUS el plásmido se ha utilizado para atacar tejidos específicos en tomates (véase, p. ej., Lim et al. (2012) Molecules and Cells 34: 53-59), el vector pSBS4642, el vector de transformación de cloroplastos pLD y similares.

[0076] Los medios de construcción del "gen" heterólogo y su incorporación en un plásmido son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el "gen" heterólogo puede sintetizarse químicamente usando un sintetizador de ADN. Los servicios comerciales también pueden proporcionar secuencias de ácido nucleico sintetizadas a pedido. La construcción se puede clonar en el vector usando, p. ej., procedimientos de clonación por PCR. Los expertos en la técnica conocen bien los métodos para fabricar las construcciones de ácido nucleico aquí descritas, y los ejemplos ilustran métodos específicos. Los métodos de clonación y transformación, los vectores de ADN y el uso de secuencias reguladoras son bien conocidos por los expertos en la materia y se pueden encontrar, p. ej., en Current Protocols in Molecular Biology, FM Ausubel et al, Wiley Interscience, 2004.

[0077] En ciertas realizaciones, los genes marcadores (p. ej., marcadores de selección) se extraen de la planta transgénica. Los expertos en la técnica conocen bien los métodos para eliminar marcadores seleccionables. En un enfoque ilustrativo, pero no limitante, los genes marcadores se eliminan usando 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 las hormonas vegetales y las respuestas celulares a los reguladores del crecimiento de las plantas, para diferenciar las células transgénicas, y para seleccionar plantas transgénicas sin 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 se eliminan mediante el sistema R/RS para generar plantas transgénicas sin marcadores. Los protocolos para la elección de un promotor para los oncogenes y el gen recombinasa (R), el estado de los materiales vegetales y las condiciones de cultivo de tejidos se describen, p. ej., por Ebinuman et al. (2005) Meth. Mol. Biol., 286: 237-254.

Selección de la planta huésped

[0078] Una amplia variedad de especies de plantas se han transformado genéticamente con ADN extraño, utilizando varias técnicas diferentes para insertar genes (véase, p. ej., Wu (1989) Pp. 35-15 en: Plant Biotechnology, Kung, S. y Arntzen, eds., Butterworth Publishers, Boston, Massachusetts; 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; Hinchey 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 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 descrito aquí, aunque la transformación de monocotiledóneos también es aplicable especialmente en la producción de ciertos granos útiles para la alimentación animal.

[0079] En ciertas realizaciones, la planta huésped seleccionada para la transformación genética tiene tejido comestible en el que el péptido de interés se puede expresar. Por lo tanto, en diversas realizaciones, el péptido puede expresarse en una parte de la planta, como la fruta, las hojas, los tallos, las semillas o las raíces, que pueden ser consumidos por un humano o un animal para el que el péptido está destinado.

[0080] Varias otras consideraciones pueden informar la selección de la planta huésped. A veces se prefiere que el tejido comestible de la planta huésped no requiera calentamiento antes del consumo ya que el calentamiento pueda reducir la efectividad de la apolipoproteína o mimético para uso animal o humano. Además, a veces se prefiere que la planta huésped exprese el péptido en forma de un líquido potable.

[0081] En ciertas realizaciones plantas que son adecuadas para la expresión del péptido descrito en este documento incluyen cualquier dicotiledónea o monocotiledónea que es comestible en parte o en su totalidad por un humano o un animal. Las plantas ilustrativas incluyen, p. ej., tomates, zanahorias, papas, manzanas, peras, ciruelas, duraznos, naranjas, kiwis, papayas, piñas, guayaba, liliroi, carambola, lichi, mango, uva, granada, hojas de mostaza, col rizada, acelga, lechuga, soja, arroz, maíz y otros granos (p. ej., trigo, arroz, cebada, bulgur, faro, kamut, kaniwa, mijo, avena, quinua, arroz, centeno, sorgo, espelta, teff, triticale y similares), bayas como fresas, arándanos, moras, bayas de goji

y frambuesas, plátano, arroz, nabo, maíz, uva, higo, ciruela, papa, semillas de cártamo, nueces (p. ej., almendra, nuez, nuez, maní, anacardo, macademia), avellana, etc.), legumbres (p. ej., alfalfa, trébol, guisantes, frijoles (incluidos los frijoles negros), lentejas, altramuces, mezquite, algarroba, soja y similares) y similares. En ciertas realizaciones, también se contempla la expresión en plantas tales como tabaco y similares.

Métodos de transferencia de genes en plantas

[0082] Cualquiera de una serie de protocolos de transformación se puede utilizar para transformar las células de plantas y plantas descritas en el presente documento. Si bien ciertas realizaciones preferidas descritas 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.

[0083] Hay un número de métodos para introducir genes extraños en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (véase, p. ej., Potrykus (1991) *Annu Rev. Plant Physiol, Plant Mol Biol* 42: 205-225; Shimamoto et al. (1989) *Nature* 338: 274-277, y similares. Los métodos para la integración estable de ADN exógeno en el ADN genómico de la planta incluyen, p. ej., transferencia de genes mediada por agrobacterias, absorción directa de ADN, incluidos métodos para la absorción directa de ADN en protoplastos, absorción de ADN inducida por breve descarga eléctrica de las células vegetales, la inyección de ADN en células de plantas o tejidos por bombardeo de partículas, o por el uso de sistemas de micropipetas, o mediante la incubación directa del ADN con la germinación de polen, y el uso de la planta de virus como vectores de genes.

[0084] La transformación y regeneración de plantas en dicotiledóneas por *Agrobacterium tumefaciens* (A. tumefaciens) está bien documentada. La aplicación del sistema *Agrobacterium tumefaciens* con, p. ej., el método de transformación del disco de la hoja (ver, p. ej., Horsch et al. (1988) pp. 1-9 In: *Plant Molecular Biology Manual AS*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht) permite la transferencia, selección y regeneración eficiente de genes.

[0085] Monocotiledóneas también se han encontrado para ser capaces de transformación genética por *Agrobacterium tumefaciens*, así como por otros métodos tales como la captación directa de ADN mediada por PEG (polietilenglicol), o la electroporación. Transferencia exitosa de genes extraños al maíz (ver, p. ej., Rhodes et al. (1989) *Science* 240: 204-207) y arroz (ver, p. ej., Toriyama et al. (1988) *Bio/Technology* 6: 1072-1074; Zhang y Wu (1988) *Theor. Appl. Genet.* 76: 835-840), tomate (véase, p. ej., Frary y Earl (1996) *Plant Cell Rept.* 15: 235-240), así como protoplastos de trigo y sorgo, y se han demostrado numerosas otras especies.

[0086] El sistema de *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 de la planta varían según la especie de la planta y el sistema de administración de *Agrobacterium*. Un enfoque ilustrativo es el procedimiento del disco de la hoja que se puede realizar con cualquier explante de tejido que proporcione una buena fuente para el inicio de la diferenciación de toda la planta. El sistema *Agrobacterium* es especialmente viable en la creación de plantas dicotiledóneas transgénicas.

[0087] Como se ha indicado anteriormente, hay diversos métodos de transferencia directa de ADN en células de plantas. En electroporación, los protoplastos se exponen brevemente a un campo eléctrico fuerte. En la 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.

[0088] Otro método de vector de transferencia es la transmisión de material genético usando virus vegetales modificados. El ADN de interés está integrado en los virus de ADN, y estos virus se usan para infectar plantas en los sitios de las heridas.

[0089] Un método de transfección que utiliza *Agrobacterium tumefaciens* se ilustra aquí en los Ejemplos. Usando estas enseñanzas, muchas otras plantas pueden transformarse de manera similar. Los expertos en la materia deberían reconocer que existen múltiples opciones de cepas de *Agrobacterium* y estrategias de construcción de plásmidos que pueden usarse 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* podrían ser más adecuadas en algunas aplicaciones.

[0090] Los métodos de inoculación del tejido vegetal varían dependiendo de las especies de plantas y el sistema de entrega de *Agrobacterium*. Un enfoque muy conveniente es el procedimiento del disco de la hoja que se puede realizar con cualquier explante de tejido que proporcione una buena fuente para el inicio de la diferenciación de toda la planta. La adición de tejido nodriza puede ser deseable bajo ciertas condiciones. Se pueden seguir otros procedimientos como la transformación *in vitro* de protoplastos en regeneración con *A. tumefaciens* para obtener también células vegetales transformadas.

[0091] Se observa que los genes heterólogos se han expresado en una amplia variedad de plantas, en particular plantas comestibles. Por lo tanto, p. ej., se ha utilizado un promotor mínimo del gen de la proteína de unión a clorofila

de melocotón *a/b (Lhcb2 * Pp I)* (Cab19) y un promotor mejorado CaMV *mas35S* para expresar genes heterólogos en tomates (véase, p. ej., Bassett et al. (2007) BMC Biotechnology 7: 47). Se ha utilizado con éxito un promotor 35S: PTF1 (promotor 35S CaMV) en ciruelas (ver, p. ej., Srinivasan PLoS ONE 7 (7): e40715) y en manzanas (ver, p. ej., Trankner et al. (2010) Planta 232: 1309-1324). La secuencia promotora *Suc2* del gen *A. Thaliana SUC2* (*sacarosa* - H + simportador) también se ha utilizado (*Id.*). Otro promotor utilizado en manzanas fue el promotor Pgst1 de patata (véase, p. ej., Malnoy et al. (2006) Transgenic Res., 15: 83-93). El promotor 35S CaMV se ha utilizado en manzanas durante muchos años (véase, p. ej., Gleave (1992) Plant Mol Biol. 20: 1203-1207). Se han usado otros promotores que son derivados del promotor 35S CaMV en manzanas, tales como el promotor del inhibidor de proteínasa de patata II (*Pin2*) (véase, p. ej., Ko et al. (2002) J. Amer. Soc. Hort. Sci. 127: 515-519). Butelli y col. usó un vector binario (pDEL.ROS) que contiene ADNc de *Delila* y *Rosea1* de snapdragon bajo el control del promotor *E8* de tomate para producir tomates enriquecidos en antocianinas (véase, p. ej., Butelli et al. (2008) Nature Biotechnology 26: 1301-1308) Kesanakurti y col. (2012) Physiologia Plantarum 146: 136-148) utilizaron el promotor *E8* para producir plantas de tomate para producir transgénicamente peroxidasa aniónica de tomate (*tap1*). Yang y col. (2012) Transgenic Res. 21: 1043-1056) demostraron que el promotor *Gentiana lutea* zeaxantina epoxidasa (*GIZEP*) se expresó altamente en plantas de tomate transgénicas.

[0092] En vista de lo anterior, un experto reconocerá que el uso de las enseñanzas y ejemplos proporcionados en este documento, cualquier de los péptidos (p. ej., *Péptidos miméticos ApoA-I*) que se describen en el presente documento pueden expresarse en una cantidad eficaz en un tejido vegetal con experimentación de rutina.

[0093] El tejido de la planta resultante que contiene uno o más péptidos que tienen la actividad ApoA-I deseado se puede entonces concentrar según el método descrito en el presente documento para producir un extracto de la planta de biológicamente activo (ApoA-I activo).

Método de administración de extractos de plantas transgénicas para uso terapéutico y/o profiláctico.

[0094] En diversas formas de realización, se describen métodos para la profilaxis y/o el tratamiento de diversas patologías, especialmente patologías caracterizadas por una respuesta inflamatoria (ver, p. ej., la Tabla 5). En ciertas realizaciones, los métodos implican administrar a un mamífero que lo necesita (p. ej., un ser humano, un mamífero no humano) un extracto de al menos una porción de una planta transgénica como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, el extracto se administra simplemente por vía oral al mamífero. En ciertas realizaciones, el extracto se administra en combinación con un alimento, y/o una proteína en polvo, y/o un suplemento nutricional, y/o una "barra energética", y/o una "dieta definida".

[0095] En diversas realizaciones los extractos descritos en el presente documento se usan en la profilaxis y/o tratamiento de patologías que incluyen, pero no se limitan a aterosclerosis, artritis, cáncer, diabetes, fibrosis hepática, degeneración macular, enfermedad de riñón, obesidad, osteoporosis, esclerodermia, lupus eritematoso sistémico, vasculopatía de trasplante y demencia vascular.

[0096] 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 a un sujeto (p. ej., un mamífero humano o no humano) que muestra uno o más factores de riesgo de aterosclerosis (p. ej., obesidad, antecedentes familiares, colesterol elevado, hipertensión, diabetes, síndrome metabólico, bajo 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 francamente elevados, y similares).

[0097] En ciertas realizaciones, la patología es un cáncer y la administración es como un método terapéutico en su propio derecho y/o para aumentar los métodos terapéuticos y/o para reducir los efectos secundarios adversos a los métodos terapéuticos (p. ej., quimioterapia, radioterapia, etc.). Varios tipos de cáncer para los que se cree que la administración es adecuada incluyen, entre otros, cáncer de ovario, cáncer de colon, mieloma o mieloma múltiple, cáncer de mama, cáncer de huesos, cáncer de cuello uterino, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de piel, incluido melanoma maligno, y cáncer de próstata.

[0098] En ciertas realizaciones, la administración del extracto es para prevenir el inicio, ralentizar la aparición y/o ralentizar la progresión de la enfermedad de Alzheimer y/o otro tipo de demencia.

Administración de extracto de plantas transgénicas.

[0099] En ciertas realizaciones se administra al mamífero el extracto de planta transgénica que comprende o consiste en uno o más dominios de apolipoproteínas (p. ej., dominios 6F, dominios 4F, etc.). En ciertas realizaciones, el mamífero simplemente se alimenta con el extracto como un polvo, o en una solución o suspensión, o se formula en un gel o píldora. En ciertas realizaciones, el extracto de plantas transgénicas se combina con otros componentes dietéticos (p. ej., como ingrediente alimentario) para la administración al sujeto.

Píldoras, cápsulas y pastillas.

[0100] En ciertas realizaciones, los extractos de plantas transgénicas que tienen actividad ApoA-I pueden formularse para administración directa a un sujeto. Dichas formulaciones incluyen, p. ej., un polvo simple que se puede administrar directamente o combinar con, p. ej., una bebida para administración. Las formas de dosificación unitarias adecuadas incluyen, pero no se limitan a, polvos, tabletas, píldoras, cápsulas, pastillas, barras y similares.

[0101] Dichas composiciones pueden fabricarse mediante procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, gragea, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

[0102] Para la administración oral, las formulaciones pueden implicar la combinación del (de los) extracto(s) vegetal(es) transgénico(s) con portadores bien conocidos en la técnica. Tales portadores permiten que los compuestos de la invención se formen como tabletas, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones, suspensiones y similares, para la ingestión oral de un paciente a tratar. Para formulaciones orales sólidas tales como, p. ej., polvos, cápsulas y tabletas, los excipientes adecuados incluyen cargas tales como azúcares, tales como lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; preparaciones de celulosa tales como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona (PVP); agentes de granulación; y agentes aglutinantes. Si se desea, se pueden agregar agentes desintegrantes, como la polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido alginico o una sal de los mismos, como el alginato de sodio. Si se desea, las formas de dosificación sólidas se pueden recubrir con azúcar o con recubrimiento entérico utilizando técnicas estándar.

[0103] Para preparaciones líquidas orales tales como, p. ej., suspensiones, elixires y soluciones, los vehículos, excipientes o diluyentes adecuados incluyen agua, glicoles, aceites, alcoholes, etc. Además, se pueden añadir agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares. Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de tabletas, pastillas, etc. formuladas de manera convencional.

Proteína en polvo

[0104] En ciertas realizaciones, al mamífero se le administra una "proteína en polvo que comprende un extracto de plantas transgénicas como se describe en el presente documento. 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, 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.

[0105] Métodos de aislamiento/producción los expertos en la materia conocen bien la proteína en polvo. Los métodos típicos implican una etapa de aislamiento en bruto (p. ej., procesos de filtración para separar la lactosa de la leche en la preparación de la proteína de suero) seguida de una etapa de concentración, p. ej., una purificación de intercambio iónico para purificar la proteína sin desnaturalizarla. En ciertas realizaciones, el extracto vegetal transgénico descrito en el presente documento simplemente se añade a una proteína en polvo disponible comercialmente.

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

[0106] En ciertas realizaciones, al mamífero se le administra un alimento o un ingrediente alimentario que se come antes o después o en combinación con los extractos de plantas transgénicos descritos en este documento. En ciertas realizaciones, el alimento es un producto alimenticio que comprende naturalmente todo o parte del mismo tipo de planta de la que se deriva el extracto de planta transgénico. Por lo tanto, cuando el extracto es un extracto de tomate transgénico, el alimento también puede comprender un tomate, pasta o salsa de tomate y similares.

Suplemento nutricional.

[0107] En ciertas realizaciones, los extractos de plantas transgénicos descritos en este documento se proporcionan como un componente de un suplemento nutricional (p. ej., un suplemento vitamínico, un suplemento proteico, etc.). Los suplementos vitamínicos ilustrativos incluyen, p. ej., suplementos de vitamina A, suplementos de vitamina B, suplementos de vitamina D, suplementos de vitamina C, suplementos de ácidos grasos (p. ej., ácidos grasos omega 3), suplementos minerales como calcio, zinc y hierro, y varias combinaciones de los mismos.

[0108] En ciertas realizaciones, los extractos de plantas transgénicos descritos en este documento se proporcionan como un componente de una formulación multivitamínica o combinados en un paquete multicomponente con otros suplementos de vitaminas/FA/minerales. En ciertas realizaciones en las que el extracto se usa en dicho suplemento, el extracto, p. ej., provisto como un polvo fino, se incorpora luego en un multivitamínico, o se forma tabletas o se encapsula por sí mismo. 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.

Producto de reemplazo de dieta/comida definido.

[0109] En ciertas realizaciones, los extractos de plantas transgénicos descritos en este documento se proporcionan

como un componente de una "dieta definida" y/o productos de reemplazo de comidas (MRP). Una dieta definida es una dieta, opcionalmente preempacada, que está destinada a cumplir con todos los requisitos dietéticos de un sujeto en particular. Por ejemplo, para los humanos, una dieta definida puede ser una dieta predeterminada diseñada para facilitar un objetivo dietético particular (p. ej., reducción de peso, reducción de alérgenos, lactosa, aumento de peso, elevación de proteínas, etc.). En el caso de los mamíferos no humanos (p. ej., caninos, felinos, porcinos, equinos, bovinos, etc.), la "dieta definida" puede proporcionarse en forma de un producto alimenticio para animales. El producto alimenticio para animales se puede diseñar para cumplir objetivos dietéticos particulares, p. ej., como se describe anteriormente para un ser humano.

[0110] En ciertas realizaciones, el producto alimenticio para animales puede proporcionarse como el componente de un régimen de tratamiento (p. ej., para un animal de granja, mascota, etc.) afectado o en riesgo de una patología particular, p. ej., cáncer, aterosclerosis, riñón enfermedad, etc.

[0111] Los sustitutivos de comidas son una forma de dieta definida, o bien mezclas de bebidas en polvo pre-empacadas o barras comestibles diseñadas para reemplazar las comidas preparadas. Los MRP son generalmente ricos en proteínas, bajos en grasas, tienen una cantidad baja a moderada de carbohidratos y contienen una amplia gama de vitaminas y minerales. La mayoría de los MRP usan proteína de suero, caseína (a menudo listada como caseinato de calcio o caseína micelar), proteína de soja y/o albúmina de huevo como fuentes de proteínas. Los carbohidratos se derivan típicamente de 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 pueden contener otros ingredientes. Estos pueden incluir, entre otros, monohidrato de creatina, péptidos de glutamina, L-glutamina, alfa-cetoglutarato de calcio, aminoácidos adicionales, lactoferrina, ácido linoleico conjugado y triglicéridos de cadena media.

[0112] En ciertas realizaciones, la "dieta definida" comprende uno o más alimentos. Cada artículo alimenticio puede ser empaquetado individualmente. Además, uno o más de los alimentos pueden mejorarse nutricionalmente mediante el enriquecimiento de vitaminas y minerales y/o mediante la incorporación de extracto de plantas transgénicas descritas en el presente documento.

[0113] Los alimentos individuales pueden prepararse mediante procesamiento, p. ej., mezcla, precocción, cocción, congelación, deshidratación o liofilización, de modo que la comida se pueda mantener congelada o seca durante un período prolongado. Además, un alimento individual puede empaquetarse de tal manera que, antes de su consumo, el alimento debe mezclarse a mano o con una licuadora, cocinarse colocando el componente alimenticio en la estufa, en un horno o microondas, o prepararse agregando agua fría, caliente o hirviendo o sumergiendo el alimento en agua hirviendo. Uno o más de los alimentos pueden ser estables. Preferiblemente, un artículo alimenticio tiene un almacenamiento o una vida útil lo suficientemente larga como para que la dieta definida pueda almacenarse antes del consumo. En ciertas realizaciones, es deseable un almacenamiento o una vida útil en condiciones de venta minorista en un intervalo de aproximadamente seis a doce meses.

[0114] En ciertas realizaciones, los artículos alimenticios individuales pueden estar en forma de sólidos, semisólidos o líquidos y pueden incluir, pero no se limitan a, productos de sopa, suplementos proteicos, alimentos de granos, alimentos con almidón, alimentos con frutas o verduras, y bebidas nutricionales.

[0115] En ciertas realizaciones, los extractos de plantas transgénicos descritos en este documento simplemente se combinan con/incorporan en la dieta definida y/o producto de reemplazo de comida (MRP). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el extracto en polvo se agrega a uno o más de los componentes alimenticios que comprenden la dieta definida o MRP.

Barras energéticas.

[0116] En ciertas realizaciones, los extractos de plantas transgénicos descritos en este documento se proporcionan como un componente de una "barra de potencia"/barra energética. Las barras energéticas son barras suplementarias que típicamente contienen cereales y/o frutas 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 por una comida. Son diferentes de las bebidas energéticas, que contienen cafeína, mientras que las barras proporcionan energía alimentaria.

[0117] Los expertos en la técnica conocen numerosas formulaciones de barras energéticas. En ciertas realizaciones, el péptido que comprende o que 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 porción de la misma se proporciona como un componente de la barra energética. En diversas realizaciones, la planta se puede proporcionar como todo o una parte de un componente de fruta y/o fibra de la formulación de barra energética.

Usos de animales.

[0118] Como se indicó anteriormente, en diversas realizaciones, el extracto vegetal transgénico descrito en la presente

se ha previsto como un componente de una dieta animal. La dieta puede proporcionarse simplemente para mantener un animal sano o, en ciertas realizaciones, la dieta está optimizada para facilitar un efecto profiláctico o terapéutico.

[0119] Dietas animales ilustrativas incluyen, pero no se limitan a las dietas para animales jóvenes, dietas para animales adultos normales, las dietas para animales viejos, dietas de pérdida de peso, las dietas de salud dental, dietas de salud de la tiroides, las dietas de salud gastrointestinales, dietas hipoalergénicas, dietas de salud renal, dietas saludables para 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.

[0120] En ciertas realizaciones, los extractos de plantas transgénicos descritos en este documento simplemente se agregan a la dieta como una fuente de alimento adicional (p. ej., aminoácido). El extracto puede incorporarse a un alimento para animales húmedo o un alimento para animales seco (p. ej., gránulo). En ciertas realizaciones, el extracto puede proporcionar un componente de fibra de la dieta.

Aplicaciones terapéuticas/profilácticas de extractos de plantas transgénicas que comprenden apoproteínas.

[0121] Se ha demostrado que los péptidos descritos en este documento (p. ej., los péptidos listados en las Tablas 1, 2, y/o 3) son terapéuticamente y/o profilácticamente eficaces en una serie de indicaciones que se caracterizan por una respuesta inflamatoria. Dichas indicaciones incluyen, p. ej., la aterosclerosis como se describe, p. ej., en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6,664,230, 6,933,279, 7,144,862, 7,166,578, 7,199,102 y Números de Publicación PCT: PCT/US2001/026497 (WO 2002/015923), y PCT/US2008/085409.

[0122] Por consiguiente, se cree que los extractos de plantas transgénicas como se describe en el presente documento que comprenden los péptidos o porciones de los mismos son igualmente eficaces en tales indicaciones. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, se describen 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 necesita una cantidad efectiva de un extracto de planta transgénico que comprende uno o más péptidos de las Tablas 1, 2, y/o 3, y/o un alimento que comprende un extracto de plantas transgénicas como se describe en el presente documento y un alimento capaz de ser ingerido por su valor nutricional, y/o una proteína en polvo en la que al menos una porción de la proteína en polvo comprende un extracto de plantas transgénicas como se describe en este documento.

[0123] En ciertas realizaciones, el extracto de plantas transgénicas comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en DWLKAFYDKFFEKFKEFF (6F, SEQ ID NO: 1), FFEKFKEFFKDYFAKLWD (rev6F, SEQ ID NO: 2), DWFKAFYDKVAEKFKAEAFKDKVAEKFKEA (SEQ ID NO: 3), FAEKFKEAVKDYFAKFWD (rev4F, SEQ ID NO: 4), LLEQLNEQFNWVSRLANL (SEQ ID NO: 5) y LVGRQLEEFL (SEQ ID NO: 6).

[0124] En la Tabla 5 se muestra una lista ilustrativa, pero no limitativa, de indicaciones/condiciones para las cuales los péptidos descritos en el presente documento son eficaces y/o se cree que son eficaces.

Tabla 5. Condiciones ilustrativas en las que los péptidos descrito en este documento (*p. ej.*, 4F, 6F, *etc.*) se ha demostrado que son o se cree que son eficaces. Se cree que los extractos de plantas transgénicas descritos aquí serán igualmente efectivos.

	aterosclerosis/síntomas/consecuencias de los mismos
	formación de placa
10	formación de lesiones
	infarto de miocardio
	infarto
	insuficiencia cardíaca congestiva
15	función vascular:
	función arteriolar
	enfermedad arteriolar
	asociado con el envejecimiento
	asociado con la enfermedad de Alzheimer
20	asociado con enfermedad renal crónica
	asociado con hipertensión
	asociado con demencia por infarto múltiple
	asociado con hemorragia subaracnoidea
	enfermedad vascular periférica
25	enfermedad pulmonar:
	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC),
	enfisema
	asma
30	fibrosis pulmonar idiopática
	fibrosis pulmonar
	síndrome de dificultad respiratoria del adulto
	osteoporosis
	Enfermedad de Paget
35	calcificación coronaria
	autoinmune:
	artritis reumatoide
	poliarteritis nodosa
40	polimialgia reumática
	lupus eritematoso
	esclerosis múltiple
	Granulomatosis de Wegener

(continuación)

5	enfermedad pulmonar:
	vasculitis del sistema nervioso central (CNSV)
	Síndrome de Sjogren
	esclerodermia
	polimiositis
10	Respuesta inflamatoria del SIDA
	infecciones:
	bacteriano
	hongos
	viral
15	parásito
	influenza (incluida la gripe aviar)
	neumonía viral
	síndrome de shock endotóxico
	septicemia
20	síndrome de sepsis (síndrome clínico en el que parece que el paciente es séptico pero no se recuperan organismos de la sangre)
	trauma/herida:
25	trasplante de órgano
	ateroesclerosis de trasplante
	rechazo de trasplante
	úlceras corneales
	herida crónica/no curativa
30	colitis ulcerosa
	lesión por reperfusión (prevenir y/o tratar)
	lesión por reperfusión isquémica (prevenir y/o tratar)
	lesiones de la médula espinal (efectos atenuantes)
	cánceres
35	mieloma/mieloma múltiple
	cáncer de ovarios
	cáncer de mama
	cáncer de colon
40	cáncer de hueso
	cáncer de cuello uterino
	cáncer de próstata
	osteoartritis
	Enfermedad inflamatoria intestinal
45	rinitis alérgica
	caquexia
	cánceres
	diabetes
	Enfermedad de Alzheimer
50	prótesis implantada
	formación de biopelículas
	Enfermedad de Crohn
	insuficiencia renal (insuficiencia renal aguda, insuficiencia renal crónica)
55	enfermedad de células falciformes, crisis de células falciformes
	mejora de la toxicidad de adriamicina
	mejora de la toxicidad de antraciclina
	para mejorar la sensibilidad a la insulina
	para tratar el síndrome metabólico
60	para aumentar la adiponectina
	para reducir la grasa abdominal
	dermatitis aguda y crónica
	eczema
	psoriasis
65	dermatitis de contacto

(continuación)

	esclerodermia
5	diabetes y afecciones relacionadas
	Diabetes tipo I
	Diabetes tipo II
	Diabetes de inicio juvenil
	Prevención de la aparición de diabetes.
10	Nefropatía diabética
	Neuropatía diabética
	Retinopatía diabética
	disfunción erectil
	degeneración macular
15	esclerosis múltiple
	nefropatía
	neuropatía
	Enfermedad de Parkinson
20	enfermedad vascular periférica
	meningitis
	Actividades biológicas específicas:
	aumentar la hemo oxigenasa 1
	aumentar la superóxido dismutasa extracelular
25	prevenir el desprendimiento endotelial
	prevenir la asociación de mieloperoxidasa con ApoA-I
	prevenir la nitrosilación de la tirosina en ApoA-I
	render HDL antiinflamatorio
	mejorar la vasoreactividad
30	aumentar la formación de HDL pre-beta
	promover el transporte inverso de colesterol
	promover el transporte inverso de colesterol de los macrófagos
	sinergizar la acción de las estatinas

[0125] Se hace notar que las condiciones enumeradas en la Tabla 5 están destinadas a ser ilustrativas y no limitantes.

Métodos de prevención o reducción de la absorción de los componentes micro-lipídicos proinflamatorios de la dieta.

[0126] Sin estar limitado por una teoría particular, se cree que una acción importante de los extractos de plantas transgénicas descritas en este documento es la reducción en los niveles de ácido lisofosfatídico (LPA) en el intestino delgado. Esto podría estar mediado por varios mecanismos. Anteriormente se postuló que la formación de LPA ocurre por dos vías (Aoki et al. (2008) Biochimica et Biophysica Acta, 1781: 513-518). El primero implica la acción de PLA 1 o PLA 2 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). El siguiente paso es la acción de una fosfolipasa D como la autotaxina para eliminar la colina y producir el ácido lisofosfatídico. La segunda vía implica el ácido fosfatídico que se forma a partir de la acción de la fosfolipasa D sobre un fosfolípido como el ácido fosfatídico generador de fosfatidilcolina o la acción de la diacilglicerol quinasa (DGK) sobre el diacilglicerol (DAG) que da como resultado 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.

[0127] Otro posible mecanismo para regular los niveles de LPA involucra tres enzimas conocidas como fosfatasa ácida 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.

[0128] 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 Chow y administrados o no D-4F en su agua potable. Se demostró previamente 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 el micromatriz. Si bien este experimento no descarta por completo el efecto de los miméticos de apolipoproteína sobre estas enzimas, sin limitarse a una teoría particular, se cree que las plantas transgénicas descritas en el presente documento alteran/reducen la LPA por otro mecanismo.

[0129] En particular, se cree que el mecanismo de acción de los extractos de tomate 6F transgénicos descritos en

este documento es que bloquean, o al menos inhiben parcialmente, la absorción de precursores en el enterocito tal como ácido fosfatídico (PA) o bloquean, o al menos inhiben parcialmente, la absorción en el enterocito de LPA preformada que está contenida en la dieta. Tal mecanismo es consistente con la acción conocida de los péptidos miméticos de apoA-I. A este respecto, se observa que la afinidad de unión de L-4F por LPA se aproxima a la afinidad de unión de avidina por biotina, que es la mayor afinidad de unión conocida.

[0130] Sin limitarse a una teoría particular, se cree que los componentes lipídicos de la dieta se pueden dividir en dos clases: componentes macro-lipídicos de la dieta y componentes micro-lipídicos de la dieta. El primero en una dieta occidental incluiría fosfolípidos como la fosfatidilcolina y esteroides como el colesterol. Estos están presentes en cantidades de miligramos por gramo de dieta. Incluso es probable que la lisofosfatidilcolina esté presente en cantidades de miligramos después de que PLA 2 actúe sobre la fosfatidilcolina en el duodeno. Los componentes de los micro lípidos están presentes en cantidades de microgramos por gramo de dieta. Como se mostró en estudios anteriores, la cantidad de péptido 6F intacto encontrado en el intestino delgado aproximadamente dos horas después de que los ratones consumieron la dieta occidental con tomates transgénicos 6F fue de $15,6 \pm 7,4 \mu\text{g}$ 6F por 200 mg de intestino delgado. Se cree que es poco probable que esta cantidad de péptido pueda unirse y prevenir la absorción de cantidades significativas de fosfolípidos o lisofosfatidilcolina o esteroides. Sin embargo, esta cantidad de péptido podría unirse y prevenir la absorción de cantidades de microgramos de ácido fosfatídico (PA) como la que está presente en los alimentos (ver, p. ej., Tanaka et al. ((2012) Agric. Food Chem., 60: 4156- 4161) o LPA preformada 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).

[0131] Por consiguiente, en vista de lo anterior, los métodos de prevención o reducción de la absorción de componentes micro-lipídicos pro-inflamatorios dietéticos (p. ej., ácido lisofosfatídico, ácido fosfatídico, y similares) se contemplan. En ciertas realizaciones, el método comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de un extracto de planta transgénico que tiene actividad ApoA-I como se describe y/o reivindica en el presente documento; y/o un alimento o ingrediente alimentario como se describe y/o reivindica en el presente documento; y/o una proteína en polvo como se describe y/o reivindica en el presente documento; y/o un suplemento nutricional como se describe y/o reivindica aquí.

[0132] Hemos observado que la alimentación de una dieta occidental (WD) a ratones nulos LDLR aumentó los niveles de ácido lisofosfatídico (LPA) insaturados (pero no saturados) en el intestino delgado. La adición de LPA insaturada a la comida para ratones con bajo contenido de grasa dio como resultado niveles de LPA insaturada en el intestino delgado y el plasma similares a los alcanzados en WD; imitó WD en causar dislipidemia e inflamación sistémica; y produjo niveles similares de aterosclerosis aórtica. Agregar tomates transgénicos que expresan el péptido mimético apoA-I 6F (Tg6F) al pienso de ratón suplementado con LPA insaturada o agregar Tg6F a WD disminuyó los niveles de LPA insaturados en el intestino delgado mejorando la dislipidemia y la aterosclerosis aórtica.

[0133] La adición de lisofosfatidilcolina insaturada (pero no saturada) (LisoPC) a piensos de ratón bajos en grasa produjo dislipidemia similar a la adición de LPA insaturado o la alimentación de WD. Un inhibidor oral específico de la autotaxina redujo la dislipidemia mediada por LisoPC. Presumimos que LisoPC (producido por la acción de la fosfolipasa A₂ del Grupo 1B sobre la fosfatidilcolina en la dieta) actúa sobre la autotaxina en el intestino delgado para producir LPA. Según los datos preliminares, planteamos la hipótesis de que el LPA insaturado derivado del intestino disminuye los niveles de ARNm y proteína de la enzima 1β (*Ire1 β*) que requiere inositol y aumenta los niveles y la actividad del ARNm de la proteína de transferencia de triglicéridos microscópicos (*Mtp*) en el intestino delgado, lo que resulta en un aumento secreción de lipoproteínas del intestino delgado.

[0134] WD causó la inducción de enzimas (*Lpcat3*; *Scd1*) en el intestino delgado que promueven la formación de fosfolípidos insaturados. Se cree que la eliminación específica de *Lpcat3* en el intestino conducirá a niveles aumentados de LPA insaturada en el intestino delgado en respuesta a la WD, y la eliminación específica de *Scd1* en el intestino conducirá a niveles disminuidos de LPA insaturada en el intestino delgado. Los datos preliminares demuestran que la respuesta inflamatoria a la LPA derivada intestinal está determinada genéticamente.

[0135] En un experimento preliminar para identificar los factores genéticos que controlan la respuesta a la LPA derivada del intestino usando los datos del Panel de Diversidad de Ratón Híbrido indicaron que Tg6F previene el aumento mediado por WD en los niveles de ARNm de *Mtp* en el intestino delgado. En consecuencia, se cree que un mecanismo por el cual Tg6F disminuye la dislipidemia mediada por WD es aumentando los niveles de proteína de *Ire1 β* ARNm y disminuyendo la actividad y el ARNm de *Mtp* en el intestino delgado, lo que conduce a una disminución de la secreción de lipoproteínas del intestino delgado. Basado en otros datos preliminares que muestran que i) la LPA insaturada induce la expresión de *Cd36* en el intestino delgado similar a WD; ii) Tg6F inhibe el aumento mediado por WD en la expresión de *Cd36* en el intestino delgado; y iii) los enterocitos del intestino delgado de los ratones en WD suplementados con Tg6F absorben menos colesterol, hipotetizamos que Tg6F disminuye la absorción de colesterol al interactuar con el enterocito CD36 en el intestino delgado proximal.

[0136] CD36 es reconocido como un receptor de lípidos y ácidos grasos y juega un papel importante en el síndrome metabólico y los eventos cardíacos asociados (ver, p. ej., Geloan et al. (2012) Plos One, DOI: 10.1371/journal.pone.0037633) En vista del efecto de Tg6F en CD36, se cree que la administración del extracto

descrito aquí también es útil en el tratamiento y/o profilaxis del síndrome metabólico y/o eventos cardíacos asociados.

EJEMPLOS

5 [0137] Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada.

Ejemplo 1

Concentración de actividad peptídica 6F en extracto de planta de tomate

10 [0138] Se construyeron tomates transgénicos con el vector pBI121 que contiene el gen *GUS* (tomates vacíos de control de vectores; EV) o se construyeron tomates transgénicos con el vector pBI121 en el que se reemplazó el gen *GUS* con una secuencia diseñada para expresar el péptido mimético apoA-I 6F (DWLKAFYDKFFKFEKFEFF, Seq ID NO: 1) (Tg6F) y crecido, liofilizado y molido en polvo como se describió previamente (Chattopadhyay et al. (2013) J. Lipid Res., 54: 995-10101). Se mezclaron a fondo diez gramos de tomate en polvo liofilizado de EV y diez gramos de polvo de tomate liofilizado de tomates Tg6F y se incubaron durante 24 horas en 250 µL de acetato de etilo (grado HPLC de Fisher Scientific, número de catálogo E195-4) que contiene ácido acético glacial al 5% (grado HPLC de Fisher Scientific, número de catálogo A35-500). La fase líquida se recogió y se secó bajo gas argón. Los sólidos restantes se disolvieron en 20 µL de agua destilada y luego se liofilizaron. Los extractos finales se recogieron. Se pesó y se almacenó a -20°C hasta su uso. El peso del extracto final de EV fue de 300 mg y el peso del extracto final de Tg6F fue de 310 mg. Los extractos se tomaron del congelador y todo el extracto de EV y todo el extracto de Tg6F se añadió a 500 gramos de dieta occidental en polvo (WD) (Teklad, Harlan, número de catálogo TD88137) en una mezcladora industrial y se mezcló completamente durante 30 minutos como se describió anteriormente (1,2). Las dietas se envasaron en Porciones de 16 gramos en alumi papel de aluminio y se mantiene a -20°C hasta su uso. Se alojaron ratones nulos receptores de LDL hembra de 6 a 7 meses de edad 4 por jaula y se proporcionó a cada jaula con 16 gramos WD o 16 gramos WD + EV o 16 gramos de WD + Tg6F cada noche. Después de dos semanas, se ayunó a los ratones durante la noche y se recogió sangre para determinar el colesterol en plasma (Fig. 1) y los triglicéridos (Fig. 2), que se determinaron como se describió previamente (Chattopadhyay et al. (2013) J. Lipid Res., 54: 995-10101; Navab et al. (2013) J. Lipid Res., 54: 3403-3418).

30 [0139] Los extractos que se agregaron a WD de EV y Tg6F fueron tomadas a partir de 10 gramos de polvo de tomate molido liofilizado. Los resultados mostrados en las Figuras 1 y 2 anteriores son al menos iguales a lo que publicamos previamente para alimentar a los ratones WD con polvo de tomate Tg6F molido liofilizado al 2,2% (*Id.*). Sin embargo, en los experimentos mostrados en las Figuras 1 y 2, los extractos solo representaron el 0,06% y 0,062% de las dietas en peso para EV y Tg6F, respectivamente. La cantidad de polvo de tomate liofilizado necesaria en peso se redujo en aproximadamente un 97% por el proceso de concentración. Por lo tanto, en lugar de tener que comer tres tazas de tomate en polvo Tg6F liofilizado tres veces al día para lograr una dosis total de 450 mg de péptido 6F por día, una persona solo necesitaría comer ~dos cucharadas de extracto en polvo tres veces al día para lograr la misma dosis. Esto aumentará en gran medida las posibilidades de cumplimiento para los pacientes.

40

Ejemplo 2

Extractos de plantas transgénicas para el tratamiento del cáncer.

45 [0140] Los ratones BALB/c se mantuvieron con comida de ratón normal y se inyectaron a través de venin cola con 2×10^4 células CT26 en 100 µl de PBS. Los ratones se alimentaron con comida o comida suplementada con polvo liofilizado de un extracto de tomates transgénicos que expresaban una proteína marcadora de control (EV) o que expresaban el péptido mimético apoA-I 6F (Tg6F) al 0,06% de la dieta en peso.

50 [0141] Después de 5 semanas, como se muestra en la Fig. 3A, se determinó el número de tumores metastásicos en los pulmones y, como se muestra en la Fig. 3B, se determinó el nivel plasmático de LPA 20: 4. Tres de los 12 ratones que recibieron Chow solo murieron y 2 de 12 ratones que recibieron Chow + EV murieron. Ninguno de los 12 ratones que recibieron Chow + Tg6F murió. Se determinó el número de tumores en ratones que murieron, pero no los niveles plasmáticos de LPA. Los niveles plasmáticos de LPA 20:4 se correlacionaron con el número de tumores en los pulmones. $p = 0,0159$.

55

Ejemplo 3

Eficacia de los concentrados de tomate en modelos de ratón de dislipidemia y cáncer

60

[0142] Hemos demostrado que la adición de polvo de tomate liofilizado a partir de plantas transgénicas que expresan el péptido mimético 6A de apolipoproteína A-I a 2,2% en peso a una dislipidemia mejorada de dieta occidental (WD) y aterosclerosis en ratones. Se determinó que la misma dosis en un humano requeriría tres tazas de tomate en polvo tres veces al día. Para reducir el volumen, buscamos un método para concentrar 6F. Sorprendentemente, la extracción del tomate transgénico liofilizado durante la noche en acetato de etilo con ácido acético al 5% dio como resultado una reducción de 37 veces en la cantidad de tomate transgénico necesaria para la actividad biológica. En un modelo de

65

dislipidemia en ratones, agregar 0,06% en peso del concentrado de tomate que expresa el péptido 6F (Tg6F) a una dieta occidental redujo significativamente el colesterol total en plasma y los triglicéridos ($p < 0,0065$). En un modelo de ratón de cáncer de colon metastásico a los pulmones, al agregar 0,06% de Tg6F, pero no un concentrado de tomate de control (EV), a la comida estándar de ratón se redujeron los neutrófilos asociados a tumores en $94 \pm 1,1\%$ ($p = 0,0052$), y se redujo carga tumoral en dos tercios ($p = 0,0371$). Agregar 0,06% de EV o Tg6F en peso al alimento estándar para ratones redujo significativamente la carga tumoral en un modelo de cáncer de ovario en ratones; sin embargo, Tg6F fue significativamente más efectivo (35% de reducción para EV versus 53% de reducción para Tg6F; $p = 0,0069$). Proporcionar la misma dosis de concentrado de tomate a los humanos requeriría solo alrededor de dos cucharadas tres veces al día, lo que lo convierte en un enfoque práctico para probar la terapia mimética de apoA-I oral en el tratamiento de la dislipidemia y el cáncer.

Introducción al Ejemplo 3

[0143] Estudios recientes sugieren que los péptidos miméticos de apolipoproteína (apo) AI y apoA-I pueden tener un papel en el tratamiento de una serie de tumores malignos. Las proteínas asociadas a HDL apoA-I, transtiretina y transferrina se han identificado como biomarcadores de cáncer de ovario (Kozak et al. 2003, 2005; Nossov et al. 2008, 2009). En un modelo de ratón de cáncer de ovario en el que los ratones tienen un sistema inmunitario normal, se descubrió que la expresión transgénica de apoA-1 humano disminuía significativamente la carga tumoral y prolongaba la supervivencia de los ratones (Su et al. 2010). Posteriormente, Hazen y sus colegas (Zamanian-Daryoush et al. 2013) informaron que la apoA-I suprimió potentemente el crecimiento tumoral y la metástasis en múltiples modelos de tumores animales a través de procesos inmunes innatos y adaptativos.

[0144] Su et al. (2010) demostraron que los péptidos miméticos apoA-I 4F y 5F administrados por vía oral o mediante inyección disminuyeron el crecimiento tumoral y disminuyeron los niveles de un promotor conocido del crecimiento tumoral, el ácido lisofosfatídico (LPA). Los mecanismos deducidos para desempeñar un papel en la eficacia de los péptidos miméticos de apoA-I incluyeron la disminución de la angiogénesis tumoral (Gao et al. 2011).

[0145] En otros estudios, se descubrió que el péptido 4F regulaba positivamente la enzima antioxidante superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) e inhibía la proliferación y la capacidad de formar tumores de células epiteliales de cáncer de ovario (Ganapathy et al. 2012).

[0146] El riesgo de endometrio (Cust et al. 2007) y cáncer de colon (van Duijnhoven et al. 2011) está inversamente correlacionado con los niveles de colesterol HDL. Agregar el péptido 4F al alimento para ratones disminuyó la carga tumoral, la angiogénesis tumoral y los niveles plasmáticos de LPA en un modelo de cáncer de colon en ratones (Su et al. 2012). En un modelo de ratón de poliposis adenomatosa familiar, la administración de 4F en comida para ratones también redujo el número y el tamaño de los tumores en el tracto intestinal y disminuyó los niveles de LPA en ratones C57BL/6J-Apc^{Min/+} (Su et al. 2012).

[0147] El factor-1 α inducible por hipoxia (HIF-1 α se indujo in vitro por LPA en líneas celulares de cáncer de ovario humano, y se redujo mediante la adición del péptido 4F (Gao et al. 2012). Además, la administración del péptido 4F disminuyó notablemente la expresión de HIF-1 α en tejidos tumorales de ovario de ratón (Gao et al. 2012).

[0148] La inflamación (Mantovani et al. 2008) y los macrófagos asociados a tumores juegan un papel importante en la progresión y metástasis de los cánceres (Zamanian-Daryoush et al. 2013; Qian et al. 2010). Se ha informado que el LPA aumenta la expresión del receptor del limpiador A (SR-A) en los macrófagos (Chang et al. 2008). Se ha demostrado que la expresión de SR-A en los macrófagos es necesaria y suficiente para promover la invasividad tumoral (Neyen et al. 2013a). Se informó que el péptido 4F es un potente inhibidor de SR-A (Neyen et al. 2009); La administración del péptido 4F inhibió la invasividad del tumor (Neyen et al. 2013a, 2013b). Por lo tanto, existe evidencia en modelos animales de que los péptidos miméticos de apoA-I y apoA-I pueden ser agentes terapéuticos potenciales para la mejora del cáncer.

[0149] Recientemente informamos un medio novedoso de administrar péptidos miméticos de apoA-I en modelos de aterosclerosis en ratones (Chattopadhyay et al. 2013; Navab et al. 2013, 2015). Mostramos que el péptido mimético de apoA-I 6F podría expresarse en plantas de tomate transgénicas. Cuando los tomates se secaron por congelación y se alimentaron a ratones nulos LDLR en una dieta occidental (WD), mejoraron la dislipidemia y la aterosclerosis (Chattopadhyay et al. 2013).

[0150] Los tomates transgénicos que expresan el péptido 6F (Tg6F) también mejoraron la dislipidemia y la aterosclerosis inducidas por la adición de ácido lisofosfatídico insaturado (LPA) a la comida para ratones estándar (Navab et al. 2015). En los estudios con ratones (Chattopadhyay et al. 2013; Navab et al. 2013, 2015), el polvo de tomate molido liofilizado se agregó a las dietas de ratones con un 2,2% en peso. Los ratones de laboratorio comen una sola dieta, lo que facilita la mezcla del polvo de tomate liofilizado. Por el contrario, las dietas humanas son mucho más complicadas, y sería un desafío usar polvo de tomate liofilizado como suplemento dietético debido a la cantidad de polvo requerida para lograr las mismas dosis del péptido que se lograron en ratones; Se necesitarían 3 tazas de polvo tres veces al día. Se consideró que este volumen no sería práctico para un uso generalizado. Por lo tanto, buscamos un método simple y económico para concentrar el péptido 6F de los tomates congelados para disminuir el

volumen requerido para lograr dosis terapéuticas. Ahora informamos que los concentrados de tomates transgénicos que expresan el péptido 6F pueden prepararse fácilmente, de modo que las dosis requeridas podrían administrarse a humanos usando no más de dos cucharadas de concentrado tres veces al día. También presentamos evidencia de que estos concentrados son efectivos en modelos de ratón de dislipidemia y en modelos de cáncer de ratón.

Materiales y métodos

Reactivos químicos

[0151] El etanol (n° de catálogo BP2818-100), acetato de etilo (grado HPLC; n° de catálogo E195-4) y ácido acético glacial (grado HPLC; n° de catálogo A35-500) se adquirieron de Fisher Scientific.

Células tumorales

[0152] La línea celular ID8 (una línea celular de adenocarcinoma seroso papilar epitelial de ovario de ratón) fue un regalo generoso de KF Roby (Centro de Ciencias Reproductivas, Centro Médico de la Universidad de Kansas, Kansas City, KS). La línea celular CT26 derivada del carcinoma de colon de ratón inducido por N-nitroso-N-metiluretano de origen BALB/c se adquirió de la American Type Culture Collection (ATCC).

[0153] El kit ELISA de apoA-I de ratón era de USCN Life Science, Inc. Wuhan, China (n° de catálogo SEA519Mu). Todos los demás materiales provienen de fuentes descritas anteriormente (Chattopadhyay et al. 2013; Navab et al. 2013, 2015) o como se indica específicamente a continuación.

Ratones

[0154] Los ratones hembra de tipo salvaje C57BL/6J y BALB/c fueron adquiridos de Jackson Laboratory y mantienen sobre comida estándar de ratón (Ralston Purina). Los ratones nulos LDLR en un fondo C57BL/6J se compraron en Jackson Laboratory y se criaron en la División de Laboratorio y Medicina Animal en UCLA. Todos los ratones nulos LDLR eran hembras. Todos los ratones se mantuvieron en comida para ratones estándar (Ralston Purina). Los ratones nulos LDLR se cambiaron a una dieta occidental (WD) (Teklad, Harlan, catálogo n° TD88137) durante el período establecido en la leyenda de la figura. Las edades de los ratones se indican en las leyendas de figura. Todos los experimentos con ratones fueron aprobados por el Comité de Investigación Animal en UCLA.

Preparación de concentrados de tomate

[0155] Las plantas de tomate transgénicas que expresan la proteína marcadora β -glucuronidasa (EV), o que expresan el péptido 6F (Tg6F) se construyeron y cultivaron en el Centro de Ciencia de Plantas Donald Danforth en St. Louis, MO como se describió previamente (Chattopadhyay et al. 2013). Los tomates se liberaron de semillas, se congelaron rápidamente y se enviaron congelados por mensajería nocturna a UCLA, donde se secaron por congelación (liofilizador VirTis, Gardner, NY) para obtener tejido seco de fruta de tomate (pulpa más piel), que se almacenó en: 80°C como se describió anteriormente (Chattopadhyay et al. 2013).

[0156] El EV liofilizado y tejido del fruto de tomate Tg6F se mezcló a fondo, ya sea en etanol acuoso (etanol/agua, 60/40; v/v), o acetato de etilo que contenía 5% de ácido acético glacial en una proporción de 1/25, p/v (gm/ml), y se extrajo durante 24 horas a temperatura ambiente. Después de 24 horas, la fase líquida se separó claramente de la fase sólida tanto en las extracciones de etanol/agua como de acetato de etilo/ácido acético. La fase líquida se recogió y el extracto de etanol/agua se secó al vacío; El extracto de acetato de etilo/ácido acético se secó bajo una corriente de argón. Los sólidos restantes se redisolviaron en agua destilada al 10% del volumen original y luego se liofilizaron. Los concentrados finales se pesaron y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Análisis de concentrados de tomates

[0157] 100 o 200 μ g de proteína de concentrado de tomate, o 5 μ g de péptido 6F auténtico producido por fase sólida se añadió la síntesis como se ha descrito previamente (Chattopadhyay et al. 2013). Para carriles de 18% SDS PAGE geles que se ejecutaron durante la noche. Los geles se fijaron en agua/metanol/ácido acético (50/50/7, v/v/v, 30 minutos a temperatura ambiente), se tiñeron durante una noche con Sypro Ruby (kit s12000, Life Technologies, NY; Invitrogen), y desteñido con agua/metanol/ácido acético (9/10/7, v/v/v, 30 min. a temperatura ambiente). Las imágenes de densitometría de los geles desteñidos se registraron utilizando el software de imagen J como se describió anteriormente (Chattopadhyay et al. 2013). Para confirmar la identidad de 6F, las bandas de interés se cortaron manualmente y se trataron con tripsina (10 μ L, 100 ng/ml de bicarbonato de amonio 50 mM, Trypsin Gold, V5280, Promega) durante la noche, a 37°C. Las rodajas de gel tratadas se eluyeron con agua/acetonitrilo/TFA (1 μ L, 50/50/0,1, v/v/v) y los eluatos se secaron en una centrifuga de vacío y se redisolviaron en 10 μ L de agua/acetonitrilo/TFA e inyectado en una columna LC de fase inversa (Agilent PLRP-S, tamaño de partícula de 5 micras, 300 Å de diámetro de poro, 150 x 2 mm) equilibrado en 95% de disolvente A (agua/ácido fórmico, 100/0,1, v/v) y Disolvente B al 5% (acetonitrilo/ácido fórmico, 100/0,1, v/v) y eluido a flujo constante (40°C, 200 μ L/min) con una proporción creciente de Disolvente B (% B/min: 0/5, 5/5, 45/100, 50/5, 60/5). El efluente de la columna se dirigió a una fuente de iones de

electrospray conectada a un espectrómetro de masas de trampa de iones cuadrupolo (Thermo LCQ Deca XP Plus) en el modo de iones positivos (m/z 50-2000, se promediaron 3 microscans, inyección máxima de 50 milisegundos hora). Los datos se procesaron en el software Thermo Xcalibre™.

5 **Preparación de las dietas**

[0158] Los concentrados de tomate se tomaron del congelador y se añadieron al pienso de ratón estándar o al WD en un mezclador industrial y se mezclaron completamente durante 30 minutos. como se describió anteriormente (Chattopadhyay et al. 2013; Navab et al. 2013, 2015) para producir una dieta final que contenga 0,015%, 0,03% o 0,06% en peso de cada concentrado de tomate. En algunos experimentos, el material de partida (es decir, los tomates transgénicos liofilizados a partir de los cuales se hicieron los concentrados) se agregó a la comida para ratones estándar al 2,2%, o 1,1% o 0,55% en peso como se describió anteriormente (Chattopadhyay et al. 2013; Navab et al. 2013, 2015) y se utilizan como controles. Las dietas se envasaron en porciones de 16 gramos en papel de aluminio y se mantuvieron a -80°C hasta su uso. La adición de 0,06% en peso proporcionó a los ratones una dosis diaria de $< 120 \text{ mg/kg/día}$ por ratón de concentrado de tomate, que proporcionó $< 7 \text{ mg/kg/día}$ por ratón del péptido 6F. En los estudios de cáncer, la administración de los concentrados de tomate comenzó el día después de la inyección de las células cancerosas.

Estudios de cáncer de colon metastásico

[0159] Se administraron ratones BALB/c hembras de 6 semanas de edad 2×10^4 células CT26 en $100 \mu\text{L}$ de PBS mediante inyección en la vena de la cola como se describió anteriormente (Su et al. 2012). Después de la inyección, los ratones se mantuvieron en comida para ratones estándar o comida para ratones estándar que contenía 0,06% en peso de EV, o 0,06% en peso de Tg6F. Después de 4 semanas, los ratones fueron sometidos a una hemorragia terminal, y después del sacrificio, los pulmones fueron cosechados, pesados y fijados con la solución de Bouin (Sigma), y el número de nódulos tumorales en la superficie de los pulmones se determinó como se describió previamente (Su et al. al. 2012). Para la determinación de neutrófilos asociados a tumores, se prepararon secciones de tumores seleccionados al azar de los pulmones de tres ratones en cada grupo de tratamiento. Los portaobjetos se colocaron en xileno para eliminar la parafina y luego se procesaron a través de una serie de enjuagues de etanol. Después de un lavado en agua corriente, los portaobjetos se incubaron en una solución de metanol/peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos. Después de un lavado en agua destilada, los portaobjetos se incubaron durante 2 minutos en solución EDTA pH 8,0 (Invitrogen, número de catálogo 005501) a 95°C usando una olla a presión. Los portaobjetos se llevaron a temperatura ambiente, se enjuagaron en solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween-20 (PBST) y luego se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con anticuerpo anti-Ly6G (BD Pharmingen, número de catálogo 551459) a una dilución de 1: 1500. Los portaobjetos se enjuagaron con PBST y luego se incubaron con inmunoglobulinas anti-ratas de conejo policlonales/HRP (Dako, número de catálogo P0450) a una dilución de 1: 200 a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los portaobjetos se enjuagaron con PBST y se incubaron con Dako EnVision + System-HRP, anticuerpo anti-conejo de polímero marcado (Dako, número de catálogo K4003) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de un enjuague con PBST, los portaobjetos se incubaron con 3,3'-diaminobencidina (DAB) para su visualización. Posteriormente, los portaobjetos se lavaron en agua corriente, se contratiñeron con hematoxilina de Harris, se deshidrataron en etanol y se montaron con medios. Los controles consistieron en secciones expuestas a anticuerpos secundarios solamente. Las fotomicrografías se capturaron utilizando un microscopio Olympus BX51 y la aplicación Q Capture 7,0 (Q Imaging Inc.). Los campos seleccionados al azar se cuantificaron para cada muestra y se determinó la proporción de la señal de tinción con respecto al área de superficie del tumor usando Image Pro Plus 7 (Media Cybernetics).

Estudios de cáncer de ovario

[0160] A las hembras C57BL/6J ratones de 9 semanas de edad se les administró una inyección intraperitoneal de 8×10^6 células ID8 en un volumen total de $0,8 \mu\text{L}$ de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM sin suplementos). Después de la inyección, los ratones se mantuvieron en comida para ratones estándar o comida para ratones estándar que contenía 0,06% en peso de EV, o 0,06% en peso de Tg6F. Después de 12 semanas, los ratones fueron sometidos a un sangrado terminal, y después del sacrificio se determinó el número de nódulos tumorales en las superficies peritoneales y en la superficie de los órganos abdominales como se describió anteriormente (Su et al. 2010).

Ensayos en plasma

[0161] El colesterol total en plasma, los triglicéridos, el colesterol HDL, la actividad paraoxonasa-1 (PON), el amiloide sérico A (SAA) y la apoA-I se analizaron usando kits y procedimientos descritos por los fabricantes del kit como se describió previamente (Chattopadhyay et al. 2013; Navab et al. 2013, 2015). Las especies de ácido lisofosfatídico (LPA) se determinaron por LCMS/MS/MRM como se describió previamente (Chattopadhyay et al. 2013; Navab et al. 2013, 2015), y la cromatografía líquida de rendimiento rápido (FPLC) se realizó como se describió anteriormente (Chattopadhyay et al., 2013; Navab et al. 2013).

Métodos estadísticos

[0162] Los análisis estadísticos se realizaron por ANOVA y por prueba t de dos colas sin emparejar, o por regresión lineal usando GraphPad Prism versión 5,03 (GraphPad Software, San Diego, CA). La significación estadística se consideró alcanzada si $p < 0,05$.

Resultados

Acetato de etilo con ácido acético al 5% (pero no el 60% de etanol) concentra eficientemente el péptido 6F producido en tomates transgénicos.

[0163] Se encontraron 23 microgramos de 6F en 100 µg de proteína concentrada de tomate preparada con acetato de etilo con 5% ácido acético (Fig. 4A). En contraste, los concentrados preparados con etanol al 60% no contenían cantidades detectables de 6F (Fig. 4B). La presencia del péptido 6F se confirmó en el concentrado de Tg6F (pero no en el concentrado EV) por LC de fase inversa y espectrometría de masas (Fig. 4C). En base a estos resultados, todos los experimentos posteriores utilizaron concentrados de tomate preparados con acetato de etilo con ácido acético al 5%.

Respuesta a la dosis de concentrados de tomate

[0164] Para determinar la respuesta a la dosis de los concentrados de tomate, utilizamos un modelo de dislipidemia en ratón como se muestra en las Figs. 5A-5H. Los datos en estas figuras demuestran que los concentrados de tomate fueron al menos tan efectivos para mejorar los lípidos plasmáticos como lo fue el material de partida (es decir, los tomates transgénicos liofilizados a partir de los cuales se concentraron los concentrados). En base a estos resultados, utilizamos una dosis de 0,06% en peso de los concentrados de tomate en todos los experimentos posteriores.

Administración de concentrado de tomate que contiene el péptido 6F redujo significativamente la metástasis de las células de cáncer de colon a los pulmones

[0165] El peso de los pulmones después de la administración intravenosa del cáncer de colon las células fueron significativamente menores después de la administración de Tg6F en comparación con los ratones que no recibieron ningún concentrado de tomate, o en comparación con los ratones que recibieron EV (Fig. 6A). El número de nódulos tumorales en la superficie de los pulmones fue menor después de la administración de EV, pero esto no alcanzó significación estadística (Fig. 6B). En contraste, hubo una reducción significativa y notable de dos tercios en el número de nódulos tumorales en la superficie de los pulmones después de la administración de Tg6F (Fig. 6B). De acuerdo con nuestro informe anterior sobre la eficacia del péptido 4F en este modelo (Su et al. 2012), los niveles plasmáticos de LPA 20: 4 se redujeron significativamente con la administración de Tg6F, pero los niveles plasmáticos de LPA 20: 4 no disminuyeron con administración de EV (Fig. 6C). Los niveles plasmáticos de otras especies de LPA incluyendo LPA 18: 2, LPA 18: 1 y LPA 18: 0 no se redujeron significativamente (datos no mostrados).

[0166] Ya en 1995 se acumulaba evidencia de que los granulocitos podrían promover el crecimiento tumoral (Pekarek et al. 1995). Posteriormente se demostró que el crecimiento tumoral en los pulmones es promovido por la elastasa de neutrófilos (Houghton et al. 2010). Por lo tanto, determinamos el contenido de neutrófilos asociados a tumores en este modelo de ratón de células de cáncer de colon con metástasis a los pulmones. En la Fig. 7A se muestra una microfotografía representativa de los neutrófilos asociados a tumores en cada uno de los grupos de tratamiento y los datos se muestran en la Fig. 7B. Sorprendentemente, la adición de 0,06% en peso de Tg6F a la comida para ratones estándar redujo los neutrófilos asociados a tumores en $94 \pm 1,1\%$ ($p = 0,0052$).

Administración de concentrado de tomate que contiene el péptido 6F fue significativamente más efectiva que el concentrado de tomate de control para reducir la carga tumoral de células de cáncer de ovario

[0167] En un modelo de ratón de cáncer de ovario en el que se inyectaron células de cáncer de ovario de ratón en el peritoneo de ratones hembras con normalidad. función inmune, el número total de nódulos tumorales en el abdomen se redujo significativamente en aproximadamente un 35% en ratones que recibieron EV ($p = 0,0013$) en comparación con los ratones que recibieron comida para ratones estándar sola (Fig. 8A). En los ratones que recibieron Tg6F, el número total de nódulos tumorales en el abdomen se redujo en aproximadamente un 53% ($p < 0,0001$) en comparación con los ratones que recibieron comida para ratones estándar sola (Fig. 8A). La diferencia entre el número total de nódulos tumorales en el abdomen de los ratones que recibieron EV en comparación con los que recibieron Tg6F fue muy significativa ($p = 0,0069$) (Fig. 8A).

[0168] El número de nódulos tumorales en la superficie de la cavidad peritoneal disminuyó significativamente en aproximadamente un 35% en ratones que recibieron EV ($p = 0,0021$) en comparación con la comida para ratones estándar sola (Fig. 8B). La disminución en los ratones que recibieron Tg6F fue aproximadamente del 55% ($p < 0,0001$) en comparación con la comida para ratones estándar sola (Fig. 8B). La diferencia en el número de nódulos tumorales en la superficie de la cavidad peritoneal en ratones que recibieron EV en comparación con los ratones que recibieron Tg6F fue muy significativa ($p = 0,0048$) (Fig. 8B).

[0169] El número de nódulos tumorales en la superficie del diafragma se redujo significativamente en

aproximadamente un 35% en ratones que recibieron EV ($p = 0,0127$) en comparación con la comida para ratones estándar sola (Fig. 8C). El número de nódulos tumorales en la superficie del diafragma se redujo significativamente en ratones que recibieron Tg6F en aproximadamente un 45% ($p = 0,0016$) en comparación con la comida para ratones estándar sola (Fig. 8C). La diferencia entre los ratones que recibieron EV y Tg6F no fue significativa (Fig. 8C).

[0170] El número de nódulos tumorales en la superficie del intestino no cambió significativamente en los ratones que recibieron EV en comparación con el alimento para ratones estándar solo, pero hubo una disminución significativa en los ratones que recibieron Tg6F ($p = 0,0134$) en comparación con los ratones que recibieron el estándar mouse chow solo (Fig. 8D). La diferencia entre el número de nódulos tumorales en la superficie del intestino en ratones que recibieron EV en comparación con los ratones que recibieron Tg6F fue muy significativa ($p = 0,0035$) (Fig. 8D).

[0171] El número de nódulos tumorales en el abdomen que midió >1 mm de tamaño no disminuyó significativamente por EV en comparación con los ratones que recibieron comida para ratones estándar sola, pero hubo una disminución significativa del 52% en el número de nódulos tumorales en el abdomen midiendo más de 1 mm de tamaño en los ratones que recibieron Tg6F ($p = 0,0267$) en comparación con los ratones que recibieron comida para ratones estándar sola (Fig. 8E). La diferencia entre los ratones que recibieron EV en comparación con los ratones que recibieron Tg6F también fue significativa ($p = 0,0267$) (Fig. 8E).

[0172] En contraste con el caso en el modelo de cáncer de colon metastásico (Fig. 6C), y en contraste con nuestros estudios previos con el péptido 4F (Su et al. 2010, 2012) no hubo cambios significativos en los niveles de plasma Especies LPA (datos no mostrados). Del mismo modo, no hubo diferencias significativas en los niveles de colesterol total en plasma en ratones que recibieron EV en comparación con Tg6F (Fig. 9A), y los niveles de colesterol total en plasma no se correlacionaron con el número total de nódulos tumorales (Fig. 9B). Sin embargo, los niveles de triglicéridos en plasma se redujeron significativamente en los ratones que recibieron concentrado de tomate en comparación con los ratones que recibieron comida para ratones estándar sola, y no hubo diferencias significativas en los niveles de triglicéridos en plasma en los ratones que recibieron EV en comparación con Tg6F (Fig. 9C). El número total de nódulos tumorales se correlacionó significativamente y positivamente con los niveles de triglicéridos en plasma ($r^2 = 0,1375$; $p = 0,0022$) (Fig. 9D). Los niveles de colesterol HDL en plasma fueron significativamente más altos en los ratones que recibieron concentrado de tomate en comparación con los ratones que recibieron comida para ratones estándar sola, y no hubo diferencias significativas en niveles de colesterol HDL en ratones que reciben EV en comparación con Tg6F (Fig. 9E). Los niveles de colesterol HDL no se correlacionaron significativamente con el número total de nódulos tumorales (Fig. 9F). Los niveles de apoA-I en plasma fueron significativamente más altos en ratones que recibieron concentrado de tomate en comparación con los ratones que recibieron comida sola, y no hubo diferencias significativas en los niveles de apoA-I en ratones que recibieron EV en comparación con Tg6F (Fig. 9G). De acuerdo con nuestros datos anteriores (Su et al. 2010) y el de Hazen y colegas (Zamanian-Daryoush et al. 2013), los niveles plasmáticos de apoA-I se correlacionaron inversa y significativamente con el número total de nódulos tumorales ($r^2 = 0,1096$; $p = 0,0062$) (Fig. 9H). Los niveles plasmáticos de amiloide A (SAA) en suero fueron significativamente más bajos en los ratones que recibieron concentrado de tomate en comparación con los ratones que recibieron comida sola, y no hubo diferencias significativas en los niveles de SAA en los ratones que recibieron EV en comparación con Tg6F (Fig. 9I). Los niveles de SAA en plasma se correlacionaron débil pero significativamente con el número total de nódulos tumorales ($r^2 = 0,06950$; $p = 0,0325$) (Fig. 9J).

Discusión

[0173] Los resultados informados aquí establecen una nueva forma de concentrar péptidos miméticos de apoA-I producidos en plantas transgénicas. Se sabe que los tomates son ricos en polifenoles antioxidantes (Minoggio et al. 2003). Tanto el etanol como el acetato de etilo concentran polifenoles, siendo el etanol superior a altas concentraciones (Gadkari et al. 2014), sin embargo, el péptido 6F se encontró en abundancia en acetato de etilo, pero no en concentrados acuosos de etanol (Fig. 1). La capacidad de concentrar el péptido 6F en acetato de etilo se mejoró mediante la adición de pequeñas cantidades de ácido acético y el efecto máximo se observó en ácido acético al 5% (datos no mostrados). La eficiencia de extracción de este disolvente probablemente se deba al alto contenido de fenilalanina (6 de los 18 residuos de aminoácidos son fenilalanina) y 8 de cada 10 residuos hidrofóbicos son aromáticos en 6F. La eficiencia de extracción dio como resultado que se encontraran 23 μg de péptido 6F en la banda de los carriles en los que se cargaron 100 μg de proteína Tg6 en los geles (Fig. 1A). La explicación de por qué siete de nueve fragmentos 6F predichos (http://web.expasy.org/peptide_mass/; máximo 1 escisión perdida) se detectaron en los digeridos de tripsina de Tg6F, pero no del estándar 6F donde seis de los fragmentos predichos en se detectaron los digeridos de tripsina, probablemente debido al hecho de que 23 μg de 6F fueron sometidos a tratamiento con tripsina seguido de LC de fase inversa y espectrometría de masas en el caso de Tg6F, mientras que en el caso del estándar 6F elegimos analizar el Banda de 5 μg (Figs. 1A y 1C).

[0174] El proceso de concentración dio como resultado una reducción de 37 veces en el peso del polvo de tomate transgénico requerido para la actividad biológica (Fig. 5). Quizás lo más importante es que el volumen de polvo de tomate transgénico liofilizado requerido para administrar dosis a humanos similares a las utilizadas en los estudios con ratones se reduciría de 3,0 tazas de polvo de tomate liofilizado tres veces al día a dos cucharadas tres veces al día. Esta reducción dramática en el volumen requerido hace que este enfoque sea mucho más probable que sea aceptable como modalidad de tratamiento.

[0175] Anteriormente informamos que el contenido de péptido 6F de los tomates transgénicos liofilizados que expresaban 6F representaba del 0,6% al 1,0% del peso del polvo de tomate liofilizado (Chattopadhyay et al. 2013). Por lo tanto, 1 mg del polvo de tomate liofilizado contendría 0,006 a 0,01 mg de péptido 6F. Los datos en la Fig. 4 indican que el péptido 6F en el concentrado de tomate de los tomates transgénicos que expresan el péptido 6F constituía el 23% del peso de las proteínas en el concentrado. El contenido de proteína de los concentrados de tomate fue < 25% (datos no mostrados). Por lo tanto, 1 mg del concentrado de tomate contendría 0,0575 mg de 6F. Esto representa aproximadamente una concentración de 6 a 10 veces del péptido 6F en comparación con el polvo de tomate liofilizado inicial. Sin embargo, hubo una reducción de 37 veces en el peso del concentrado de Tg6F requerido para lograr la misma actividad biológica que se logró con el polvo de tomate de liofilización Tg6F inicial (Figs. 5E-5H). La explicación de la ganancia desproporcionada en la actividad biológica podría deberse a la concentración concomitante de antioxidantes de tomate y/o un cambio en la conformación del péptido 6F en el concentrado que favorece la interacción con los receptores en comparación con el material de partida liofilizado.

[0176] Es interesante que la ingestión de un té rico en catequinas durante 12 semanas condujo a una reducción significativa en la grasa corporal que se correlacionó con un cambio en las concentraciones de LDL modificada con malondialdehído en humanos (Nagao et al. 2005). Tanto el etanol como el acetato de etilo concentran eficientemente las catequinas (Gadkari et al. 2014). El acetato de etilo se encuentra naturalmente en algunas frutas y verduras, y se usa comercialmente para descafeinar café y té (Ramalakshmi et al. 1999), lo que sugiere que su uso para preparar concentrados de tomate probablemente sea seguro para los humanos.

[0177] Se ha informado de que la dieta de licopeno y extracto de tomate suplementados inhibidas no alcohólica hepatocarcinogenesis esteatohepatitis-promovido en roedores por un proceso que parece implicar la reducción del estrés oxidativo (Wang et al. 2009). Se demostró que los extractos de acetato de etilo del té que eran ricos en polifenoles y antioxidantes reducen los niveles de LDL y triglicéridos en ratas y provocan la detención del crecimiento de las células de hepatoma humano al inducir la expresión de p53 y aumentar la expresión de p21 (Way et al, 2009). Por lo tanto, parece probable que algunos de los beneficios observados en nuestros estudios se deban a los antioxidantes de tomate que se producen naturalmente en los concentrados.

[0178] La reducción en los niveles de LPA 20: 4 en el modelo de cáncer de colon metastásico por Tg6F, pero no por EV (Fig. 6C) es consistente con que LPA desempeñe un papel en este modelo. Sin embargo, el mecanismo de acción de Tg6F para reducir la carga tumoral en el modelo de cáncer de ovario debe ser más complicado ya que Tg6F no redujo los niveles de LPA. Estos resultados contrastan con el caso de 4F (Su et al. 2010, 2012). A pesar de la falta de superioridad en comparación con EV en la alteración de los niveles de lípidos plasmáticos, apoA-I y SAA en el modelo de ratón de cáncer de ovario, Tg6F fue claramente superior en la reducción de la carga tumoral en el modelo de ratón de cáncer de ovario en comparación con EV (Figs. 8A-8E). Por lo tanto, el mecanismo de acción de Tg6F en la reducción de la carga tumoral en el modelo de ratón de cáncer de ovario sigue siendo desconocido en este momento.

[0179] Al considerar los mecanismos que explican la superioridad de Tg6F en comparación con EV, debe recordarse que 2 horas después de alimentar Tg6F a ratones encontramos péptido 6F intacto en la luz del intestino delgado, pero no en el plasma (Chattopadhyay et al. 2013). Posteriormente, otro grupo que usó un péptido mimético apoA-I completamente diferente (Zhao et al, 2014) descubrió que la administración oral de su péptido mimético apoA-I era tan efectiva como cuando se administraba la misma dosis por inyección. Sin embargo, cuando el péptido se administró por inyección, se encontraron altos niveles de péptido en plasma, y cuando se administró por vía oral, el péptido no se detectó en el plasma (Zhao et al. 2014). Por lo tanto, nuestro trabajo y el de Zhao et al. (2014) es consistente con un mecanismo de acción primario para estos péptidos miméticos de apoA-I en el intestino; no en el plasma.

[0180] ¿Qué mecanismos podrían estar involucrados? En el caso del modelo de ratón de cáncer de colon metastásico, y en el modelo de ratón de cáncer de ovario, los tratamientos comenzaron el día después de la inyección de las células tumorales, por lo tanto, parece poco probable que impidieran la absorción del tumor. Sin limitarse a una teoría particular, se cree que el mecanismo de acción más probable para Tg6F en la reducción de la carga tumoral es la modulación de las células inmunes que interactúan con el tumor como se muestra en las Figs. 7A-7C.

[0181] Hay al menos dos receptores que se sabe que son importantes en el intestino delgado que han demostrado interactuar con los péptidos miméticos de apoA-I, lo que resulta en la modulación de la actividad biológica de estos receptores; CD36 (Baranov et al. 2008) y receptores de captador clase B tipos I y II (Leelahavanichkul et al. 2012). Se sabe que CD36 es importante para la absorción de ácidos grasos y colesterol por el intestino proximal, pero no por el distal (Nassir et al. 2007). También se sabe que CD36 es importante para modular la interacción de las bacterias intestinales con el intestino delgado (Barnaova et al. 2008). Por lo tanto, es posible que Tg6F interactúe con CD36 en el intestino delgado proximal resultando en una alteración de las células inmunes en la lámina propia de las vellosidades intestinales. El intestino contiene la mayor cantidad de células inmunes en el cuerpo (Mowat y Agace 2014). Se ha propuesto que puede haber diferentes tipos de neutrófilos similares al caso de los macrófagos protumorigénicos y antitumorales (Fridlender y Albelda 2012). Sin estar atados a una teoría particular, los resultados sorprendentes vistos en las Figs. 7A-7B con respecto a los neutrófilos asociados a tumores puede deberse a un cambio en la diferenciación mielóide inducida por la interacción de Tg6F con CD36 en el intestino delgado proximal.

[0182] Según los datos presentados aquí y nuestros datos publicados previamente, independientemente de los mecanismos involucrados, el uso de Tg6F para la prevención o el tratamiento del cáncer parece prometedor. La vía oral de administración es conveniente, la preparación de un concentrado de tomate usando los métodos simples descritos aquí es probable que sea económica, y un concentrado de tomate que contenga un residuo de 18 aminoácidos que parece estar degradado en el proceso de digestión (es decir, péptido intacto se encontró en el intestino delgado 2 horas después de la alimentación, pero el péptido nunca se detectó en plasma) (Chattopadhyay et al. 2013) es probable que sea seguro.

[0183] En resumen, estos estudios i) proporcionar un medio sencillo y económico para concentrar dramáticamente un péptido mimético de apoA-I producido en tomates transgénicos que hace que las pruebas terapia apoA-I oral en humanos una estrategia viable; y ii) proporcionan evidencia adicional de que los péptidos miméticos apoA-I orales son un medio novedoso para reducir la carga tumoral en modelos de ratón, pero por mecanismos que probablemente sean más complicados de lo que se pensaba anteriormente.

Referencias para el Ejemplo 3

[0184]

Baranova et al. (2008). Role of CD36 in bacterial recognition, phagocytosis, and pathogen-induced JNK-mediated signaling. *J Immunol.* 181: 7147-7156.

Chang et al. (2008) Lysophosphatidic acid-induced oxidized low-density lipoprotein uptake is class A scavenger receptor-dependent in macrophages, *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 87: 20-25.

Chattopadhyay et al. (2013) A novel approach to oral apoA-I mimetic therapy, *J. Lipid Res* 54: 995-1010.

Cust et al. (2007) Metabolic syndrome, plasma lipid, lipoprotein and glucose levels, and endometrial cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Endocr. Relat. Cancer* 14: 755-767.

Fridlender y Albelda (2012) Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis.* 33: 949-955.

Gadkari PV, Kadimi US, y Balaraman M. (2014) Catechin concentrates of garden tea leaves (*Camellia sinensis* L.): extraction/isolation and evaluation of chemical composition. *J Sci Food Agric* 94: 2921-2928.

Ganapathy et al. (2012) D-4F, an apoA-I mimetic peptide, inhibits proliferation and tumorigenicity of epithelial ovarian cancer cells by upregulating the antioxidant enzyme MnSOD. *Int J Cancer* 130: 1071-1081.

Gao et al. (2011) L-5F, an apolipoprotein A-I mimetic, inhibits tumor angiogenesis by suppressing VEGF/basic FGF signaling pathways. *Integr Biol* 3: 479-489.

Gao et al. (2012) Apolipoprotein A-I mimetic peptides inhibit expression and activity of Hypoxia-inducible factor-1 α in human ovarian cancer cell lines and a mouse ovarian cancer model. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 342: 255-262.

Houghton et al. (2010). Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nat Med.* 16: 219-223.

Kozak et al. (2003) Identification of biomarkers for ovarian cancer using strong anion-exchange ProteinChips: potential use in diagnosis and prognosis. *Proc Natl Acad Sci. EE.UU.* 100: 12343-12348.

Kozak et al. (2005) Characterization of serum biomarkers for detection of early stage ovarian cancer. *Proteomics* 5: 4589-4596.

Leelahavanichkul et al. (2012). Class B scavenger receptor types I and II and CD36 targeting improves sepsis survival and acute outcomes in mice. *J Immunol.* 188: 2749-2758.

Mantovani et al. (2008) Cancer-related inflammation, *Nature* 454: 436-444.

Minoggio et al. (2003) Polyphenol pattern and antioxidant activity of different tomato lines and cultivars. *Ann Nutr Metab* 47: 64-69.

Mowat y Agace (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol.* 14: 667-685.

Nagao et al. (2005) Ingestion of a tea rich in catechins leads to a reduction in body fat and malondialdehyde-modified

LDL in men. *Am J Clin Nutr* 81: 122-129.

Nassir et al. (2007). CD36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not the distal intestine.

J Biol Chem. 282: 19493-19501.

Navab et al. (2013) Transgenic 6F tomatoes act on the small intestine to prevent systemic inflammation and dyslipidemia caused by Western diet and intestinally derived lysophosphatidic acid, *J. Lipid Res* 54: 3403-3418.

Navab et al. (2015) Source and role of intestinally-derived lysophosphatidic acid in dyslipidemia and atherosclerosis. *J. Lipid Res* 56: [Epub ahead of print].

Neyen et al. (2009) Macrophage scavenger receptor A mediates adhesion to apolipoproteins A-I and E, *Biochemistry*

48: 11858-11871.

Neyen et al. (2013a) Macrophage scavenger receptor A promotes tumor progression in murine models of ovarian and pancreatic cancer, *J. Immunol* 190: 3798-3805.

Neyen et al. (2013b) An apolipoprotein A-I mimetic targets scavenger receptor A on tumor-associated macrophages.

A prospective treatment? *Oncoimmunology* 2: e24461.

Nossov et al. (2008) The early detection of ovarian cancer from traditional methods to proteomics. Can we really do better than serum CA-125? *Am J. Obstet Gynecol.* 199: 215-223.

Nossov et al. (2009) Validation of serum biomarkers for detection of early-stage ovarian cancer. *Am J. Obstet Gynecol* 200: 639.e1-639.e5.

Pekarek et al. (1995). Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. *J Exp Med.* 181: 435-440.

Qian and Pollard (2010) Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis, *Cell* 141: 39-51.

Ramalakshmi y Raghavan (1999) Caffeine in coffee: Its removal. Why and how? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 39: 441-456.

Su et al. (2010) Apolipoprotein A-I (apoA-I) and apoA-I mimetic peptides inhibit tumor development in a mouse model of ovarian cancer. *PNAS* 107: 19997-20002.

Su et al. (2012) HDL mimetics inhibit tumor development in both induced and spontaneous mouse models of colon cancer, *Mol. Cancer Ther* 11: 1311-1319.

van Duijnhoven et al. (2011) Blood lipid and lipoprotein concentrations and colorectal cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Gut* 60: 1094-1102.

Wang et al. (2009) Dietary lycopene and tomato extract supplementations inhibit nonalcoholic steatohepatitis-promoted hepatocarcinogenesis in rats. *Int J Cancer.* 126: 1788-1796.

Way et al. (2009) Pu-erh tea attenuates hyperlipogenesis and induces hepatoma cells growth arrest through activating AMP-activated protein kinase (AMPK) in human HepG2 cells. *J Agric Food Chem* 57: 5257-5264.

Zhao et al. (2014) In vivo efficacy of HDL-like nanolipid particles containing multivalent peptide mimetics of apolipoprotein A-I. *J Lipid Res.* 55: 2053-2063.

Zamanian-Daryoush et al. (2013) The cardioprotective protein apolipoprotein A1 promotes potent anti-tumorigenic effects. *J Biol Chem* 288: 21237-21252.

REIVINDICACIONES

1. Un método para concentrar péptidos miméticos de apoA-I transgénicos expresados en una planta de tomate transgénica, comprendiendo dicho método:

proporcionar un tejido de dicha planta transgénica en el que dicho tejido contiene un péptido mimético de ApoA-I heterólogo expresado por dicha planta, y en donde dicho el tejido se proporciona como un polvo sustancialmente seco; mezclar dicho polvo con una solución que comprende acetato de etilo y ácido acético para formar una mezcla de extracción; recoger la fase líquida de dicha mezcla y secar dicha fase líquida para proporcionar un extracto concentrado de polvo seco que muestra la actividad biológica de dicho mimético de apoA-I.

2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha solución comprende aproximadamente 1% a aproximadamente 25% de ácido acético, o aproximadamente 2% a aproximadamente 20% de ácido acético, o aproximadamente 3% a aproximadamente 15% de ácido acético, o aproximadamente 4% a aproximadamente 10% de ácido acético, o aproximadamente 4% a aproximadamente 8% de ácido acético, o aproximadamente 4% a aproximadamente 6% de ácido acético.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicha mezcla comprende mezclar dicho polvo con una solución que comprende acetato de etilo y ácido acético, opcionalmente en donde dicha solución comprende aproximadamente 5% de ácido acético.

4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho tejido de suministro comprende proporcionar dicho tejido como un polvo liofilizado.

5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicha mezcla de dicho polvo con una solución de acetato de etilo y ácido acético comprende incubar dicha mezcla de extracción durante al menos 15 minutos, o al menos 1/2 hora, o al menos 1 hora, o al menos 2 horas, o al menos 3 horas, o al menos 4 horas, o al menos 5 horas, o al menos 6 horas, o al menos 7 horas, o al menos 12 horas, o al menos 18 horas, o al menos 24 horas, o al menos 48 horas, o al menos 72 horas, o al menos 96 horas.

6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicha recogida de la fase líquida y secado de dicha fase líquida comprende secar la fase líquida para producir dicho extracto en polvo seco.

7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicha recogida de la fase líquida y secado de dicha fase líquida comprende:

secado de la fase líquida para producir un residuo seco;
resuspender dicho residuo en agua para proporcionar una mezcla resuspendida; y
secar la mezcla resuspendida para proporcionar dicho extracto en polvo seco.

8. El método de la reivindicación 7, en el que dicho secado de la mezcla resuspendida comprende liofilizar dicha mezcla para proporcionar dicho extracto en polvo seco.

9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicho péptido mimético ApoA-I heterólogo expresado por dicha planta comprende la secuencia de aminoácidos DWLKAFYDKFFEKFKEFF (6F) (SEQ ID NO: 1), o FFEKFKEFFKDIFYAKLWD (rev6F) (SEQ ID NO: 2).

10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que dicho extracto de polvo seco 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 paraoxonasa en plasma en dicho mamífero cuando se alimenta a dicho mamífero solo o como un componente de un alimento o dieta.

11. El método de la reivindicación 10, en el que la cantidad de extracto de polvo seco que produce la disminución en los niveles plasmáticos de ácido liofosfatídico (LPA), y/o que disminuye el nivel de SAA en dicho modelo de ratón, y/o que aumenta la actividad de paraoxonasa plasmática, es inferior a 1/10, en peso, la cantidad de tejido liofilizado de dicha planta transgénica necesaria para producir el mismo efecto.

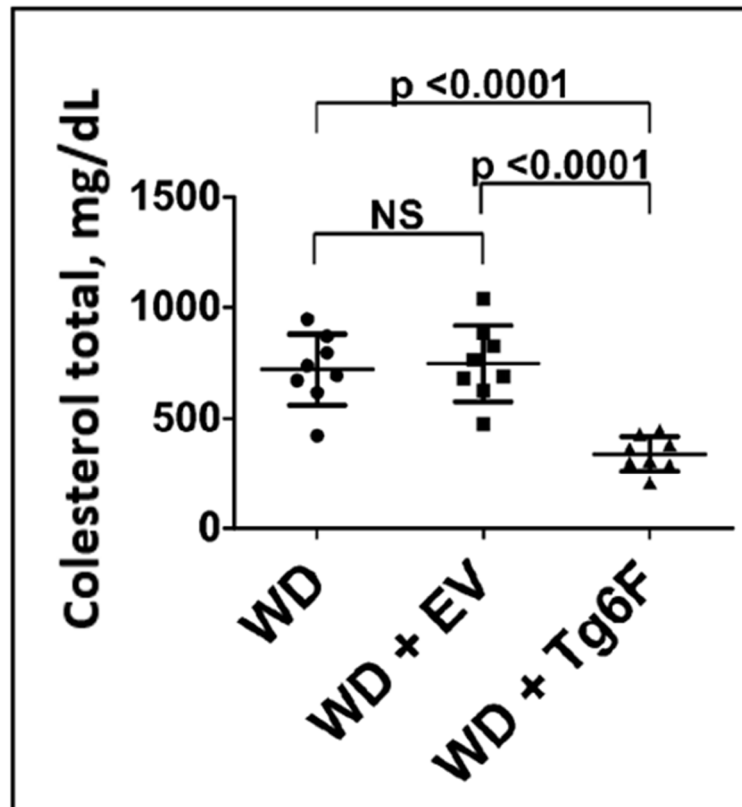


Fig. 1

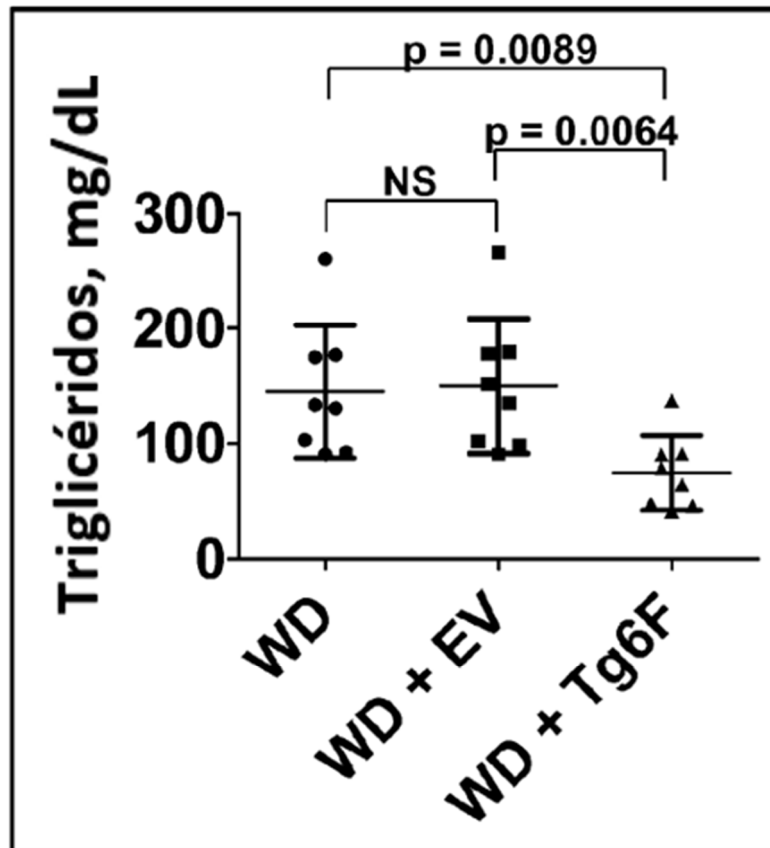


Fig. 2

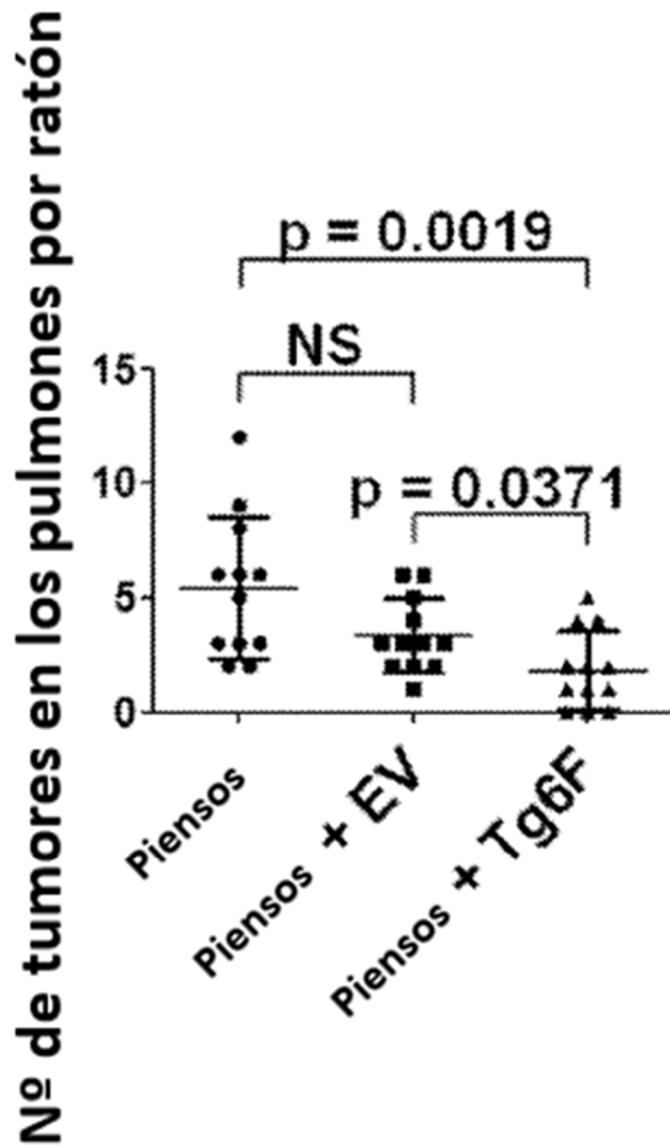


Fig. 3A

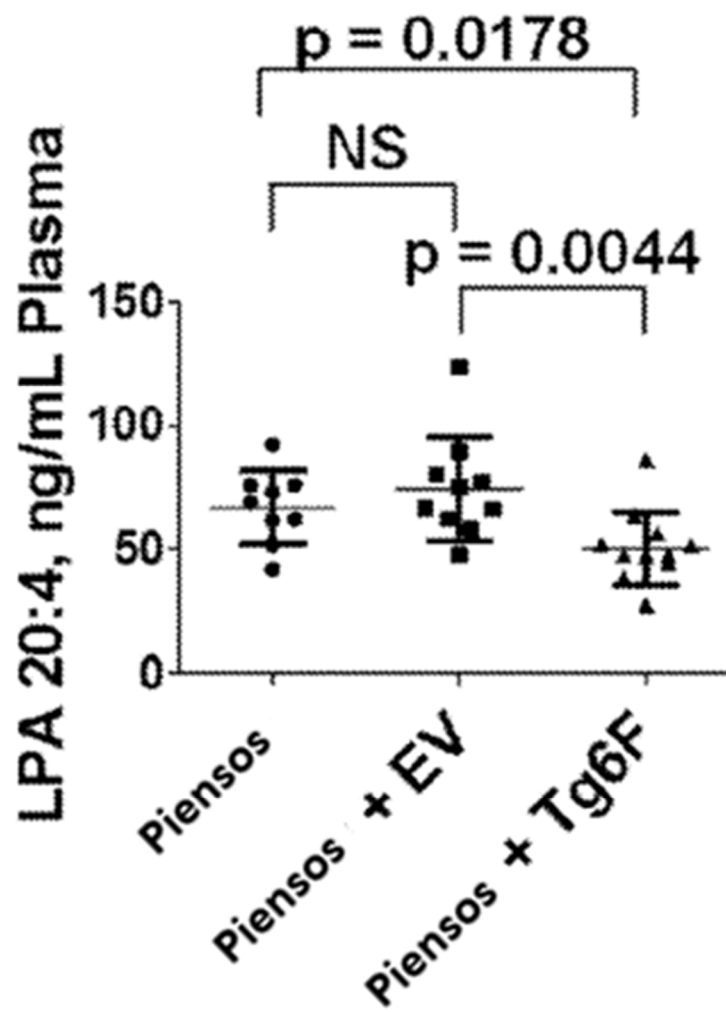


Fig. 3B

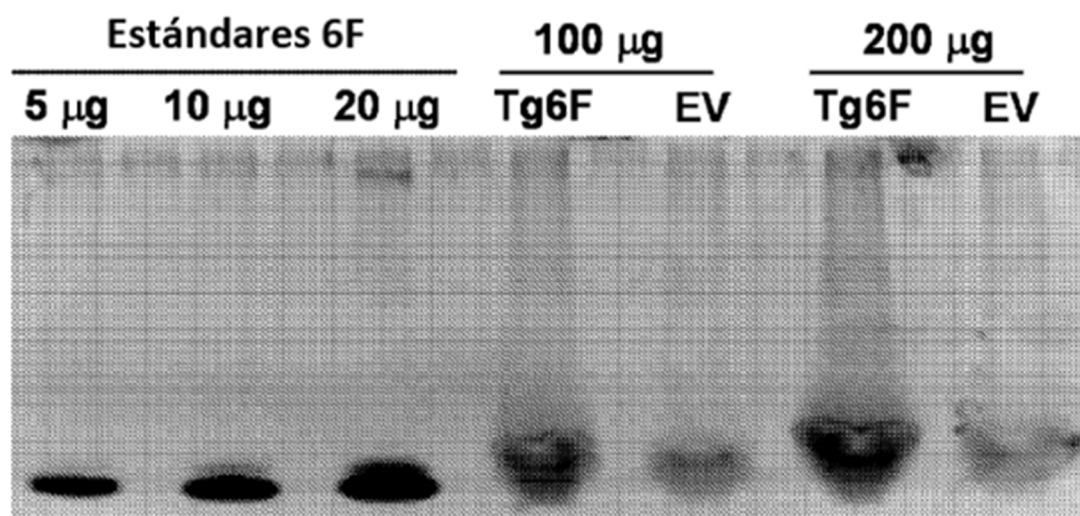


Fig. 4A

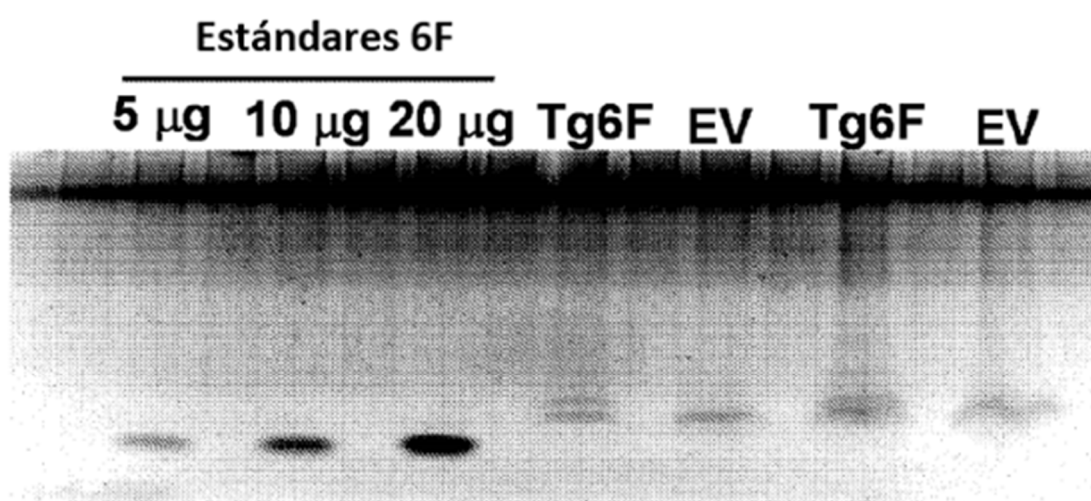


Fig. 4B

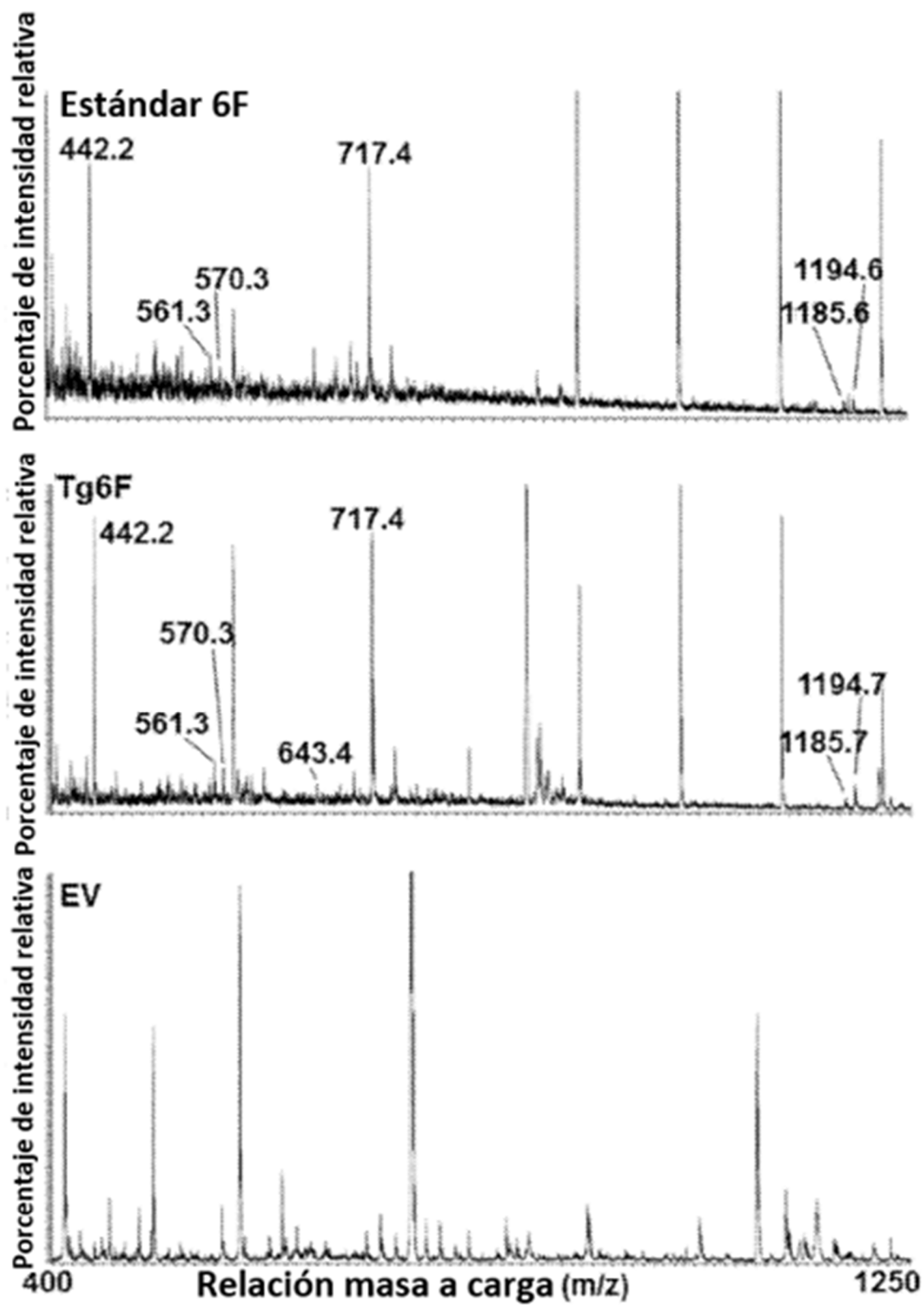


Fig. 4C

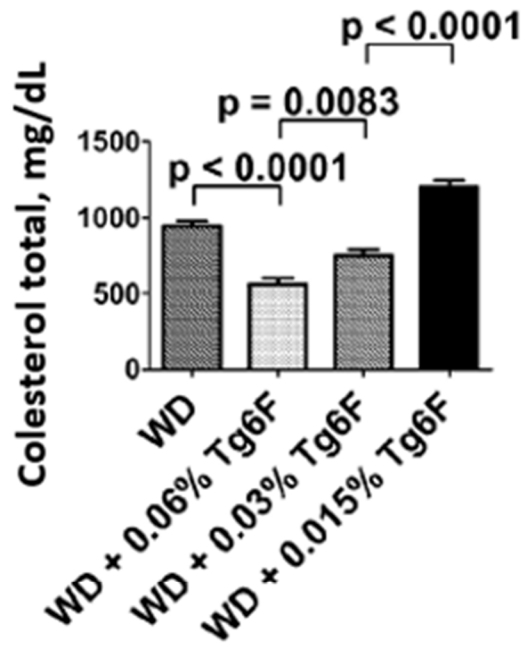


Fig. 5A

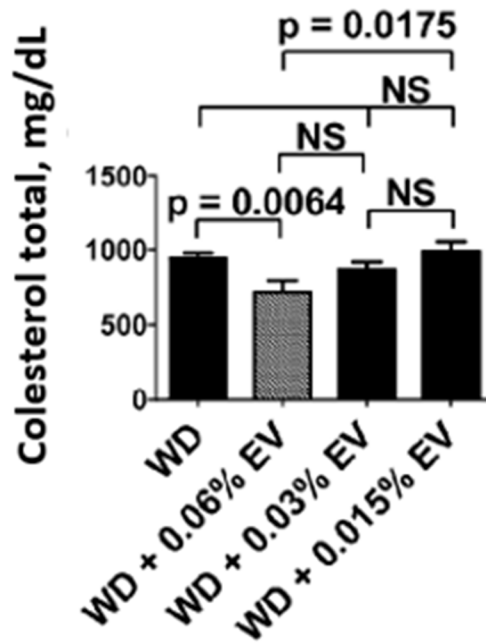


Fig. 5B

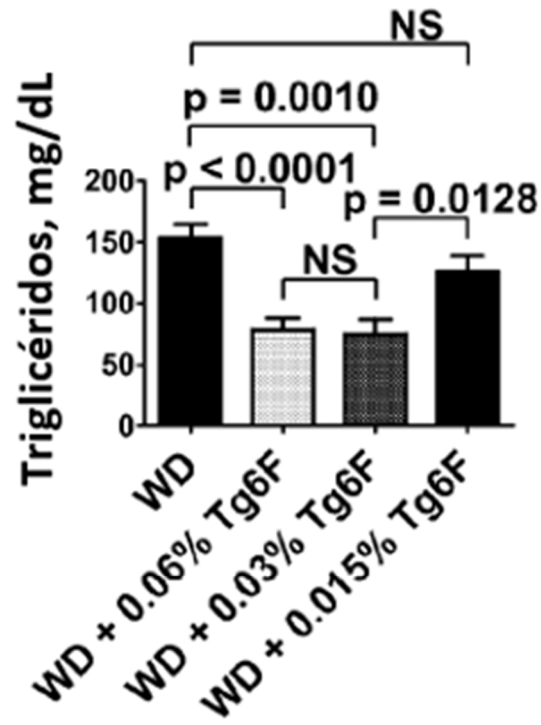


Fig. 5C

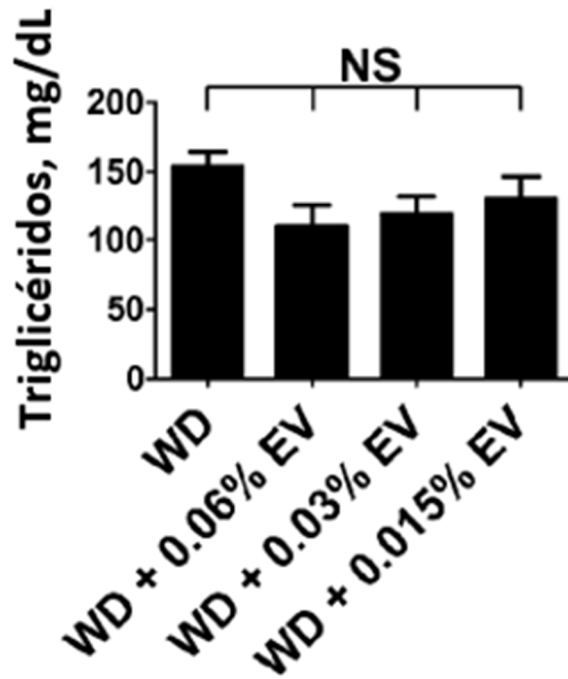


Fig. 5D

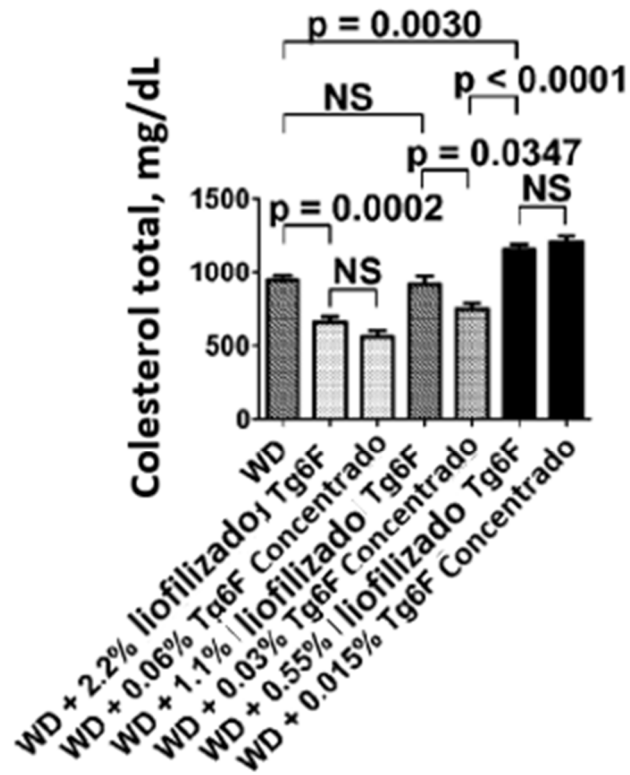


Fig. 5E

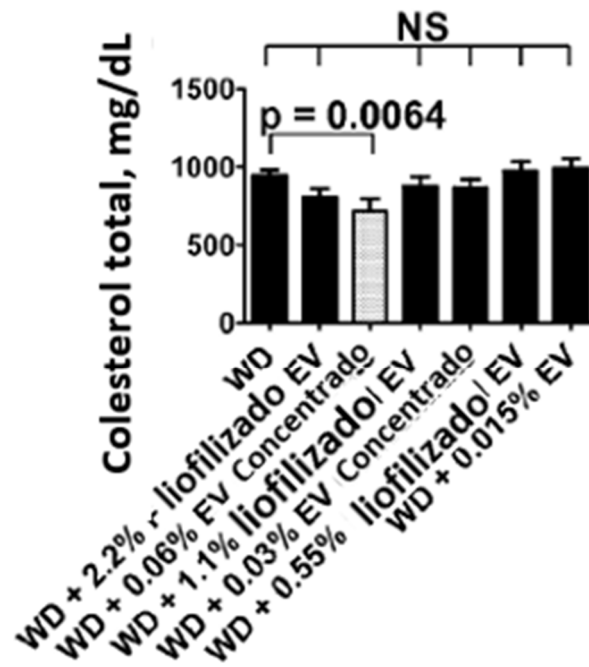


Fig. 5F

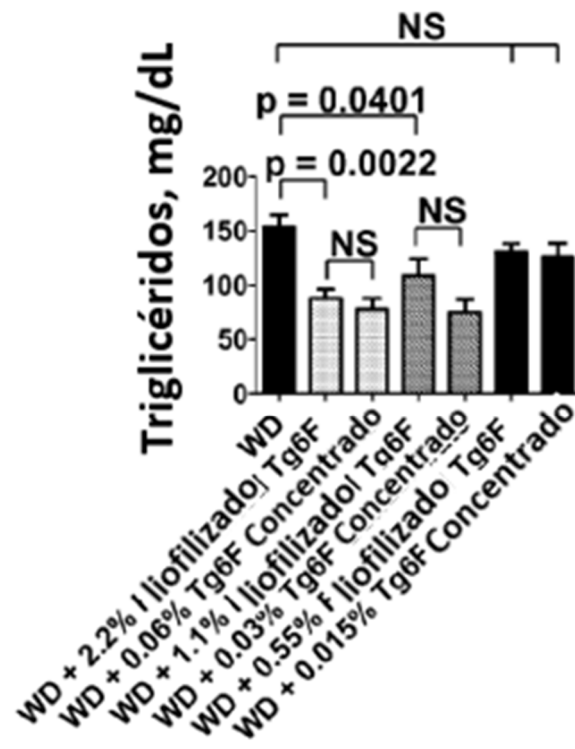


Fig. 5G

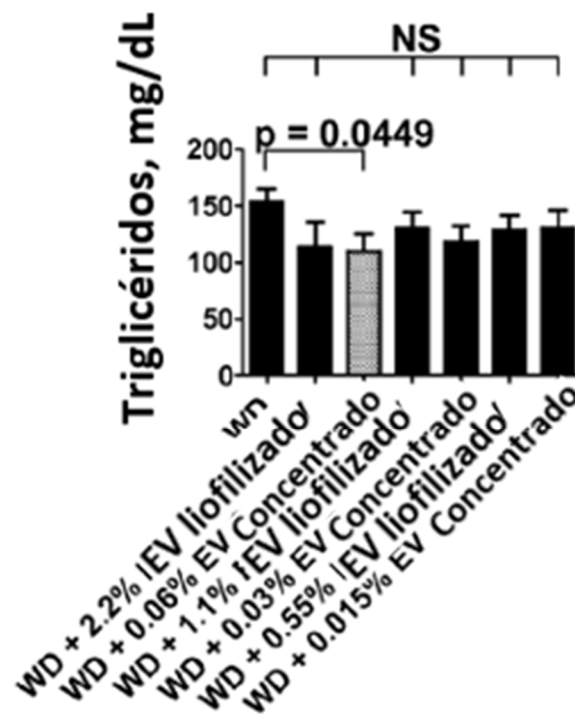


Fig. 5H

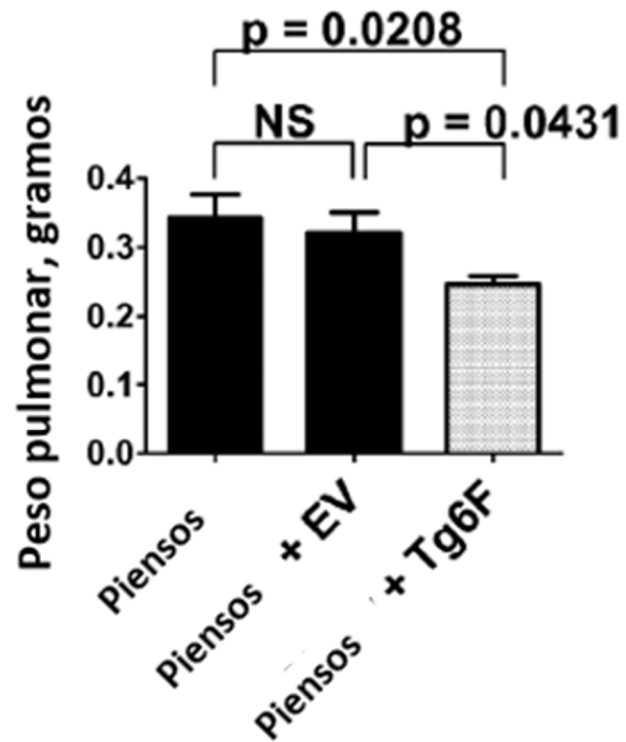


Fig. 6A

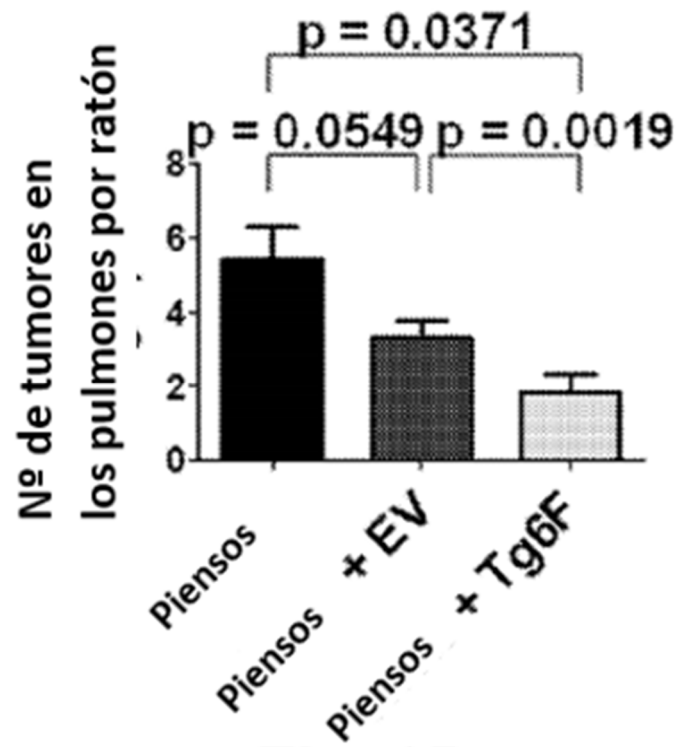
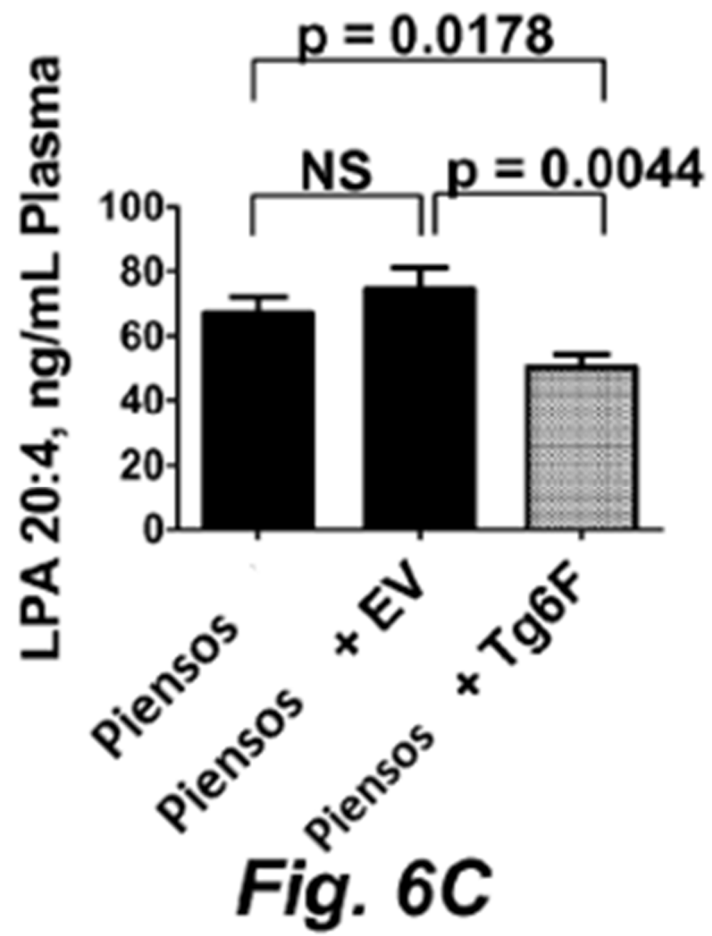


Fig. 6B



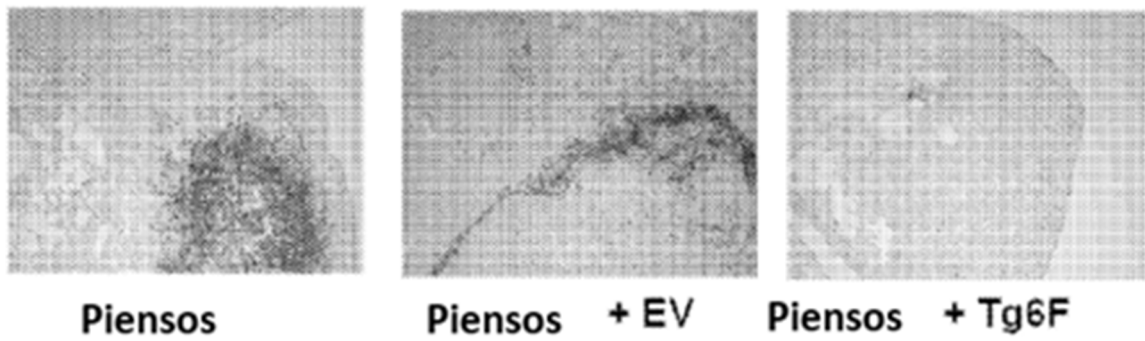


Fig. 7A

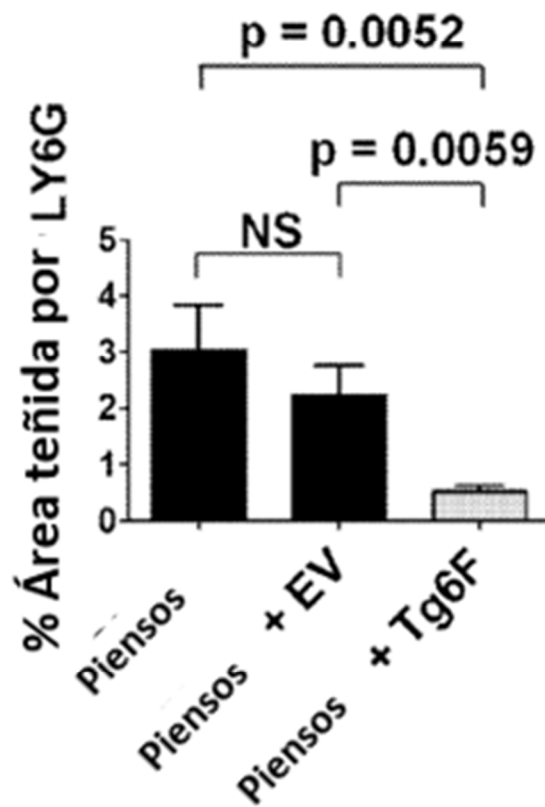


Fig. 7B

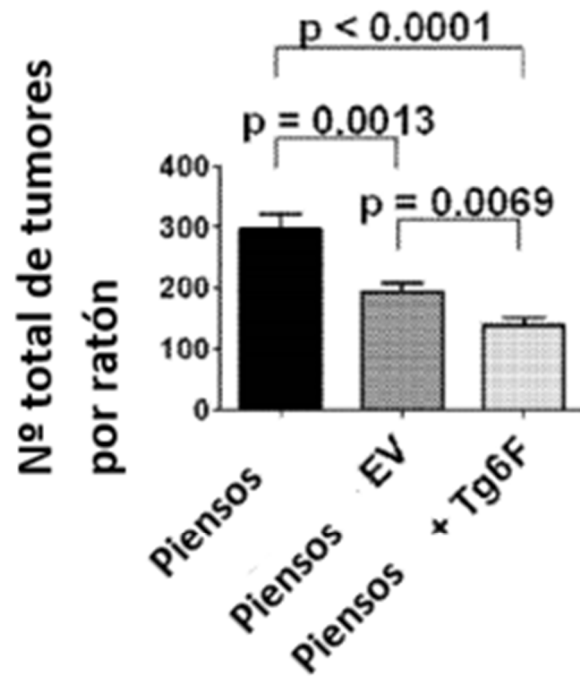


Fig. 8A

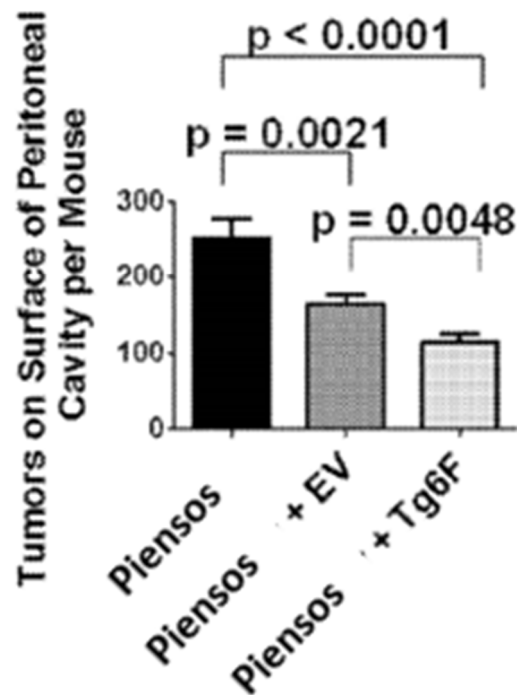


Fig. 8B

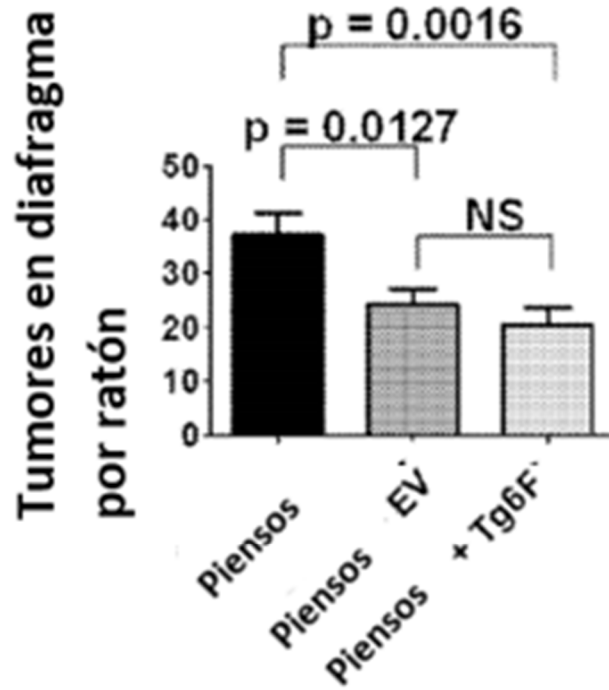


Fig. 8C

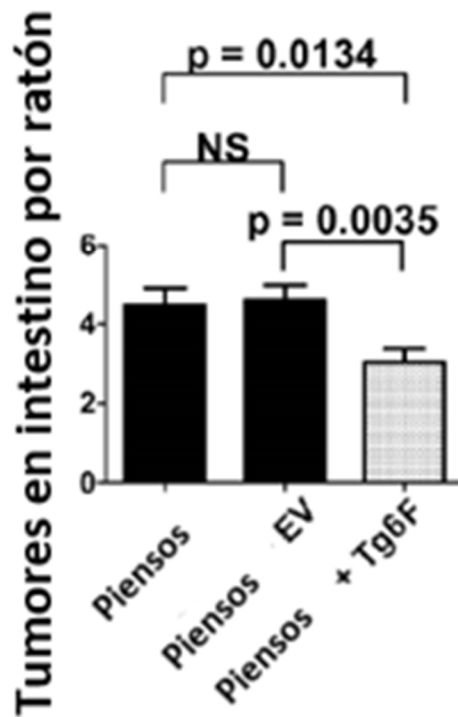


Fig. 8D

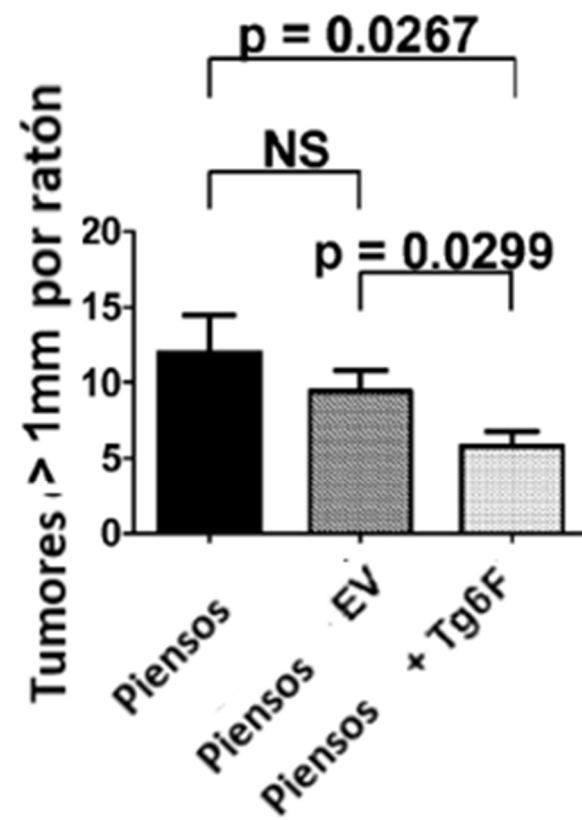


Fig. 8E

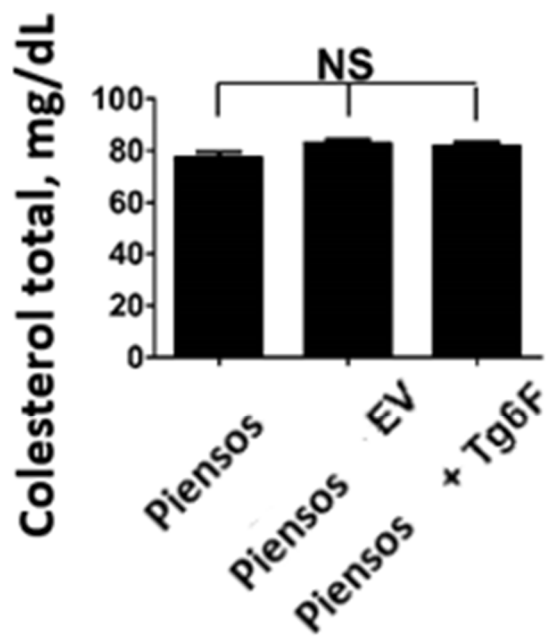


Fig. 9A

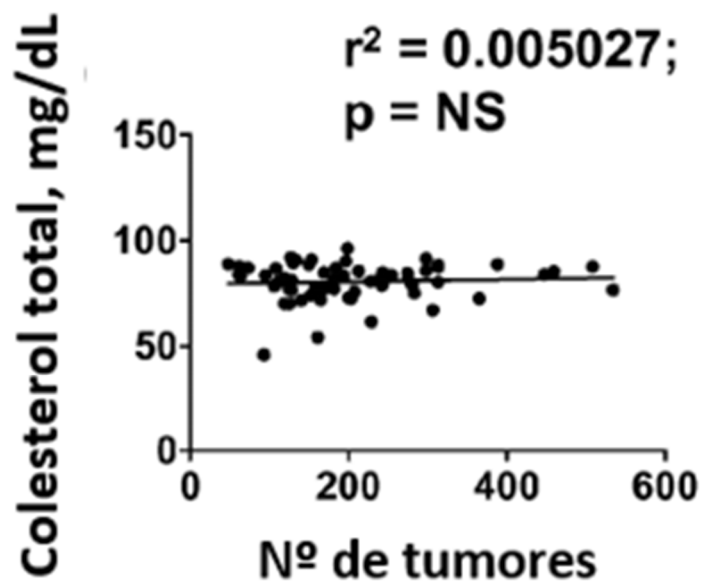


Fig. 9B

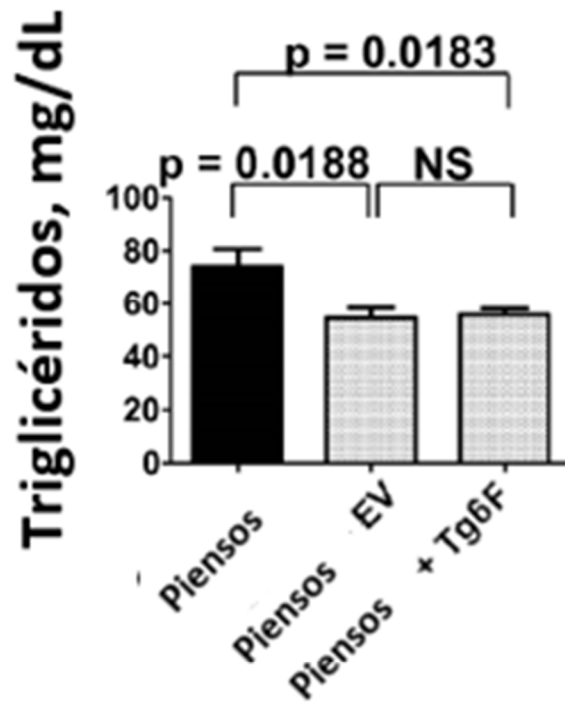


Fig. 9C

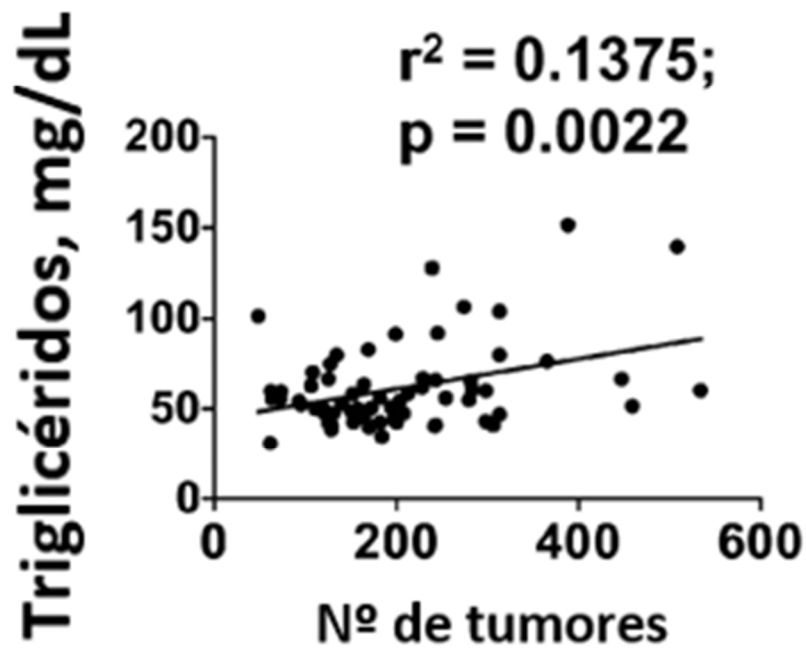


Fig. 9D

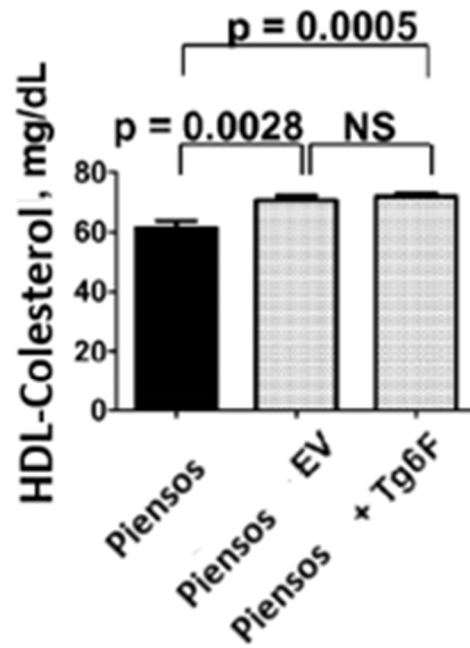


Fig. 9E

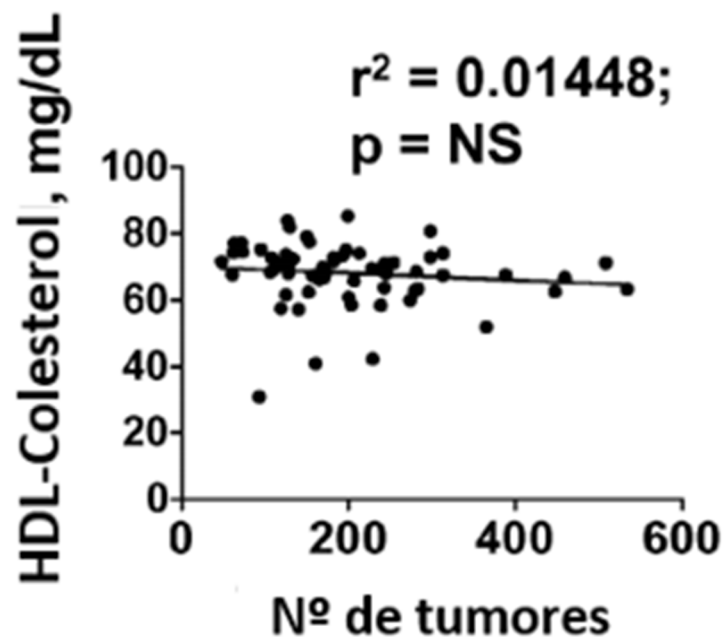


Fig. 9F

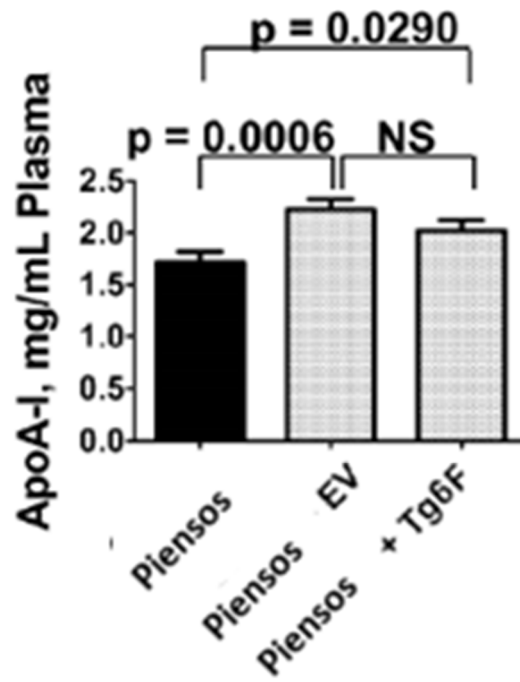


Fig. 9G

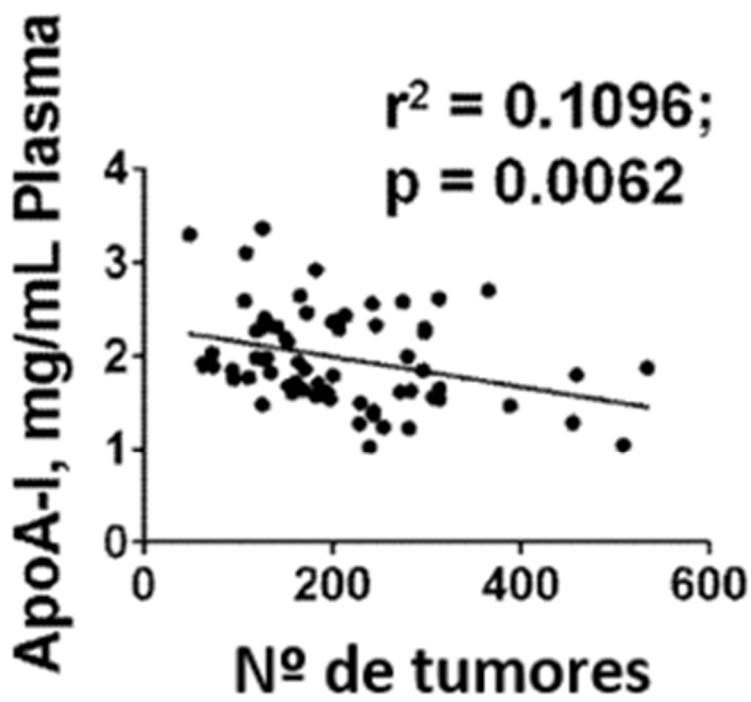


Fig. 9H

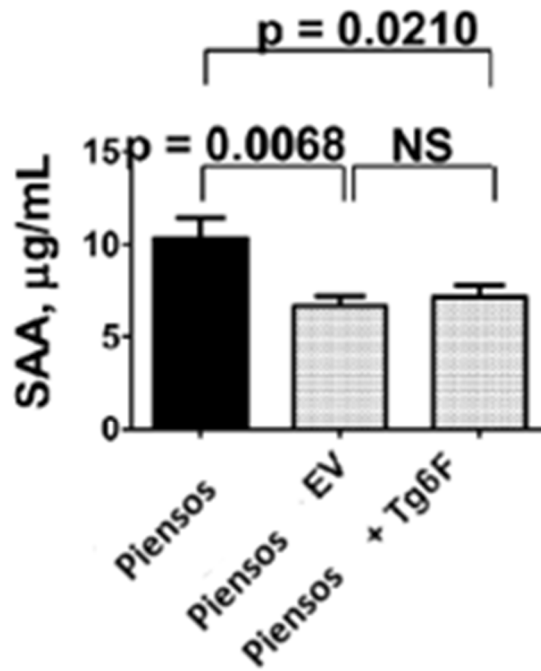


Fig. 9I

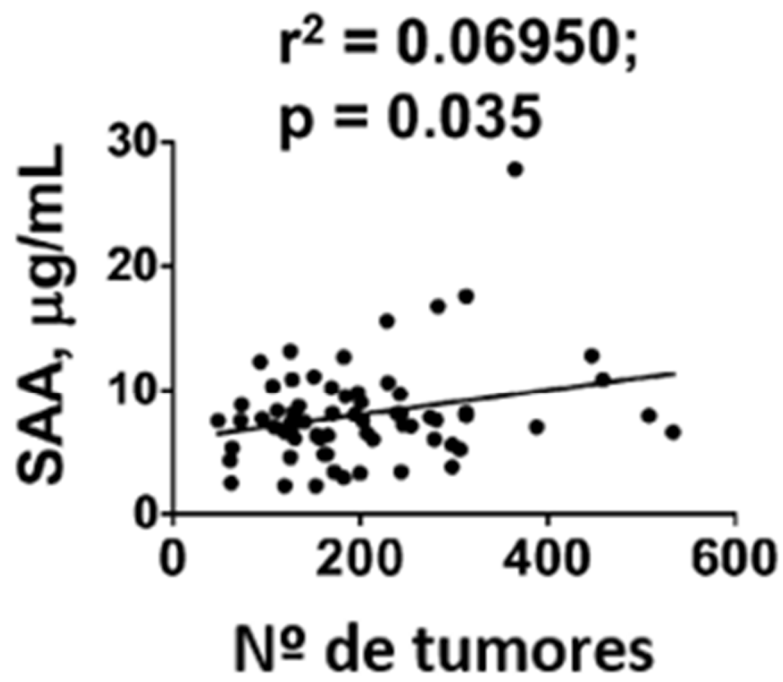


Fig. 9J