Q.F.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

SIC

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. **EXPEDIENTE No.** 05-117186

54. **TITULO** MEDIADORES DE TRANSPORTE REVERSO DE COLESTEROL PARA EL TRATAMIENTO DE HIPERCOLESTEROLEMIA

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE** AVANIR PHARMACEUTICALS

DOMICILIO SAN DIEGO, CALIFORNIA 92121, ESTADOS UNIDOS

74. **APODERADO** JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. **SANTAFE DE BOGOTA, D.C.** 21-12-05-92

1365 . 1

PETITORIO

AS: 99.016

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicacion : 05111/186 Folios: 368
Fecha (AMD): 2005-11-18 15:37:51
Tramite : 411 PCT-PRIENT 378 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL 22-11-05

1 SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)	Nombre: **AVANIR PHARMACEUTICALS** Dirección: 11388 Sorrento Valley Road, Suite 200, San Diego, California 92121, US Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos Lugar de Constitución: Estados Unidos Teléfono: Fax: E-mail	**IDENTIFICACION** C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual____ Número
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO Dirección: Cra. 7 No. 16-56 Piso 9 Teléfono: 380-2200 Fax: 380-2700 E-mail:	**IDENTIFICACION** C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual____ Número 80.410.337 TP 57492
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: Jagadish, C. SIRCAR, Kashinatham ALISALA, Igor NIKOULIN Dirección: 4832 Riding Ridge Road, San Diego, California 92130 (US), 11846 Scripps Creek Drive, #C, San Diego, California 92131 (US), 3845 Elijah Court, #635, San Diego, California 92130 (US) (Respectivamente) Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América	

5 PCT (86)
Solicitud Internacional No. PCT/US2004/012445 Fecha 22-04-2004
Publicación Internacional No. WO 2004/094471 A2 Fecha 04-11-2004

Título (54): MEDIADORES DE TRANSPORTE REVERSO DE COLESTEROL PARA EL TRATAMIENTO DE HIPERCOLESTEROLEMIA

7 Clasificación Internacional (51) C07K 14/775, A61K 38/17

8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	US	22-04-2003	60/464.667

9 Comprobante de pago No. 05-76348 **Fecha** 18-11-2005

10 **ANEXOS**

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. $443.000
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [ ] Poderes, si fuere el caso. ?
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- [ ] Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12x12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [x] Otros: Tarjeta de Propietarios

11 **FIGURA CARACTERÍSTICA:**

12 Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

FIRMA

C.C 80.410.337 de Usaquén T.P. 57492 del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 0511/1a6 [illegible] Folios: 368
Fecha (GMT): 2005-11-18 15:37:11
Tramite : 011 PAT-PRILNT 378 :PBE MACI 411 PRESENTAC
Procedencia: [illegible]

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 76.348
FECHA : OCTUBRE 4 DE 2005

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	30712175	04/10/2005	32,038,900.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1	TRAMITES DE SGL. DE PATENTE DE IN	443.000.00
			TOTAL : $	443.000.00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

AS:9901L

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
4 November 2004 (04.11.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/094471 A2

(51) International Patent Classification⁷: C07K 14/775, 5/065, 5/087, 5/09, 5/093, 5/11, 5/107, 5/113, 7/04, A61K 38/17, 38/05, 38/06, 38/07, 38/08, G01N 33/92

(21) International Application Number: PCT/US2004/012445

(22) International Filing Date: 22 April 2004 (22.04.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/464,667 22 April 2003 (22.04.2003) US

(71) Applicant (*for all designated States except US*): AVANIR PHARMACEUTICALS [US/US]; 11388 Sorrento Valley Road, Suite 200, San Diego, California 92121 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (*for US only*): SIRCAR, Jagadish, C. [US/US]; 4832 Riding Ridge Road, San Diego, California 92130 (US). ALISALA, Kashinatham [IN/US]; 11846 Scripps Creek Drive, #C, San Diego, California 92131 (US). NIKOULIN, Igor [RU/US]; 3845 Elijah Court, #635, San Diego, California 92130 (US).

(74) Agent: ALTMAN, Daniel, E.; 2040 Main Street, Fourteenth Floor, Irvine, California 92614 (US).

(81) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2004/094471 A2

(54) Title: MEDIATORS OF REVERSE CHOLESTEROL TRANSPORT FOR THE TREATMENT OF HYPERCHOLESTEROLEMIA

(57) Abstract: The present invention provides compositions adapted to enhance reverse cholesterol transport in mammals. The compositions are suitable for oral delivery and useful in the treatment and/or prevention of hypercholesterolemia, atherosclerosis and associated cardiovascular diseases.

MEDIATORS OF REVERSE CHOLESTEROL TRANSPORT FOR THE TREATMENT OF HYPERCHOLESTEROLEMIA

Background of the Invention

Field of the Invention

[0001] The invention relates to peptide and small molecule mediators of reverse cholesterol transport (RCT) for treating hypercholesterolemia and associated cardiovascular diseases.

Description of the Related Art

[0002] It is now well-established that elevated serum cholesterol ("hypercholesterolemia") is a causal factor in the development of atherosclerosis, a progressive accumulation of cholesterol within the arterial walls. Hypercholesterolemia and atherosclerosis are leading causes of cardiovascular diseases, including hypertension, coronary artery disease, heart attack and stroke. About 1.1 million individuals suffer from heart attack each year in the United States alone, the costs of which are estimated to exceed $117 billion. Although there are numerous pharmaceutical strategies for lowering cholesterol levels in the blood, many of these have undesirable side effects and have raised safety concerns. Moreover, none of the commercially available drug therapies adequately stimulate reverse cholesterol transport, an important metabolic pathway that removes cholesterol from the body.

[0003] Circulating cholesterol is carried by plasma lipoproteins -- particles of complex lipid and protein composition that transport lipids in the blood. Low density lipoproteins (LDL), and high density lipoproteins (HDL) are the major cholesterol carriers. LDL are believed to be responsible for the delivery of cholesterol from the liver (where it is synthesized or obtained from dietary sources) to extrahepatic tissues in the body. The term "reverse cholesterol transport" describes the transport of cholesterol from extrahepatic tissues to the liver where it is catabolized and eliminated. It is believed that plasma HDL particles play a major role in the reverse transport process, acting as scavengers of tissue cholesterol.

[0004] Compelling evidence supports the concept that lipids deposited in atherosclerotic lesions are derived primarily from plasma LDL; thus, LDLs have popularly

become known as the "bad" cholesterol. In contrast, plasma HDL levels correlate inversely with coronary heart disease – indeed, high plasma levels of HDL are regarded as a negative risk factor. It is hypothesized that high levels of plasma HDL are not only protective against coronary artery disease, but may actually induce regression of atherosclerotic plaques (e.g. see Badimon *et al.*, 1992, *Circulation* 86 (Suppl. III):86-94). Thus, HDLs have popularly become known as the "good" cholesterol.

[0005] The amount of intracellular cholesterol liberated from the LDLs controls cellular cholesterol metabolism. The accumulation of cellular cholesterol derived from LDLs controls three processes: (1) it reduces cellular cholesterol synthesis by turning off the synthesis of HMGCoA reductase, a key enzyme in the cholesterol biosynthetic pathway; (2) the incoming LDL-derived cholesterol promotes storage of cholesterol by activating LCAT, the cellular enzyme which converts cholesterol into cholesteryl esters that are deposited in storage droplets; and (3) the accumulation of cholesterol within the cell drives a feedback mechanism that inhibits cellular synthesis of new LDL receptors. Cells, therefore, adjust their complement of LDL receptors so that enough cholesterol is brought in to meet their metabolic needs, without overloading. (For a review, see Brown & Goldstein, In: The Pharmacological Basis Of Therapeutics, 8th Ed., Goodman & Gilman, Pergamon Press, NY, 1990, Ch. 36, pp. 874-896).

[0006] Reverse cholesterol transport (RCT) is the pathway by which peripheral cell cholesterol can be returned to the liver for recycling to extrahepatic tissues, or excreted into the intestine as bile. The RCT pathway represents the only means of eliminating cholesterol from most extrahepatic tissues. The RCT consists mainly of three steps: (1) cholesterol efflux, the initial removal of cholesterol from peripheral cells; (2) cholesterol esterification by the action of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT), preventing a re-entry of effluxed cholesterol into the peripheral cells; and (3) uptake/delivery of HDL cholesteryl ester to liver cells. LCAT is the key enzyme in the RCT pathway and is produced mainly in the liver and circulates in plasma associated with the HDL fraction. LCAT converts cell derived cholesterol to cholesteryl esters which are sequestered in HDL destined for removal. The RCT pathway is mediated by HDLs.

[0007] HDL is a generic term for lipoprotein particles which are characterized by their high density. The main lipidic constituents of HDL complexes are various

phospholipids, cholesterol (ester) and triglycerides. The most prominent apolipoprotein components are A-I and A-II which determine the functional characteristics of HDL.

[0008] Each HDL particle contains at least one copy (and usually two to four copies) of apolipoprotein A-1 (ApoA-I). ApoA-I is synthesized by the liver and small intestine as preproapolipoprotein which is secreted as a proprotein that is rapidly cleaved to generate a mature polypeptide having 243 amino acid residues. ApoA-I consists mainly of 6 to 8 different 22 amino acid repeats spaced by a linker moiety which is often proline, and in some cases consists of a stretch made up of several residues. ApoA-I forms three types of stable complexes with lipids: small, lipid-poor complexes referred to as pre-beta-1 HDL; flattened discoidal particles containing polar lipids (phospholipid and cholesterol) referred to as pre-beta-2 HDL; and spherical particles containing both polar and nonpolar lipids, referred to as spherical or mature HDL (HDL_3 and HDL_2). Although most HDL in circulation contains both ApoA-I and ApoA-II, the fraction of HDL which contains only ApoA-I (AI-HDL) appears to be more effective in RCT. Epidemiologic studies support the hypothesis that AI-HDL is anti-atherogenic. (Parra *et al.*, 1992, *Arterioscler. Thromb.* 12:701-707; Decossin *et al.*, 1997, *Eur. J. Clin. Invest.* 27:299-307).

[0009] Several lines of evidence based on data obtained in vivo implicate the HDL and its major protein component, ApoA-I, in the prevention of atherosclerotic lesions, and potentially, the regression of plaques--making these attractive targets for therapeutic intervention. First, an inverse correlation exists between serum ApoA-I (HDL) concentration and atherogenesis in man (Gordon & Rifkind, 1989, *N. Eng. J. Med.* 321:1311-1316; Gordon *et al.*, 1989, *Circulation* 79:8-15). Indeed, specific subpopulations of HDL have been associated with a reduced risk for atherosclerosis in humans (Miller, 1987, *Amer. Heart* 113:589-597; Cheung *et al.*, 1991, *Lipid Res.* 32:383-394); Fruchart & Ailhaud, 1992, *Clin. Chem.* 38:79).

[0010] Second, animal studies support the protective role of ApoA-I (HDL). Treatment of cholesterol fed rabbits with ApoA-I or HDL reduced the development and progression of plaque (fatty streaks) in cholesterol-fed rabbits (Koizumi *et al.*, 1988, *J. Lipid Res.* 29:1405-1415; Badimon *et al.*, 1989, *Lab. Invest.* 60:455-461; Badimon *et al.*, 1990, *J. Clin. Invest.* 85:1234-1241). However, the efficacy varied depending upon the source of HDL (Beitz *et al.*, 1992, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 47:149-152; Mezdour *et al.*, 1995, *Atherosclerosis* 113:237-246).

[0011] Third, direct evidence for the role of ApoA-I was obtained from experiments involving transgenic animals. The expression of the human gene for ApoA-I transferred to mice genetically predisposed to diet-induced atherosclerosis protected against the development of aortic lesions (Rubin *et al.*, 1991, *Nature* 353:265-267). The ApoA-I transgene was also shown to suppress atherosclerosis in ApoE-deficient mice and in Apo(a) transgenic mice (Paszty *et al.*, 1994, *J. Clin. Invest.* 94:899-903; Plump *et al.*, 1994, *PNAS. USA* 91:9607-9611; Liu *et al.*, 1994, *J. Lipid Res.* 35:2263-2266). Similar results were observed in transgenic rabbits expressing human ApoA-I (Duverger, 1996, *Circulation* 94:713-717; Duverger *et al.*, 1996, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16:1424-1429), and in transgenic rats where elevated levels of human ApoA-I protected against atherosclerosis and inhibited restenosis following balloon angioplasty (Burkey *et al.*, 1992, *Circulation*, Supplement I, 86:I-472, Abstract No. 1876; Burkey *et al.*, 1995, *J. Lipid Res.* 36:1463-1473).

Current Treatments for Hypercholesterolemia and other Dyslipidemias

[0012] In the past two decades or so, the segregation of cholesterolemic compounds into HDL and LDL regulators and recognition of the desirability of decreasing blood levels of LDL has led to the development of a number of drugs. However, many of these drugs have undesirable side effects and/or are contraindicated in certain patients, particularly when administered in combination with other drugs. These drugs and therapeutic strategies include:

(1) bile-acid-binding resins, which interrupt the recycling of bile acids from the intestine to the liver [e.g., cholestyramine (QUESTRAN LIGHT, Bristol-Myers Squibb), and colestipol hydrochloride (COLESTID, Pharmacia & Upjohn Company)];

(2) statins, which inhibit cholesterol synthesis by blocking HMGCoA – the key enzyme involved in cholesterol biosynthesis [e.g., lovastatin (MEVACOR, Merck & Co., Inc.), a natural product derived from a strain of Aspergillus, pravastatin (PRAVACHOL, Bristol-Myers Squibb Co.), and atorvastatin (LIPITOR, Warner Lambert)];

(3) niacin is a water-soluble vitamin B-complex which diminishes production of VLDL and is effective at lowering LDL;

(4) fibrates are used to lower serum triglycerides by reducing the VLDL fraction and may in some patient populations give rise to modest reductions of plasma cholesterol via the same mechanism [e.g., clofibrate (ATROMID-S, Wyeth-Ayerst Laboratories), and gemfibrozil (LOPID, Parke-Davis)];

(5) estrogen replacement therapy may lower cholesterol levels in post-menopausal women;

(6) long chain alpha,omega-dicarboxylic acids have been reported to lower serum triglyceride and cholesterol (See, e.g., Bisgaier et al., 1998, *J. Lipid Res.* 39:17-30; WO 98/30530; U.S. Pat. No. 4,689,344; WO 99/00116; U.S. Pat. No. 5,756,344; U.S. Pat. No. 3,773,946; U.S. Pat. No. 4,689,344; U.S. Pat. No. 4,689,344; U.S. Pat. No. 4,689,344; and U.S. Pat. No. 3,930,024);

(7) other compounds including ethers (See, e.g., U.S. Pat. No. 4,711,896; U.S. Pat. No. 5,756,544; U.S. Pat. No. 6;506,799), phosphates of dolichol (U.S. Pat. No. 4,613,593), and azolidinedione derivatives (U.S. Pat. No. 4,287,200) are disclosed as lowering serum triglyceride and cholesterol levels.

[0013] None of these currently available drugs for lowering cholesterol safely elevate HDL levels and stimulate RCT. Indeed, most of these current treatment strategies appear to operate on the cholesterol transport pathway, modulating dietary intake, recycling, synthesis of cholesterol, and the VLDL population.

ApoA-I Agonists for Treatment of Hypercholesterolemia

[0014] In view of the potential role of HDL, i.e., both ApoA-I and its associated phospholipid, in the protection against atherosclerotic disease, human clinical trials utilizing recombinantly produced ApoA-I were commenced, discontinued and apparently re-commenced by UCB Belgium (Pharmaprojects, Oct. 27, 1995; IMS R&D Focus, Jun. 30, 1997; Drug Status Update, 1997, *Atherosclerosis* 2(6):261-265); see also M. Eriksson at Congress, "The Role of HDL in Disease Prevention," Nov. 7-9, 1996, Fort Worth; Lacko & Miller, 1997, *J. Lip. Res.* 38:1267-1273; and WO 94/13819) and were commenced and

discontinued by Bio-Tech (Pharmaprojects, Apr. 7, 1989). Trials were also attempted using ApoA-I to treat septic shock (Opal, "Reconstituted HDL as a Treatment Strategy for Sepsis," IBC's 7th International Conference on Sepsis, Apr. 28-30, 1997, Washington, D.C.; Gouni *et al.*, 1993, *J. Lipid Res.* 94:139-146; Levine, WO 96/04916). However, there are many pitfalls associated with the production and use of ApoA-I, making it less than ideal as a drug; e.g., ApoA-I is a large protein that is difficult and expensive to produce; significant manufacturing and reproducibility problems must be overcome with respect to stability during storage, delivery of an active product and half-life in vivo.

[0015] In view of these drawbacks, attempts have been made to prepare peptides that mimic ApoA-I. Since the key activities of ApoA-I have been attributed to the presence of multiple repeats of a unique secondary structural feature in the protein – a class A amphipathic α-helix (Segrest, 1974, *FEBS Lett.* 38:247-253; Segrest *et al.*, 1990, *PROTEINS: Structure, Function and Genetics* 8:103-117), most efforts to design peptides which mimic the activity of ApoA-I have focused on designing peptides which form class A-type amphipathic α-helices (See e.g., Background discussions in U.S. Pat. Nos. 6,376,464 and 6,506,799; incorporated herein in their entirety by reference thereto).

[0016] In one study, Fukushima *et al.* synthesized a 22-residue peptide composed entirely of Glu, Lys and Leu residues arranged periodically so as to form an amphipathic α-helix with equal-hydrophilic and hydrophobic faces ("ELK peptide") (Fukushima *et al.*, 1979, *J. Amer. Chem. Soc.* 101(13):3703-3704; Fukushima *et al.*, 1980, *J. Biol. Chem.* 255:10651-10657). The ELK peptide shares 41% sequence homology with the 198-219 fragment of ApoA-I. The ELK peptide was shown to effectively associate with phospholipids and mimic some of the physical and chemical properties of ApoA-I (Kaiser *et al.*, 1983, *PNAS* USA 80:1137-1140; Kaiser *et al.*, 1984, *Science* 223:249-255; Fukushima *et al.*, 1980, supra; Nakagawa *et al.*, 1985, *J. Am. Chem. Soc.* 107:7087-7092). A dimer of this 22-residue peptide was later found to more closely mimic ApoA-I than the monomer; based on these results, it was suggested that the 44-mer, which is punctuated in the middle by a helix breaker (either Gly or Pro), represented the minimal functional domain in ApoA-I (Nakagawa *et al.*, 1985, supra).

[0017] Another study involved model amphipathic peptides called "LAP peptides" (Pownall *et al.*, 1980, *PNAS* USA 77(6):3154-3158; Sparrow *et al.*, 1981, In: Peptides: Synthesis-Structure-Function, Rich and Gross, Eds., Pierce Chem. Co.,

Rockford, IL, 253-256). Based on lipid binding studies with fragments of native apolipoproteins, several LAP peptides were designed, named LAP-16, LAP-20 and LAP-24 (containing 16, 20 and 24 amino acid residues, respectively). These model amphipathic peptides share no sequence homology with the apolipoproteins and were designed to have hydrophilic faces organized in a manner unlike the class A-type amphipathic helical domains associated with apolipoproteins (Segrest *et al.*, 1992, *J. Lipid Res.* 33:141-166). From these studies, the authors concluded that a minimal length of 20 residues is necessary to confer lipid-binding properties to model amphipathic peptides.

[0018] Studies with mutants of LAP20 containing a proline residue at different positions in the sequence indicated that a direct relationship exists between lipid binding and LCAT activation, but that the helical potential of a peptide alone does not lead to LCAT activation (Ponsin *et al.*, 1986, *J. Biol. Chem.* 261(20):9202-9205). Moreover, the presence of this helix breaker (Pro) close to the middle of the peptide reduced its affinity for phospholipid surfaces as well as its ability to activate LCAT. While certain of the LAP peptides were shown to bind phospholipids (Sparrow *et al.*, supra), controversy exists as to the extent to which LAP peptides are helical in the presence of lipids (Buchko *et al.*, 1996, *J. Biol. Chem.* 271(6):3039-3045; Zhong *et al.*, 1994, *Peptide Research* 7(2):99-106).

[0019] Segrest *et al.* have synthesized peptides composed of 18 to 24 amino acid residues that share no sequence homology with the helices of ApoA-I (Kannelis *et al.*, 1980, *J. Biol. Chem.* 255(3):11464-11472; Segrest *et al.*, 1983, *J. Biol. Chem.* 258:2290-2295). The sequences were specifically designed to mimic the amphipathic helical domains of class A exchangeable apolipoproteins in terms of hydrophobic moment (Eisenberg *et al.*, 1982, *Nature* 299:371-374) and charge distribution (Segrest *et al.*, 1990, *Proteins* 8:103-117; U.S. Pat. No. 4,643,988). One 18-residue peptide, the "18A" peptide, was designed to be a model class-A α-helix (Segrest *et al.*, 1990, supra). Studies with these peptides and other peptides having a reversed charged distribution, like the "18R" peptide, have consistently shown that charge distribution is critical for activity; peptides with a reversed charge distribution exhibit decreased lipid affinity relative to the 18A class-A mimics and a lower helical content in the presence of lipids (Kanellis *et al.*, 1980, *J. Biol. Chem.* 255:11464-11472; Anantharamaiah *et al.*, 1985, *J. Biol. Chem.* 260:10248-10255; Chung *et al.*, 1985, *J. Biol. Chem.* 260:10256-10262; Epand *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:9389-9396; Anantharamaiah *et al.*, 1991, *Adv. Exp. Med. Biol.* 285:131-140).

[0020] A "consensus" peptide containing 22-amino acid residues based on the sequences of the helices of human ApoA-I has also been designed (Anantharamaiah *et al.*, 1990, *Arteriosclerosis* 10(1):95-105; Venkatachalapathi *et al.*, 1991, *Mol. Conformation and Biol. Interactions, Indian Acad. Sci.* B:585-596). The sequence was constructed by identifying the most prevalent residue at each position of the hypothesized helices of human ApoA-I. Like the peptides described above, the helix formed by this peptide has positively charged amino acid residues clustered at the hydrophilic-hydrophobic interface, negatively charged amino acid residues clustered at the center of the hydrophilic face and a hydrophobic angle of less than 180°. While a dimer of this peptide is somewhat effective in activating LCAT, the monomer exhibited poor lipid binding properties (Venkatachalapathi *et al.*, 1991, supra).

[0021] Based primarily on *in vitro* studies with the peptides described above, a set of "rules" has emerged for designing peptides which mimic the function of ApoA-I. Significantly, it is thought that an amphipathic α-helix having positively charged residues clustered at the hydrophilic-hydrophobic interface and negatively charged amino acid residues clustered at the center of the hydrophilic face is required for lipid affinity and LCAT activation (Venkatachalapathi *et al.*, 1991, supra). Anantharamaiah *et al.* have also indicated that the negatively charged Glu residue at position 13 of the consensus 22-mer peptide, which is positioned within the hydrophobic face of the α-helix, plays an important role in LCAT activation (Anantharamaiah *et al.*, 1991, supra). Furthermore, Brasseur has indicated that a hydrophobic angle (pho angle) of less than 180° is required for optimal lipid-apolipoprotein complex stability, and also accounts for the formation of discoidal particles having the peptides around the edge of the lipid bilayer (Brasseur, 1991, *J. Biol. Chem.* 66(24):16120-16127). Rosseneu *et al.* have also insisted that a hydrophobic angle of less than 180° is required for LCAT activation (WO 93/25581).

[0022] However, despite the progress in elucidating "rules" for designing ApoA-I agonists, to date the best ApoA-I agonists are reported as having less than 40% of the activity of intact ApoA-I. None of the peptide agonists described in the literature have been demonstrated to be useful as a drug. Thus, there is a need for the development of a stable molecule that mimics the activity of ApoA-I and which is relatively simple and cost-effective to produce. Preferably, candidate molecules would mediate both indirect and direct RCT. Such molecules would be smaller than existing peptide agonists, and have

broader functional spectra. However, the "rules" for designing efficacious mediators of RCT have not been fully elucidated and the principles for designing organic molecules with the function of ApoA-I are unknown.

Summary of the Invention

[0023] In accordance with one preferred embodiment of the present invention, a mediator of reverse cholesterol transport comprising a molecule comprising an acidic region, a lipophilic or aromatic region and a basic region (the "Molecular Model") is disclosed. The Molecular Model in its simplest form could be a molecule containing an acidic region and a basic region with a lipophilic backbone or scaffold. The molecule has a structure adapted to complex with HDL and/or LDL cholesterol and thereby enhance reverse cholesterol transport.

[0024] The mediator of reverse cholesterol transport preferably has between 3 and 10 amino acid residues or analogs or any non-peptide compound containing a basic group and an acid group with a lipophilic scaffold, thereof, and comprises the sequence: X1-X2-X3, wherein: X1 is an acidic amino acid; X2 is an aromatic or a lipophilic amino acid; X3 is a basic amino acid; and wherein the amino terminal further comprises a first protecting group, and the carboxy terminal further comprises a second protecting group. The first and second protecting groups are independently selected from the group consisting of an acetyl, phenylacetyl, pivolyl, 9-fluorenylmethyloxycarbonyl, 2-napthyilc acid, nicotinic acid, a $CH_3—(CH_2)_n—CO—$ where n ranges from 3 to 20, and an amide of acetyl, phenylacetyl, di-tert-butyl-4-hydroxy-phenyl, naphthyl, substituted naphthyl, f-MOC, biphenyl, substituted phenyl, substituted heterocycles, alkyl, aryl, substituted aryl, cycloalkyl, fused cycloalkyl, saturated heteroaryl, substituted saturated heteroaryl and the like. The C-terminal is capped with an amine such as RNH_2 where R = di-tert-butyl-4-hydroxy-phenyl, naphthyl, substituted naphthyl, f-MOC, biphenyl, substituted phenyl, substituted heterocycles, alkyl, aryl, substituted aryl, cycloalkyl, fused cycloalkyl, saturated heteroaryl, substituted saturated heteroaryl and the like. The sequence: X1-X2-X3 could be scrambled in any of all possible ways to provide compounds that retain the basic features of the Molecular Model and could be comprised of 3 to 10 amino acid residues.

[0025] In one embodiment of the amino acid-derived mediator of reverse cholesterol transport, one or more of X1, X2 or X3 are D or other modified synthetic amino acid residues to provide metabolically stable molecules. This could also be achieved by

peptidomimetic approach i.e. reversing the the peptide bonds in the backbone or similar groups. In some preferred embodiments, X2 is biphenylalanine. In particularly preferred embodiments, the mediators of reverse cholesterol transport of the present invention are any of SEQ ID NOS 1-176 or may be selected from the compounds shown in Table 5. In some preferred embodiments, the mediator of reverse cholesterol transport includes the sequence EFR or RFE.

[0026] A method for enhancing RCT in an animal is disclosed in accordance with another preferred aspect of the present invention. The method comprises administering to the animal an effective amount of an amino acid-derived composition, comprising the sequence: X1-X2-X3, wherein: X1 is an acidic amino acid; X2 is an aromatic or lipophilic amino acid; X3 is a basic amino acid; and wherein the amino terminal further comprises a first protecting group, and the carboxy terminal further comprises a second protecting group, wherein the first and second protecting groups are independently selected from the group consisting of an acetyl, phenylacetyl, pivolyl, 9-fluorenylmethyloxycarbonyl, 2-napthylic acid, nicotinic acid, a $CH_3—(CH_2)_n—CO—$ where n ranges from 3 to 20, and di-tert-butyl-4-hydroxy-phenyl, naphthyl, substituted naphthyl, f-MOC, biphenyl, substituted phenyl, substituted heterocycles, alkyl, aryl, substituted aryl, cycloalkyl, fused cycloalkyl, saturated heteroaryl, substituted saturated heteroaryl and the like. The C-terminal is capped with an amine such as RNH_2 where R = di-tert-butyl-4-hydroxy-phenyl, naphthyl, substituted naphthyl, f-MOC, biphenyl, substituted phenyl, substituted heterocycles, alkyl, aryl, substituted aryl, cycloalkyl, fused cycloalkyl, saturated heteroaryl, substituted saturated heteroaryl and the like. The sequence: X1-X2-X3 could be scrambled in any of all possible ways to provide compounds that retain the basic features of the Molecular Model and could be comprised of 3 to 10 amino acid residues.

[0027] In accordance with another aspect of the present invention, a substantially pure amino acid-derived substance is disclosed for treating and/or preventing hypercholesterolemia and/or atherosclerosis in a mammal. The substance has an amino and a carboxy terminal and comprises an L or D enantiomer of an acidic amino acid residue or modified synthetic amino acid or derivative thereof, an L or D enantiomer of a lipophilic amino acid residue or derivative or modified synthetic amino acid thereof, and an L or D enantiomer of a basic amino acid residue or derivative or modified synthetic amino acid

thereof. The amino terminal further comprises a first protecting group, and the carboxy terminal further comprises a second protecting group, wherein said first and second protecting groups are independently selected from the group consisting of an acetyl, phenylacetyl, pivolyl, 9-fluorenylmethyloxycarbonyl, 2-napthylic acid, nicotinic acid, and, di-tert-butyl-4-hydroxy-phenyl, naphthyl, substituted naphthyl, f-MOC, biphenyl, substituted phenyl, substituted heterocycles, alkyl, aryl, substituted aryl, cycloalkyl, fused cycloalkyl, saturated heteroaryl, substituted saturated heteroaryl and the like. The C-terminal is capped with an amine such as RNH_2 where R = di-tert-butyl-4-hydroxy-phenyl, naphthyl, substituted naphthyl, f-MOC, biphenyl, substituted phenyl, substituted heterocycles, alkyl, aryl, substituted aryl, cycloalkyl, fused cycloalkyl, saturated heteroaryl, substituted saturated heteroaryl and the like. The sequence: X1-X2-X3 could be scrambled in any of all possible ways to provide compounds that retain the basic features of the Molecular Model and could be comprised of 3 to 10 amino acid residues.

[0028] The substance has at least one of the following properties: (1) it binds to LDL and HDL mimicking ApoA-I binding to LDL and HDL, (2) it binds preferentially to liver, (3) it enhances LDL uptake by liver LDL-receptors, (4) it lower the levels of LDL, IDL, and VLDL cholesterol, (5) it increases the levels of HDL cholesterol, and (6) it improves plasma lipoprotein profiles.

[0029] In accordance with another aspect of the present invention, a composition suitable for oral administration is disclosed for ameliorating or preventing a symptom of hypercholesterolemia. The composition comprises an amino acid-derived molecule having an acidic region, a lipophilic region and a basic region. The amino acid-derived molecule also has a first protecting group attached to an amino terminal and a second protecting group attached to a carboxyl terminal. The amino acid-derived molecule may optionally comprise at least one D amino acid residue.

[0030] In accordance with another mode of the present invention, a peptide mediator of RCT is disclosed. The mediator comprises the sequence: Xa-Xb-X1-X2-X3-Xc-Xd, wherein Xa is an acylated amino acid residue; Xb is any 0-10 amino acid residues; X1-X2-X3 are selected independently from an acidic amino acid residue or derivative thereof, a lipophilic amino acid residue or derivative thereof, and a basic amino acid residue or derivative thereof; X_c is any 0-10 amino acid residues; and X_d is an amidated amino acid residue. The peptide mediator preferably has 15 or fewer amino acid residues and

optionally may comprise of at least one D amino acid residue or modified synthetic amino acid.

[0031] In accordance with another preferred embodiment of the present invention, administration of a composition suitable for oral administration which includes an amino acid-derived molecule having an acidic region, a lipophilic region and a basic region for treatment and/or prevention of hypercholesterolemia or atherosclerosis is disclosed. The amino acid-derived molecule also has a first protecting group attached to an amino terminal and a second protecting group attached to a carboxyl terminal. The amino acid-derived molecule may optionally comprise at least one D amino acid residue.

[0032] In accordance with another embodiment of the present invention, an RCT mediator is disclosed, comprising a compound selected from the group consisting of the synthetic compounds 1-96 of Table 5.

[0033] In accordance with another embodiment of the present invention, an RCT mediator is disclosed, comprising a compound selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 1 and 107-117.

[0034] In accordance with another embodiment of the present invention, an RCT mediator is disclosed, comprising a compound selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 1, 26-36, 42, 45-47, 56-58, 68-70, 72-74, 76, 80, 81, 83-90 and 92-95.

[0035] In accordance with another embodiment of the present invention, an RCT mediator is disclosed, comprising a compound selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1.

[0036] In accordance with another embodiment of the present invention, an RCT mediator is disclosed, comprising a compound selected from the group consisting of SEQ ID NO: 113.

[0037] In accordance with another embodiment of the present invention, an RCT mediator is disclosed, comprising a compound selected from the group consisting of SEQ ID NO: 34.

[0038] In accordance with another embodiment of the present invention, an RCT mediator is disclosed, comprising a compound selected from the group consisting of SEQ ID NO: 86.

[0039] In accordance with another embodiment of the present invention, an RCT mediator is disclosed, comprising a compound selected from the group consisting of SEQ ID NO: 91.

[0040] In accordance with another embodiment of the present invention, an RCT mediator is disclosed, comprising a compound selected from the group consisting of SEQ ID NO: 96.

[0041] In accordance with another embodiment of the present invention, an RCT mediator is disclosed, comprising a compound selected from the group consisting of SEQ ID NO: 145.

[0042] In accordance with another embodiment of the present invention, an RCT mediator is disclosed, comprising a compound selected from the group consisting of SEQ ID NO: 146.

[0043] In accordance with another embodiment of the present invention, an RCT mediator is disclosed, comprising a compound selected from the group consisting of SEQ ID NO: 118.

[0044] In accordance with another preferred embodiment of the present invention a method is disclosed for treating or preventing hypercholesterolemia and/or atherosclerosis. The method comprises administering to a mammal in need thereof an amount of a composition selected from SEQ ID NOS: 1-176 (Table 3) and synthetic compounds 1-96 (Table 5), wherein the amount is sufficient to enhance RCT and/or cause regression of existing atherosclerotic lesions or reduce formation of the lesions. More preferably, the composition used for treating or preventing hypercholesterolemia and/or atherosclerosis is selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 1, 113, 34, 86, 91, 96, 145, 146, and 118, wherein the amount is sufficient to enhance RCT and/or cause regression of existing atherosclerotic lesions or reduce formation of the lesions. In one variation to the method, the step of administering is accomplished via an oral route. In another variation to the method, the step of administering is combined with administration of a bile acid-binding resin, niacin, a statin, or a combination thereof.

[0045] In accordance with another preferred embodiment of the present invention, an *in vitro* screening method is disclosed for identifying test compounds that are likely to enhance reverse cholesterol transport *in vivo*. The method comprises: measuring cholesterol accumulation in liver cells *in vitro* in the presence and absence of the test

compounds; measuring cholesterol accumulation and/or efflux in AcLDL-loaded macrophages *in vitro* in the presence and absence of test compounds; and identifying test compounds that enhance cholesterol accumulation in liver cells and reduce cholesterol levels in macrophages.

[0046] In a variation to the screening method, cholesterol levels are also measured in OxLDL-loaded vascular smooth muscle cells *in vitro* in the presence and absence of test compounds. Accordingly, the step of identifying test compounds further comprises identifying compounds that enhance cholesterol accumulation in liver cells and reduce cholesterol levels in macrophages and/or reduce cholesterol levels in vascular smooth muscle cells.

[0047] In one embodiment of the screening method, the liver cells are human HepG2 hepatoma cells. In another embodiment, the macrophages are human THP-1 cells. In another embodiment, the vascular smooth muscle cells are primary aortic smooth muscle cells.

[0048] In another variation, the *in vitro* screening method comprises the steps of: measuring cholesterol accumulation in liver cells *in vitro* in the presence and absence of the test compounds; measuring cholesterol levels in AcLDL-loaded vascular smooth muscle cells *in vitro* in the presence and absence of test compounds; and identifying test compounds that enhance cholesterol accumulation in liver cells and reduce cholesterol levels in vascular smooth muscle cells.

Brief Description of the Drawings

[0049] ***Figure 1*** shows a schematic representation of solid phase peptide synthesis.

[0050] ***Figure 2*** illustrates association of the amino acid-derived compositions of the present invention with lipoproteins and albumin. Radiolabeled compounds were incubated with LDLR-/- mouse plasma at RT for 2hrs. Following incubation, the mixture was subjected to agarose gel electrophoresis. Radioactivity was quantified in the bands representing LDL, HDL, and Albumin. Lipoproteins and Albumin bound radioactivity is expressed as percentage of applied radioactivity.

[0051] ***Figure 3*** shows that the amino acid-derived compositions of the present invention bind to the liver in ApoA1-/- male mice. ApoA1-/- male mice were injected with

12 ug /mouse of radiolabeled compounds. 36 min livers were harvested, radioactivity quantified and adjusted per g of wet tissue. Liver bound radioactivity is expressed as % of total cpm. Each bar represents the mean ± SEM of 4 mice.

[0052] *Figure 4* shows the organ distribution of SEQ ID NO 1 and preferential uptake by the liver. ApoA1-/- male mice were injected with 12 ug of radiolabeled SEQ ID NO: 1. 36 min later organs were harvested, radioactivity quantified and adjusted per g of wet tissue. Each bar represents the mean ± SEM of 4 mice.

[0053] *Figure 5* shows that complexing of Human 125I-LDL with SEQ ID NO: 1 improved its binding to the liver. LDL delivery to the liver is enhanced by SEQ ID NO 1. ^{125}I-LDL alone or ^{125}I-LDL complexed with SEQ ID NO: 1 were injected into male mice of the deficient genotypes as indicated. 36 min later livers were collected at and radioactivity quantified. Liver bound radioactivity is expressed as % of injected radioactivity. Each bar represents the mean ± SEM of 4 mice.

[0054] *Figure 6* shows that SEQ ID NO 1-LDL complexes bind to the LDL receptor on liver. Binding of ^{125}I-LDL alone or ^{125}I-LDL complexed with SEQ ID NO: 1 to the liver of LDLR-/- mice were subtracted from their respective binding to the liver of A-I-/- mice. Result of subtraction indicates on dramatic increase in binding of the complex to the LDL-receptors. Each bar represents the mean ± SEM of 4 mice.

[0055] *Figure 7* shows the effects of SEQ ID NO 1 on clearance of human LDL from the blood of ApoA-I-deficient mice. ^{125}I-LDL alone or ^{125}I-LDL complexed with SEQ ID NO: 1 were injected into ApoA1-/- mice. At the indicated time points plasma was obtained, and 10%TCA precipitable radioactivity was measured. 100 % is equal to blood radioactivity determined 10 min after injection. Each value represents the mean ± 1 SEM of 4 animals.

[0056] *Figure 8* shows the effect of SEQ ID NO 1 on LDL organ distribution in ApoA-I-deficient and LDL receptor-deficient mice. Radioactivity,% = (organ bound radioactivity / blood radioactivity)x100%. Approximately 90% of total detected radioactivity (at the 36 min time point) is the blood radioactivity.

[0057] *Figure 9* shows the effect of SEQ ID NO 1 on plasma VLDL cholesterol levels. Mice were divided into two groups (4 mice in each group). SEQ ID NO: 1 or PBS were injected intravenously into experimental or control mice, respectively. At the indicated time points plasma was obtained, combined within each group, and applied on

Superose 6 column. Each time point on the curve represents the Mean ± SEM obtained from > or = 3 chromatographic profiles.

[0058] *Figure 10* shows the effect of SEQ ID NO 1 on plasma IDL/LDL cholesterol levels. Mice were divided into two groups (4 mice in each group). SEQ ID NO: 1 or PBS were injected intravenously into experimental or control mice, respectively. At the indicated time points plasma was obtained, combined within each group, and applied on Superose 6 column. Each time point on the curve represents the Mean ± SEM obtained from > or = 3 chromatographic profiles.

[0059] *Figure 11* shows the effect of SEQ ID NO 1 on plasma HDL levels. Mice were divided into two groups (4 mice in each group). SEQ ID NO: 1 or PBS were injected intravenously into experimental or control mice, respectively. At the indicated time points plasma was obtained, combined within each group, and applied on Superose 6 column. Each time point on the curve represents the Mean ± SEM obtained from > or = 3 chromatographic profiles.

[0060] *Figure 12* shows linear regression analysis of the effects of SEQ ID NO 1 on plasma VLDL cholesterol levels.

[0061] *Figure 13* shows linear regression analysis of the effects of SEQ ID NO 1 on plasma IDL/LDL cholesterol levels.

[0062] *Figure 14* shows linear regression analysis of the effects of SEQ ID NO 1 on plasma HDL levels.

[0063] *Figure 15* shows the effect of time-released SEQ ID NO 1 on plasma lipoprotein profile. Pumps containing SEQ ID NO: 1 or PBS were surgically inserted in canulated Chow fed mice. Pumps flow rate was 8ul/hr, which provided indicated in picture amount of SEQ ID NO: 1 per hr. Animals were switched on HFC diet immediately after surgery. 20hr later plasma was obtained, combined within each group (4 - 6 mice), and subjected to FPLC and agarose gel electrophoresis to monitor cholesterol and phospholipids distribution among different lipoprotein classes (for clarity, the data for phospholipids is not shown). Effect is expressed as % of change compared to PBS control.

[0064] *Figure 16* shows the long-term (20 hours) effects of infusion of various amino acid-derived compositions of the present invention on plasma lipoprotein profiles. Pumps containing SEQ ID NO: 1 or PBS were surgically inserted in canulated Chow fed mice. Pumps flow rate was 8ul/hr, which provided 30-40ug of peptide per hr. Animals were

switched on HFC diet immediately after surgery. 20hr later plasma was obtained, combined within each group (4 - 6 mice), and subjected to FPLC and agarose gel electrophoresis to monitor cholesterol and phospholipids distribution among different lipoprotein classes. Effect is expressed as % of change compared to PBS control.

[0065] *Figure 17* shows the long-term (160 hours) effects of infusion of various amino acid-derived compositions of the present invention on plasma lipoprotein profiles. Pumps containing SEQ ID NO: 1 or PBS were surgically inserted in canulated Chow fed mice. Pumps flow rate was 1ul/hr, which provided indicated in graph amount of peptide per hr. Animals were switched on HFC diet immediately after surgery. 160hr later plasma was obtained, combined within each group (4 - 6 mice), and subjected to FPLC and agarose gel electrophoresis to monitor cholesterol and phospholipids distribution among different lipoprotein classes (for clarity, the data for phospholipids is not shown). Effect is expressed as % of change compared to PBS control.

[0066] *Figure 18* shows the effects of various peptides (SEQ ID Nos: 34, 86, 91, 96, 35 and 36) of the present invention on PLTP enzyme activity. SEQ ID Nos: 34, 86, 91 and 96 resulted in activation of PLTP.

[0067] *Figure 19* shows the acute effects of oral administration of SEQ ID NO: 91 on plasma lipoprotein profiles and excretion of cholesterol in bile acid.

[0068] *Figure 20* shows effect of ad lib (via the drinking water) administration of AVP-26249 (SEQ ID NO: 91) on plasma lipoprotein profiles of Chow fed ApoE-/- mice.

[0069] *Figure 21* shows effects of ad lib (via the drinking water) administration of AVP-26249 (SEQ ID NO: 91), AVP-26451 (SEQ ID NO: 145), AVP-26452 (SEQ ID NO: 146) and AVP-26355 (SEQ ID NO: 118) on plasma lipoprotein profiles of ApoE-/- mice fed high fat diets.

[0070] *Figure 22* shows effects of ad lib (via the drinking water) administration of AVP-26249 (SEQ ID NO: 91), AVP-26451 (SEQ ID NO: 145), AVP-26452 (SEQ ID NO: 146) and AVP-26355 (SEQ ID NO: 118) on amount of cholesterol excreted by ApoE-/- mice fed high fat diets.

[0071] *Figure 23* is a schematic diagram showing *in vitro* cell culture triangle screening method for test compounds likely to enhance RCT *in vivo*.

[0072] *Figure 24* shows effect of AVP-26249 (SEQ ID NO: 91) and AVP-26452 (SEQ ID NO: 146) on LDL-mediated accumulation of cholesterol in HepG2 cells.

[0073] *Figure 25* shows effect of AVP-26249 (SEQ ID NO: 91) on Ac-LDL-mediated accumulation of cholesterol (TC) and cholesteryl ester (CE) in human macrophages.

[0074] *Figure 26* shows effect of AVP-26249 (SEQ ID NO: 91) and AVP-26452 (SEQ ID NO: 146) on Oxidized-LDL (Ox-LDL) mediated accumulation of cholesterol (TC) and cholesteryl ester (CE) in human vascular smooth muscle cells.

[0075] *Figure 27* shows effect of AVP-26249 (SEQ ID NO: 91) and AVP-26452 (SEQ ID NO: 146) on cholesterol efflux from Ac-LDL preloaded human macrophages.

[0076] *Figure 28* shows effect of AVP-26249 (SEQ ID NO: 91) on development of atherosclerotic lesions in aorta of ApoE-/- mice. ApoE-/- male mice were maintained on Chow diet for 4 weeks and on HFD (1.25% of cholesterol) for 9.3 weeks. Mice received AVP-26249 "ad lib" via the drinking water at concentrations of 0, 1.4 and 2.8 mpk for 13.3 weeks. At the end of experiment aortas were isolated and assessed for progression of atherosclerotic lesions.

[0077] *Figure 29* shows effect of AVP-26452 (SEQ ID NO: 146) on development of atherosclerotic lesions in aorta of ApoE-/- mice. ApoE-/- male mice were maintained on Chow diet for 4 weeks and on HFD (1.25% of cholesterol) for 9.3 weeks. Mice received AVP-26452 "ad lib" via the drinking water at concentrations of 0, 1.4 and 2.8 mpk for 13.3 weeks. At the end of experiment aortas were isolated and assessed for progression of atherosclerotic lesions.

[0078] *Figure 30* is a schematic diagram showing pathways in cholesterol transport and metabolism. Abbreviations include CE, cholesterol ester; PLTP, Phospholipid transfer protein; TG, triglyceride; LDL, low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein; IDL, intermediate density lipoprotein; LCAT, Lecithin:cholesterol acyltransferase.

Detailed Description of the Preferred Embodiment

[0079] The mediators of RCT in preferred embodiments of the invention mimic ApoA-I function and activity. In a broad aspect, these mediators are molecules comprising three regions, an acidic region, a lipophilic (e.g., aromatic) region, and a basic region. The molecules preferably contain a positively charged region, a negatively charged region, and an uncharged, lipophilic region. The locations of the regions with respect to one another

23 24

can vary between molecules; thus, in a preferred embodiment, the molecules mediate RCT regardless of the relative positions of the three regions within each molecule. Whereas in some preferred embodiments, the molecular template or model comprises an acidic amino acid-derived residue, a lipophilic amino acid-derived residue, and a basic amino acid-derived residue, linked in any order to form a mediator of RCT, in other preferred embodiments, the molecular model can be embodied by a single residue having acidic, lipophilic and basic regions, such as for example, the amino acid, phenylalanine (SEQ ID NO 127).

[0080] In some preferred embodiments, the molecular mediators of RCT comprise trimers of natural D- or L- amino acids, amino acid analogs (synthetic or semisynthetic), and amino acid derivatives. For example, a trimer may include an acidic amino acid residue or analog thereof, an aromatic or lipophilic amino acid residue or analog thereof, and a basic amino acid residue or analog thereof, the residues being joined by peptide or amide bond linkages. For example, the trimer sequence EFR comprises an acidic residue (glutamic acid), an aromatic residue (phenylalanine) and a basic amino acid residue (arginine). In other preferred aspects of the invention, the molecular mediators may be larger amino acid-based compounds which comprise one or more of the amino acid trimers. For example the decapeptide, YEFRDRMRTH, comprises the acidic-aromatic-basic trimer sequence, EFR, discussed above or efr or rfe, i.e cotaining d-amino acid residues or E-(4-Phenyl)-FR or modified or synthetic or semisynthetic amino acid residues.

[0081] While the molecular mediators of RCT share the common aspect of reducing serum cholesterol through enhancing direct and/or indirect RCT pathways (i.e., increasing cholesterol efflux), the preferred mediators may exhibit *inter alia* one or more of the following specific functional attributes: ability to form amphipathic helical structures or sub-structures thereof in the presence or absence of lipid, ability to bind lipids, ability to form pre-ß-like or HDL-like complexes, ability to activate LCAT, and ability to increase serum HDL concentration.

[0082] To date, efforts at designing ApoA-I agonists have focused on the 22-mer unit structures, e.g., the "consensus 22-mer" of Anantharamaiah *et al.*, 1990, *Arteriosclerosis* 10(1):95-105; Venkatachalapathi *et al.*, 1991, *Mol. Conformation and Biol. Interactions, Indian Acad. Sci.* B:585-596, which are capable of forming amphipathic α-helices in the presence of lipids. (See e.g., U.S. Pat. No. 6,376,464 directed at peptide

mimetics derived from modifications of the consensus 22-mer). In accordance with a preferred aspect of the present invention, relatively short (less than about 10 amino acid residues) amphipathic α-helical sub-structures which are derived from any of multiple α-helical domains of the intact ApoA-I were synthesized and tested as mediators of RCT. There are several advantages of using such relatively short peptides compared to longer 22-mers. For example, the shorter mediators of RCT are easier and less costly to produce, they are chemically and conformationally more stable, the preferred conformations remain relatively rigid, there is little or no intra-molecular interactions within the peptide chain, and the shorter peptides exhibit a higher degree of oral availability. Multiple copies of these shorter peptides might bind to the HDL or LDL producing the same effect of a more restrained large peptide. Although ApoA-I multifunctionality may be based on the contributions of its multiple α-helical domains, it is also possible that even a single function of ApoA-I, e.g., LCAT activation, can be mediated in a redundant manner by more than one of the α-helical domains. Thus, in a preferred aspect of the present invention, multiple functions of ApoA-I may be mimicked by the disclosed mediators of RCT which are directed to a single sub-domain.

[0083] Three functional features of ApoA-I are widely accepted as major criteria for ApoA-I agonist design: (1) ability to associate with phospholipids; (2) ability to activate LCAT; and (3) ability to promote efflux of cholesterol from the cells. Some of the cholesterol transport and metabolism pathways are illustrated in ***Figure 30***. The molecular mediators of RCT in accordance with some modes of the present invention may exhibit only the last functional feature—ability to increase RCT. However, quite a few other properties of ApoA-I, which are often overlooked, make ApoA-I a particularly attractive target for therapeutic intervention. For example, ApoA-I directs the cholesterol flux into the liver via a receptor-mediated process and modulates pre-β-HDL (primary acceptor of cholesterol from peripheral tissues) production via a PLTP driven reaction. However, these features allow broadening of the potential usefulness of ApoA-I mimetic molecules. This, entirely novel approach to viewing ApoA-I mimetic function, will allow use of the peptides or amino acid-derived small molecules, which are disclosed herein, to facilitate direct RCT (via HDL pathway) as well as indirect RCT (i.e., to intercept and clear the LDLs from circulation, by redirecting their flux to the liver); see e.g., ***Figure 30***. To be capable of enhancing indirect RCT, the molecular mediators of the present invention will preferably be

able to associate with phospholipids and bind to the liver (i.e., to serve as ligand for liver lipoprotein binding sites).

[0084] Thus, a goal of the research efforts which led to the present invention was to identify, design, and synthesize the short (less than about 10 amino acid residues), stable peptide mediators of RCT that exhibit preferential lipid binding conformation, increase cholesterol flux to the liver by facilitating direct and/or indirect reverse cholesterol transport, improve the plasma lipoprotein profile, and subsequently prevent the progression or/and even promote the regression of atherosclerotic lesions.

[0085] Our peptide design strategy was: (1) to determine relatively short (3-15 amino acid residues) interactive regions within the amphipathic α-helical domains of ApoA-I; (2) to base our first generation of peptides on exact ApoA-I sequence; (3) to design peptides according to the general rules emerged from investigation of amphipathic α-helical domains of ApoA-I; (4) to define the lower limits of peptide sequence length, the critical amino acid residues, and the exact topography in the shortest possible peptide, which still exhibits both amphipathic α-helical secondary structure and ApoA-I activity *in vitro* and *in vivo*; and (5) to incorporate defined physical chemical properties into design of even shorter small-molecule-like peptides and/or other small molecules that evolved into the Molecular Model as described above.

[0086] The mediators of RCT of the invention can be prepared in stable bulk or unit dosage forms, e.g., lyophilized products, that can be reconstituted before use *in vivo* or reformulated. The invention includes the pharmaceutical formulations and the use of such preparations in the treatment of hyperlipidemia, hypercholesterolemia, coronary heart disease, atherosclerosis, and other conditions such as endotoxemia causing septic shock.

[0087] The invention is illustrated by working examples which demonstrate that the mediators of RCT of the invention associate with the HDL and LDL component of plasma, and can increase the concentration of HDL and pre-β-HDLparticles, and lower plasma levels of LDL. Thus promote direct and indirect RCT. The mediators of RCT of the invention increase human LDL mediated cholesterol accumulation in human hepatocytes (HepG2 cells) (as shown in *Figure 24*). The mediators of RCT are also efficient at activating PLTP and thus promote the formation of pre-β-HDL particles. Increase of HDL cholesterol served as indirect evidence of LCAT involvement (LCAT

activation was not shown directly (*in vitro*)) in the RCT. Use of the mediators of RCT of the invention *in vivo* in animal models results in an increase in serum HDL concentration.

[0088] The invention is set forth in more detail in the subsections below, which describe the composition and structure of the mediators of RCT; structural and functional characterization; methods of preparation of bulk and unit dosage formulations; and methods of use.

Peptide Structure and Function

[0089] The mediators of RCT of the invention are generally peptides, or analogues thereof, which mimic the activity of ApoA-I. The mediators of RCT are composed of less than about 10 amino acid residues, or an analogue thereof. In some embodiments, at least one amide linkage in the peptide is replaced with a substituted amide, an isostere of an amide or an amide mimetic. Additionally, one or more amide linkages can be replaced with peptidomimetic or amide mimetic moieties which do not significantly interfere with the structure or activity of the peptides. Suitable amide mimetic moieties are described, for example, in Olson *et al.*, 1993, *J. Med. Chem.* 36:3039-3049.

[0090] A preferred feature of the peptides is their ability to form amphipathic α-helices or substructures. By amphipathic is meant that the α-helix has opposing hydrophilic and hydrophobic faces oriented along its long axis, i.e., one face of the helix projects mainly hydrophilic side chains while the opposite face projects mainly hydrophobic side chains.

[0091] As will be discussed more thoroughly below in conjunction with altered or mutated forms of the peptides, certain amino acid residues can be replaced with other amino acid residues such that the hydrophilic and hydrophobic faces of the helix formed by the peptides may not be composed entirely of hydrophilic and hydrophobic amino acids, respectively. Thus, it is to be understood that when referring to the amphipathic α-helix formed by the peptides of the invention, the phrase "hydrophilic face" refers to a face of the helix having overall net hydrophilic character. The phrase "hydrophobic face" refers to a face of the peptide having overall net hydrophobic character. While not intending to be bound by any particular theory, it is believed that certain structural and/or physical properties of the amphipathic helical structures formed by the peptides may contribute to their activity. These properties include the degree of amphipathicity, overall hydrophobicity, mean hydrophobicity, hydrophobic and hydrophilic angles, hydrophobic

moment, mean hydrophobic moment, and net charge of the α-helix. The degree of amphipathicity (degree of asymmetry of hydrophobicity) can be conveniently quantified by calculating the hydrophobic moment (μ_H) of the helix. Methods for calculating μ_H for a particular peptide sequence are well-known in the art, and are described, for example in Eisenberg, 1984, *Ann. Rev. Biochem.* 53:595-623. The actual μ_H obtained for a particular peptide will depend on the total number of amino acid residues composing the peptide. Thus, it is generally not informative to directly compare μ_H for peptides of different lengths.

[0092] The amphipathicities of peptides of different lengths can be directly compared by way of the mean hydrophobic moment ($<\mu_H>$). The mean hydrophobic moment can be obtained by dividing μ_H by the number of residues in the helix (i.e., $<\mu_H>=\mu_H/N$). Generally, the preferred peptides, which exhibit a $<\mu_H>$ in the range of 0.45 to 0.65, as determined using the normalized consensus hydrophobicity scale of Eisenberg (Eisenberg, 1984, *J. Mol. Biol.* 179:125-142), are considered to be within the scope of the present invention, with a $<\mu_H>$ in the range of 0.50 to 0.60 being preferred.

[0093] The overall or total hydrophobicity (H_o) of a peptide can be conveniently calculated by taking the algebraic sum of the hydrophobicities of each amino acid residue in the peptide:

$$\left(i.e., H_o = \sum_{i=1}^{N} H_i\right),$$

where N is the number of amino acid residues in the peptide and H_i is the hydrophobicity of the ith amino acid residue). The mean hydrophobicity ($<H_o>$) is the hydrophobicity divided by the number of amino acid residues (i.e., $<H_o>=H_o/N$). Generally, peptides that exhibit a mean hydrophobicity in the range of -0.050 to -0.070, as determined using the normalized consensus hydrophobicity scale of Eisenberg (Eisenberg, 1984, J. Mol. Biol. 179:125-142) are considered to be within the scope of the present invention, with a mean hydrophobicity in the range of -0.030 to -0.055 being preferred.

[0094] The total hydrophobicity of the hydrophobic face (H_o^{phb}) of an amphipathic helix can be obtained by taking the sum of the hydrophobicities of the hydrophobic amino acid residues which fall into the hydrophobic angle as defined below:

$$H_o^{phb} = \sum_{i=1}^{N} H_i,$$

where H_i is as previously defined and N_H is the total number of hydrophobic amino acids in the hydrophobic face). The mean hydrophobicity of the hydrophobic face ($<H_o^{pho}>$) is H_o^{pho}/N_H where N_H is as defined above. Generally, peptides which exhibit a $<H_o^{pho}>$ in the range of 0.90 to 1.20, as determined using the consensus hydrophobicity scale of Eisenberg (Eisenberg, 1984, supra; Eisenberg et al., 1982, supra) are considered to be within the scope of the present invention, with a $<H_o^{pho}>$ in the range of 0.94 to 1.10 being preferred.

[0095] The hydrophobic angle (pho angle) is generally defined as the angle or arc covered by the longest continuous stretch of hydrophobic amino acid residues when the peptide is arranged in the Schiffer-Edmundson helical wheel representation (i.e., the number of contiguous hydrophobic residues on the wheel multiplied by 20°). The hydrophilic angle (phi angle) is the difference between 360° and the pho angle (i.e., 360°-pho angle). Those of skill in the art will recognize that the pho and phi angles will depend in part, on the number of amino acid residues in the peptide.

[0096] Amphipathic peptides and molecular mediators, having acidic, aromatic and basic regions, in accordance with preferred aspects of the present invention, are expected to bind phospholipids by pointing their hydrophobic faces towards the alkyl chains of the lipid moieties. It is believed that the hydrophobic cluster will generate sufficiently strong lipid binding affinities for the peptides of the invention. Since lipid binding is a prerequisite for LCAT activation, it is also believed that the hydrophobic cluster may enhance LCAT activation. In addition, aromatic residues are often found to be important in anchoring peptides and proteins to lipids (De Kruijff, 1990, *Biosci. Rep.* 10:127-130; O'Neil and De Grado, 1990, *Science* 250:645-651; Blondelle et al., 1993, *Biochim. Biophys. Acta* 1202:331-336).

[0097] Interactions between the peptides of the invention and lipids lead in preferred embodiments to the formation of peptide-lipid complexes. The type of complex obtained (comicelles, discs, vesicles or multilayers) will depend on the lipid:peptide molar ratio, with comicelles generally being formed at low lipid:peptide molar ratios and discoidal and vesicular or multilayer complexes being formed with increasing lipid:peptide molar ratios. This characteristic has been described for amphipathic peptides (Epand, The Amphipathic Helix, 1993) and for ApoA-I (Jones, 1992, Structure and Function of Apolipoproteins, Chapter 8, pp. 217-250). The lipid:peptide molar ratio also determines the size and composition of the complexes.

29

[0098] In the generally accepted structural model of ApoA-I, the amphipathic α-helices are packed around the edge of the discoidal HDL. In this model, the helices are assumed to be aligned with their hydrophobic faces pointing towards the lipid acyl chains (Brasseur *et al.*, 1990, *Biochim. Biophys. Acta* 1043:245-252). The helices are arranged in an antiparallel fashion, and a cooperative effect between the helices is thought to contribute to the stability of the discoidal HDL complex (Brasseur *et al.*, supra). Although it has been proposed that one factor which contributes to the stability of the HDL discoidal complex is the existence of ionic interactions between acidic and basic residues in ApoA-I resulting in the formation of intermolecular salt bridges or hydrogen bonds between residues on adjacent anti-parallel helices, such intermolecular interactions are not necessary to the activity of the molecular mediators. Thus, additional features of some of the mediators of RCT are their ability to form intermolecular hydrogen-bonds with one another when aligned in an antiparallel fashion with their hydrophobic faces pointing in the same direction, such as would be the case when the mediators are bound to lipids.

[0099] It is widely held that intramolecular hydrogen bond or salt bridge formation between acidic and basic residues, respectively, at positions i and i+3 of the helix stabilize the helical structure (Marqusee et al., 1985, *PNAS. USA* 84(24):8898-8902). However, such intramolecular interactions are minimal in the relatively small molecular mediators of the present invention.

[0100] As used herein, the abbreviations for the genetically encoded L-enantiomeric amino acids are conventional and are as follows: The D-amino acids are designated by lower case, e.g. D-alanine = a, etc.

Table 1

Amino Acids	One-Letter Symbol	Common Abbreviation
Alanine	A	Ala
Arginine	R	Arg
Asparagine	N	Asn
Aspartic acid	D	Asp
Cysteine	C	Cys
Glutamine	Q	Gln
Glutamic acid	E	Glu
Glycine	G	Gly
Histidine	H	His

Amino Acids	One-Letter Symbol	Common Abbreviation
Isoleucine	I	Ile
Leucine	L	Leu
Lysine	K	Lys
Phenylalanine	F	Phe
Proline	P	Pro
Serine	S	Ser
Threonine	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosine	Y	Tyr
Valine	V	Val

[0101] Certain amino acid residues in the peptide mediators of RCT can be replaced with other amino acid residues without significantly deleteriously affecting, and in many cases even enhancing, the activity of the peptides. Thus, also contemplated by the present invention are altered or mutated forms of the peptide mediators of RCT wherein at least one defined amino acid residue in the structure is substituted with another amino acid residue or derivative and/or analog thereof. As one of the features affecting the activity of the peptides of the invention may be their ability to form α-helices in the presence of lipids that exhibit the amphipathic and other properties described above, it will be recognized that in preferred embodiments of the invention, the amino acid substitutions are conservative, i.e., the replacing amino acid residue has physical and chemical properties that are similar to the amino acid residue being replaced.

[0102] For purposes of determining conservative amino acid substitutions, the amino acids can be conveniently classified into two main categories--hydrophilic and hydrophobic--depending primarily on the physical-chemical characteristics of the amino acid side chain. These two main categories can be further classified into subcategories that more distinctly define the characteristics of the amino acid side chains. For example, the class of hydrophilic amino acids can be further subdivided into acidic, basic and polar amino acids. The class of hydrophobic amino acids can be further subdivided into nonpolar and aromatic amino acids. The definitions of the various categories of amino acids that define ApoA-I are as follows:

[0103] The term "hydrophilic amino acid" refers to an amino acid exhibiting a hydrophobicity of less than zero according to the normalized consensus hydrophobicity

scale of Eisenberg et al., 1984, J. Mol. Biol. 179:125-142. Genetically encoded hydrophilic amino acids include Thr (T), Ser (S), His (H), Glu (E), Asn (N), Gln (Q), Asp (D), Lys (K) and Arg (R).

[0104] The term "hydrophobic amino acid" refers to an amino acid exhibiting a hydrophobicity of greater than zero according to the normalized consensus hydrophobicity scale of Eisenberg, 1984, J. Mol. Biol. 179:125-142. Genetically encoded hydrophobic amino acids include Pro (P), Ile (I), Phe (F), Val (V), Leu (L), Trp (W), Met (M), Ala (A), Gly (G) and Tyr (Y).

[0105] The term "acidic amino acid" refers to a hydrophilic amino acid having a side chain pK value of less than 7. Acidic amino acids typically have negatively charged side chains at physiological pH due to loss of a hydrogen ion. Genetically encoded acidic amino acids include Glu (E) and Asp (D).

[0106] The term "basic amino acid" refers to a hydrophilic amino acid having a side chain pK value of greater than 7. Basic amino acids typically have positively charged side chains at physiological pH due to association with hydronium ion. Genetically encoded basic amino acids include His (H), Arg (R) and Lys (K).

[0107] The term "polar amino acid" refers to a hydrophilic amino acid having a side chain that is uncharged at physiological pH, but which has at least one bond in which the pair of electrons shared in common by two atoms is held more closely by one of the atoms. Genetically encoded polar amino acids include Asn (N), Gln (Q) Ser (S) and Thr (T).

[0108] The term "nonpolar amino acid" refers to a hydrophobic amino acid having a side chain that is uncharged at physiological pH and which has bonds in which the pair of electrons shared in common by two atoms is generally held equally by each of the two atoms (i.e., the side chain is not polar). Genetically encoded nonpolar amino acids include Leu (L), Val (V), Ile (I), Met (M), Gly (G) and Ala (A).

[0109] The term "aromatic amino acid" refers to a hydrophobic amino acid with a side chain having at least one aromatic or heteroaromatic ring. The aromatic or heteroaromatic ring may contain one or more substituents such as —OH, —SH, —CN, —F, —Cl, —Br, —I, —NO_2, —NO, —NH_2, —NHR, —NRR, —C(O)R, —C(O)OH, —C(O)OR, —$C(O)NH_2$, —C(O)NHR, —C(O)NRR and the like where each R is independently ($C_1 - C_6$) alkyl, substituted ($C_1 - C_6$) alkyl, ($C_1 - C_6$) alkenyl, substituted (C_1

– C_6) alkenyl, (C_1 – C_6) alkynyl, substituted (C_1 – C_6) alkynyl, (C_5 – C_{20}) aryl, substituted (C_5 – C_{20}) aryl, (C_6 – C_{26}) alkaryl, substituted (C_6 – C_{26}) alkaryl, 5-20 membered heteroaryl, substituted 5-20 membered heteroaryl, 6-26 membered alkheteroaryl or substituted 6-26 membered alkheteroaryl. Genetically encoded aromatic amino acids include Phe (F), Tyr (Y) and Trp (W).

[0110] The term "aliphatic amino acid" refers to a hydrophobic amino acid having an aliphatic hydrocarbon side chain. Genetically encoded aliphatic amino acids include Ala (A), Val (V), Leu (L) and Ile (I).

[0111] The amino acid residue Cys (C) is unusual in that it can form disulfide bridges with other Cys (C) residues or other sulfanyl-containing amino acids. The ability of Cys (C) residues (and other amino acids with —SH containing side chains) to exist in a peptide in either the reduced free —SH or oxidized disulfide-bridged form affects whether Cys (C) residues contribute net hydrophobic or hydrophilic character to a peptide. While Cys (C) exhibits a hydrophobicity of 0.29 according to the normalized consensus scale of Eisenberg (Eisenberg, 1984, supra), it is to be understood that for purposes of the present invention Cys (C) is categorized as a polar hydrophilic amino acid, notwithstanding the general classifications defined above.

[0112] As will be appreciated by those of skill in the art, the above-defined categories are not mutually exclusive. Thus, amino acids having side chains exhibiting two or more physical-chemical properties can be included in multiple categories. For example, amino acid side chains having aromatic moieties that are further substituted with polar substituents, such as Tyr (Y), may exhibit both aromatic hydrophobic properties and polar or hydrophilic properties, and can therefore be included in both the aromatic and polar categories. The appropriate categorization of any amino acid will be apparent to those of skill in the art, especially in light of the detailed disclosure provided herein.

[0113] Certain amino acid residues, called "helix breaking" amino acids, have a propensity to disrupt the structure of α-helices when contained at internal positions within the helix. Amino acid residues exhibiting such helix-breaking properties are well-known in the art (see, e.g., Chou and Fasman, *Ann. Rev. Biochem.* 47:251-276) and include Pro (P), Gly (G) and potentially all D-amino acids (when contained in an L-peptide; conversely, L-amino acids disrupt helical structure when contained in a D-peptide). While these helix-breaking amino acid residues fall into the categories defined above, with the exception of

Gly (G), these residues are generally not used to substitute amino acid residues at internal positions within the helix—they are generally used to substitute 1-3 amino acid residues at the N-terminus and/or C-terminus of the peptide.

[0114] While the above-defined categories have been exemplified in terms of the genetically encoded amino acids, the amino acid substitutions need not be, and in certain embodiments preferably are not, restricted to the genetically encoded amino acids. Indeed, many of the preferred peptide mediators of RCT contain genetically non-encoded amino acids. Thus, in addition to the naturally occurring genetically encoded amino acids, amino acid residues in the peptide mediators of RCT may be substituted with naturally occurring non-encoded amino acids and synthetic amino acids.

[0115] Certain commonly encountered amino acids which provide useful substitutions for the peptide mediators of RCT include, but are not limited to, β-alanine (β-Ala) and other omega-amino acids such as 3-aminopropionic acid, 2,3-diaminopropionic acid (Dpr), 4-aminobutyric acid and so forth; α-aminoisobutyric acid (Aib); ε-aminohexanoic acid (Aha); δ-aminovaleric acid (Ava); N-methylglycine or sarcosine (MeGly); ornithine (Orn); citrulline (Cit); t-butylalanine (t-BuA); t-butylglycine (t-BuG); N-methylisoleucine (MeIle); phenylglycine (Phg); cyclohexylalanine (Cha); norleucine (Nle); naphthylalanine (Nal); 4-phenylphenylalanine, 4-chlorophenylalanine (Phe(4-Cl)); 2-fluorophenylalanine (Phe(2-F)); 3-fluorophenylalanine (Phe(3-F)); 4-fluorophenylalanine (Phe(4-F)); penicillamine (Pen); 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid (Tic); β-2-thienylalanine (Thi); methionine sulfoxide (MSO); homoarginine (hArg); N-acetyl lysine (AcLys); 2,4-diaminobutyric acid (Dbu); 2,3-diaminobutyric acid (Dab); p-aminophenylalanine (Phe (pNH$_2$)); N-methyl valine (MeVal); homocysteine (hCys), homophenylalanine (hPhe) and homoserine (hSer); hydroxyproline (Hyp), homoproline (hPro), N-methylated amino acids and peptoids (N-substituted glycines).

[0116] Other amino acid residues not specifically mentioned herein can be readily categorized based on their observed physical and chemical properties in light of the definitions provided herein.

[0117] The classifications of the genetically encoded and common non-encoded amino acids according to the categories defined above are summarized in Table 2, below. It is to be understood that Table 2 is for illustrative purposes only and does not purport to

be an exhaustive list of amino acid residues and derivatives that can be used to substitute the peptide mediators of RCT described herein.

Table 2. CLASSIFICATIONS OF COMMONLY ENCOUNTERED AMINO ACIDS

Classification	Genetically Encoded	Non-Genetically Encoded
Hydrophobic		
Aromatic	F, Y, W	Phg, Nal, Thi, Tic, Phe (4-Cl), Phe (2-F), Phe (3-F), Phe (4-F), hPhe
Nonpolar	L, V, I, M, G, A, P	t-BuA, t-BuG, MeIle, Nle, MeVal, Cha, MeGly, Aib
Aliphatic	A, V, L, I	b-Ala, Dpr, Aib, Aha, MeGly, t-BuA, t-BuG, MeIle, Cha, Nle, MeVal
Hydrophilic		
Acidic	D, E	
Basic	H, K, R	Dpr, Orn, hArg, Phe(p-NH_2), Dbu, Dab
Polar	C, Q, N, S. T	Cit, AcLys, MSO, bAla, hSer
Helix-Breaking	P, G	D-Pro and other D-amino acids (in L-peptides)

[0118] Other amino acid residues not specifically mentioned herein can be readily categorized based on their observed physical and chemical properties in light of the definitions provided herein.

[0119] While in most instances, the amino acids of the peptide mediators of RCT will be substituted with L-enantiomeric amino acids, the substitutions are not limited to L-enantiomeric amino acids. Thus, also included in the definition of "mutated" or "altered" forms are those situations where an L-amino acid is replaced with an identical D-amino acid (e.g., L-Arg→D-Arg) or with a D-amino acid of the same category or subcategory (e.g., L-Arg D-Lys), and vice versa. Indeed, in certain preferred embodiments that are suitable for oral administration to animal subjects, the peptides may advantageously be composed of at least one D-enantiomeric amino acid. Peptides containing such D-amino acids are thought to be more stable to degradation in the oral cavity, gut or serum than are peptides composed exclusively of L-amino acids.

[0120] As noted above, D-amino acids tend to disrupt the structure of α-helices when contained at internal positions with an α-helical L-peptide. Furthermore, it has been observed that certain mutated forms of the peptide mediators of RCT that are composed entirely of D-amino acids exhibit significantly lower LCAT activation in the assay described herein than identical peptides composed entirely of L-amino acids. As a consequence, D-amino acids are generally not used to substitute internal L-amino acids; D-

amino acid substitutions are generally limited to 1-3 amino acid residues at the N-terminus and/or C-terminus of the peptide. In the case of small d-amino acid peptides this rule may not apply as multiple copies of the peptide might be associated to HDL or LDL to acquire the conformation necessary for the RCT.

[0121] As previously discussed, the amino acid Gly (G) generally acts as a helix-breaking residue when contained at internal positions of a peptide. Thus, although Gly (G) is generally considered to be a helix-breaking residue, Gly (G) can be used to substitute amino acids at internal positions of the peptide mediators of RCT. Preferably, only internal residues positioned within about ±1 helical turn of the center of the peptide (particularly for peptides composed of an even number of amino acids) are substituted with Gly (G). Additionally, it is preferred that only one internal amino acid residue in the peptide be substituted with Gly (G).

[0122] The native structure of ApoA-I contains eight helical units that are thought to act in concert to bind lipids (Nakagawa et al., 1985, *J. Am. Chem. Soc.* 107:7087-7092; Anantharamaiah et al., 1985, *J. Biol. Chem.* 260:10248-10262; Vanloo et al., 1991, *J. Lipid Res.* 32:1253-1264; Mendez et al., 1994, *J. Clin. Invest.* 94:1698-1705; Palgunari et al., 1996, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16:328-338; Demoor et al., 1996, *Eur. J. Biochem.* 239:74-84). Thus, also included in the present invention are mediators of RCT comprised of dimers, trimers, tetramers and even higher order polymers ("multimers") of the helical domains described herein. Such multimers may be in the form of tandem repeats, branched networks or combinations thereof. The peptide mediators of RCT may be directly attached to one another, separated by one or more linkers, or used independently to associate in multimeric stoichiometry with lipid (e.g., 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 of mediator:lipid, and possibly higher stoichiometric ratios).

[0123] The peptide mediators of RCT that comprise the multimers may comprise regions of the peptide sequence of ApoA-I, analogues of the ApoA-I sequence, mutated forms of ApoA-I, truncated or internally deleted forms of ApoA-I, extended forms of ApoA-I and/or combinations thereof. Truncated forms of the peptide mediators of RCT are obtained by deleting one or more amino acids from the N- and/or C-terminus of mediators of RCT. Internally deleted forms are obtained by deleting one or more amino acids from internal positions within the peptide mediators of RCT. The internal amino acid residues deleted may or may not be consecutive residues. Those of skill in the art will

recognize that deleting an internal amino acid residue from a peptide mediators of RCT may cause the plane of the hydrophilic-hydrophobic interface of the helix to rotate at the point of the deletion. As such rotations can significantly alter the amphipathic properties of the resultant helix, in a preferred embodiment of the invention amino acid residues are deleted so as to substantially retain the alignment of the plane of the hydrophilic-hydrophobic interface along the entire long axis of the helix.

Linkers

[0124] The peptide mediators of RCT can be connected or linked in a head-to-tail fashion (i.e., N-terminus to C-terminus), a head-to-head fashion, (i.e., N-terminus to N-terminus), a tail-to-tail fashion (i.e., C-terminus to C-terminus), or combinations thereof. The linker LL can be any bifunctional molecule capable of covalently linking two peptides to one another. Thus, suitable linkers are bifunctional molecules in which the functional groups are capable of being covalently attached to the N- and/or C-terminus of a peptide. Functional groups suitable for attachment to the N- or C-terminus of peptides are well known in the art, as are suitable chemistries for effecting such covalent bond formation.

[0125] The linker may be flexible, rigid or semi-rigid, depending on the desired properties of the multimer. Suitable linkers include, for example, amino acid residues such as Pro or Gly or peptide segments containing from about 2 to about 5, 10, 15 or 20 or even more amino acids, bifunctional organic compounds such as $H_2N(CH_2)_nCOOH$ where n is an integer from 1 to 12, and the like. Examples of such linkers, as well as methods of making such linkers and peptides incorporating such linkers are well-known in the art (see, e.g., Hunig et al., 1974, *Chem. Ber.* 100:3039-3044; Basak et al., 1994, *Bioconjug. Chem.* 5(4):301-305).

[0126] Peptide and oligonucleotide linkers that can be selectively cleaved, as well as means for cleaving the linkers are well known and will be readily apparent to those of skill in the art. Suitable organic compound linkers that can be selectively cleaved will be apparent to those of skill in the art, and include those described, for example, in WO 94/08051, as well as the references cited therein.

[0127] Linkers of sufficient length and flexibility include, but are not limited to, Pro (P), Gly (G), Cys-Cys, $H_2N—(CH_2)_n—COOH$ where n is 1 to 12, preferably 4 to 6; H_2N-aryl-COOH and carbohydrates.

[0128] Alternatively, as the native apolipoproteins permit cooperative binding between antiparallel helical segments, peptide linkers which correspond in primary sequence to the peptide segments connecting adjacent helices of the native apolipoproteins, including, for example, ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III, ApoD, ApoE and ApoJ can be conveniently used to link the peptides. These sequences are well known in the art (see, e.g., Rossenou et al., "Analysis of the Primary and of the Secondary Structure of the Apolipoproteins," In: Structure and Function of Lipoproteins, Ch. 6, 159-183, CRC Press, Inc., 1992).

[0129] Other linkers which permit the formation of intermolecular hydrogen bonds or salt bridges between tandem repeats of antiparallel helical segments include peptide reverse turns such as β-turns and γ-turns, as well as organic molecules that mimic the structures of peptide β-turns and/or γ-turns. Generally, reverse turns are segments of peptide that reverse the direction of the polypeptide chain so as to allow a single polypeptide chain to adopt regions of antiparallel β-sheet or antiparallel α-helical structure. β-turns generally are composed of four amino acid residues and γ-turns are generally composed of three amino acid residues.

[0130] Alternatively, the linker (LL) may comprise an organic molecule or moiety that mimics the structure of a peptide β-turn or γ-turn. Such β-turn and/or γ-turn mimetic moieties, as well as methods for synthesizing peptides containing such moieties, are well known in the art, and include, among others, those described in Giannis and Kolter, 1993 *Angew. Chem. Intl. Ed. Eng.* 32:1244-1267; Kahn et al., 1988, *J. Molecular Recognition* 1:75-79; and Kahn et al., 1987, *Tetrahedron Lett.* 28:1623-1626.

[0131] The helical segments attached to a single linking moiety need not be attached via like termini. Indeed, in some embodiments the helical segments are attached to a single linking moiety so as to be arranged in an antiparallel fashion, i.e., some of the helices are attached via their N-termini, others via their C-termini.

[0132] The helical segments can be attached directly to the linking moiety, or may be spaced from the linking moiety by way of one or more bifunctional linkers (LL), as previously described.

[0133] The number of nodes in the network will generally depend on the total desired number of helical segments, and will typically be from about 1 to 2. Of course, it

will be appreciated that for a given number of desired helical segments, networks having higher order linking moieties will have fewer nodes.

[0134] The networks may be of uniform order, i.e., networks in which all nodes are, for example, trifunctional or tetrafunctional linking moieties, or may be of mixed order, e.g., networks in which the nodes are mixtures of, for example, trifunctional and tetrafunctional linking moieties. Of course, it is to be understood that even in uniform order networks the linking moieties need not be identical. A tertiary order network may employ, for example, two, three, four or even more different trifunctional linking moieties.

[0135] Like the linear multimers, the helical segments comprising the branched network may be, but need not be, identical.

Analysis of Structure and Function

[0136] The structure and function of the mediators of RCT of the invention, including the multimeric forms described above, can be assayed in order to select active compounds. For example, the peptides or peptide analogues can be assayed for their ability to form α-helices, to bind lipids, to form complexes with lipids, to activate LCAT, and to promote cholesterol efflux, etc.

[0137] Methods and assays for analyzing the structure and/or function of the peptides are well-known in the art. Preferred methods are provided in the working examples, infra. For example, the circular dichroism (CD) and nuclear magnetic resonance (NMR) assays described, infra, can be used to analyze the structure of the peptides or peptide analogues--particularly the degree of helicity in the presence of lipids. The ability to bind lipids can be determined using the fluorescence spectroscopy assay described, infra. The ability of the peptides and/or peptide analogues to activate LCAT can be readily determined using the LCAT activation described, infra. The *in vitro* and *in vivo* assays described, infra, can be used to evaluate the half-life, distribution, cholesterol efflux and effects on RCT.

Preferred Embodiment

[0138] The mediators of RCT of the invention can be further defined by way of preferred embodiments.

[0139] In one preferred embodiment, there is a molecule comprising an amino acid-based composition having three independent regions: an acidic region, an aromatic or lipophilic region, and a basic region. Thus, a trimeric peptide in accordance with this

preferred embodiment, such as RFR, or erf or fre contains an acidic amino acid residue, an aromatic or lipophilic residue and a basic residue. The relative locations of the regions with respect to one another can vary between molecular mediators; the molecules mediate RCT regardless of the position of the three regions within each molecule. In mediators comprising a trimeric peptide, such as RFR or efr, the trimers may consist of natural D- or L- amino acids, amino acid analogs, and amino acid derivatives.

[0140] In another preferred embodiment, the aromatic region of the trimer may consist of nicotinic acid with an acidic or basic side chain(s).

[0141] In another preferred embodiment, the aromatic region of the trimer may consist of 4-phenyl phenylalanine.

[0142] In another preferred variation, the molecular mediators comprising an amino acid-based trimeric structure can optionally be capped by a lipophilic group(s) on the amino or carboxyl terminal at either end or both ends to improve the physicochemical properties of the molecular mediators of RCT and take advantage of the natural or active transport (absorption) system of fat or lipophilic materials into the body. The capping groups may be D or L enantiomers or non-enantiomeric molecules or groups. In preferred embodiments, the N-terminal capping groups are selected from the group consisting of acetyl, phenylacetyl, di-tert-butyl-4-hydroxy-phenyl, naphthyl, substituted naphthyl, f-MOC, biphenyl, substituted phenyl, substituted heterocycles, alkyl, aryl, substituted aryl, cycloalkyl, fused cycloalkyl, saturated heteroaryl, substituted saturated heteroaryl and the like. The C-terminal is preferably capped with an amine such as RNH_2 where R = di-tert-butyl-4-hydroxy-phenyl, naphthyl, substituted naphthyl, f-MOC, biphenyl, substituted phenyl, substituted heterocycles, alkyl, aryl, substituted aryl, cycloalkyl, fused cycloalkyl, saturated heteroaryl, substituted saturated heteroaryl, and the like.

[0143] In one preferred embodiment, the mediators of RCT of the invention are selected from the group of peptides and peptide derivatives set forth in Table 3 below, wherein all of the peptides are capped with an acetyl group on the N-terminus and an amide group on the C-terminus (unless otherwise specified):

Table 3

SEQ ID NO	Sequence
1	YRFRDRMRTH
2	PVARRFRDRMRTHVDSLRTQLAP
3	RRFRDRMRTHVDSLRTQLAP

4	FRDRMRTHVDSLRTQLAP
5	RDRMRTHVDSLRTQLAP
6	RTHVDSLRTQLAP
7	THVDSLRTQLAP
8	DSLRTQLAP
9	PVAEEFRDRMRTHV
10	PVAEEFRDRMR
11	PVAEEFRDRM
12	PVAEEFRDR
13	PVAEEF
14	PVAEE
15	MRTHVDSLRTQLAP
16	PVAEEFRDRMRTHVDSLR
17	WDKVKDF
18	SGRDYVSQFES
19	YLDEFQKKWKE
20	TRDFWDNLEKETDW
21	WDKVKDFANVYVDAVKD
22	PhCH2CO-YEFRDRMRTH
23	YEFRDRMRTH
24	Piv-YEFRDRMRTH
25	EFRDRMRTH
26	EFRDRMR
27	FRDRMRTH
28	yFRDRMRTh
29	eEFRDRMR
30	FrDRFRDr
31	EFRDRm
32	EFRDR
33	EFRD
34	EFR
35	rDRMRTh
36	dRMRTH
37	FrDRMRT
38	FRDRMR
39	FfRDRMr
40	FRDRM
41	YFRDRM
42	YFRDr
43	FRDRf
44	EFRDRMRTF
45	EFRDRf
46	FrDrFF
47	FrDrFY
48	FfDRFRDRf
49	mrDRFRDRm
50	FRDRFRDRF

51	FRDRMRDRM
52	MRDRFRDRM
53	RMRDRmr
54	FRDRMRDRF
55	EFRDRMRDRFE
56	FRdR
57	FRD
58	YFRD
59	frDRMRDRm
60	MRDRM
61	mRDRM
62	FRDRF
63	FRDRf
64	RMRDRMR
65	DRMRD
66	dRMRd
67	frDRMRDrF
68	RFEEFR
69	FRTRf
70	FRMRf
71	efRDRMRDRf
72	DRMRDF
73	yyyp-EFRDRMRTH
74	Yyp-EFRDRMRt
75	YyYpEFRDRMRt
76	EFRDRMRy
77	yyypEFRDRMR
78	YEFRDRm
79	yYYpEFRDRm
80	EFRDRy
81	EFRDy
82	yYYp-EFRD
83	efry
84	yYP-EFR
85	yYYp-EFRDr
86	erf
87	EEFRDR
88	EYR
89	E-(L-2-b-Naphtylalanine)-R
90	E-(L-1-b-Naphtylalanine)-R
91	E-BIP-R
92	H-EFR-OH
93	EFR-OH
94	H-EFR
95	RFE
96	efr
97	2-Nap-EFR

42

98	yefr
99	2-Nap-efry
100	Piv-efry
101	Fmoc-efry
102	2-Nap-erf
103	2-Nap-yefr
104	Piv-EFR
105	NA-EFR
106	3,5-ditertiary-butyl-4-hydroxy-PhCO-E-(E-BIP-R-NH_2)
107	YWHVWQQDE
108	YQWDKVKDF
109	ENWDTLGSY
110	SGRDYVSQFES
111	VRQEMNKDLEEVKQKVY
112	YQMRESLAQRLY
113	TRDFWDNLEKETDWY
114	DEFQKKWKEY
115	WKEDVELYRQKV
116	YSLAQRLAELKSY
117	QESARQKLQELQY
118	yerf
119	rfe
120	Fmoc-EFR-OH
121	NA-yerf
122	NA-E-BIP-R
123	erfy
124	NA-erfy
125	2-Nap-E-BIP-R
126	NA-efr
127	H-F-OH (L or D)
128	3,5-ditertiary-butyl-4-hydroxy-PhCO-E-BIP-R
129	(1-Naphthyl)-L-alanine
130	(1-Naphthyl)-D-alanine
131	(2-Naphthyl)-L-alanine
132	(2-Naphthyl)-D-alanine
133	BIP-A
134	BIP-a
135	NA-fre
136	1-Nap-erfy
137	1-Nap-E-BIP-R
138	NA-yfre
139	yfre
140	NA-erf
141	2-Nap-efry-OH
142	3,5-ditertiary-butyl-4-hydroxy-PhCO-frey
143	NA-frey
144	NA-fr

43

145	e-BIP-r
146	e-bip-r
147	Isox-e-bip-r
148	1-Nap-rfey
149	1-Nap-frey
150	E-BIP-R-OH
151	3,5-ditertiary-butyl-4-hydroxy-PhCO-erf
152	frey
153	rfey
154	3,5-ditertiary-butyl-4-hydroxy-PhCO-fer
155	Isoxazole-refy
156	refy
157	NA-refy
158	3,5-ditertiary-butyl-4-hydroxy-PhCO-refy
159	Isoxazole-fer
160	Isoxazole-yref
161	NA-yref
162	3,5-ditertiary-butyl-4-hydroxy-PhCO-fery
163	3,5-ditertiary-butyl-4-hydroxy-PhCO-fr
164	Isoxazole-fery
165	3,5-ditertiary-butyl-4-hydroxy-PhCO-rfey
166	fery
167	3,5-ditertiary-butyl-4-hydroxy-PhCO-rf
168	NA-yfer
169	Isoxazole-yfer
170	NA-fer
171	3,5-ditertiary-butyl-4-hydroxy-PhCO-yfer
172	Isoxazole-rfe
173	1-Nap-yfer
174	1-Nap-rfe
175	NA-rfe
176	E-F(4-I)-R

[0144] The abbreviations used for the D-enantiomers of the genetically encoded amino acids are lower-case equivalents of the one-letter symbols shown in Table 1. For example, "R" designates L-arginine and "r" designates D-arginine. Unless otherwise specified (eg. "OH"), the N-terminus is acetylated and the C-terminus is amidated.

[0145] PhAc denotes phenylacetylated.

[0146] Piv denotes pivolylated.

[0147] 1-Nap & 2-Nap indicate naphthylic acid capped.

[0148] Fmoc denotes an N-terminus modified with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl.

[0149] NA denotes nicotinic acid.

[0150] BIP denotes biphenylalanine.

[0151] Isoxazole denotes 5-methyl-isoxazole-3-carboxylic acid derivative

[0152] Amino acid substitutions need not be, and in certain embodiments preferably are not, restricted to the genetically encoded amino acids. Thus, in addition to the naturally occurring genetically encoded amino acids, amino acid residues in the peptide mediators of RCT may be substituted with naturally occurring non-encoded amino acids and synthetic amino acids.

Synthetic Methods

[0153] The peptides of the invention may be prepared using virtually any art-known technique for the preparation of peptides. For example, the peptides may be prepared using conventional step-wise solution or solid phase peptide syntheses, or recombinant DNA techniques.

[0154] The peptide mediators of RCT may be prepared using conventional step-wise solution or solid phase synthesis (see, e.g., Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, Williams et al., Eds., 1997, CRC Press, Boca Raton Fla., and references cited therein; Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, Atherton & Sheppard, Eds., 1989, IRL Press, Oxford, England, and references cited therein). See *Figure 1*.

[0155] In conventional solid-phase synthesis, attachment of the first amino acid entails chemically reacting its carboxyl-terminal (C-terminal) end with derivatized resin to form the carboxyl-terminal end of the oligopeptide. The alpha-amino end of the amino acid is typically blocked with a t-butoxy-carbonyl group (t-Boc) or with a 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (F-Moc) group to prevent the amino group which could otherwise react from participating in the coupling reaction. The side chain groups of the amino acids, if reactive, are also blocked (or protected) by various benzyl-derived protecting groups in the form of ethers, thioethers, esters, and carbamates.

[0156] The next step and subsequent repetitive cycles involve deblocking the amino-terminal (N-terminal) resin-bound amino acid (or terminal residue of the peptide chain) to remove the alpha-amino blocking group, followed by chemical addition (coupling) of the next blocked amino acid. This process is repeated for however many cycles are necessary to synthesize the entire peptide chain of interest. After each of the

coupling and deblocking steps, the resin-bound peptide is thoroughly washed to remove any residual reactants before proceeding to the next. The solid support particles facilitate removal of reagents at any given step as the resin and resin-bound peptide can be readily filtered and washed while being held in a column or device with porous openings.

[0157] Synthesized peptides may be released from the resin by acid catalysis (typically with hydrofluoric acid or trifluoroacetic acid), which cleaves the peptide from the resin leaving an amide or carboxyl group on its C-terminal amino acid. Acidolytic cleavage also serves to remove the protecting groups from the side chains of the amino acids in the synthesized peptide. Finished peptides can then be purified by any one of a variety of chromatography methods.

[0158] In accordance with a preferred embodiment, the peptides and peptide derivative mediators of RCT were synthesized by solid-phase synthesis methods with N^{α}-Fmoc chemistry. N^{α}-Fmoc protected amino acids and Rink amide MBHA resin and Wang resin were purchased from Novabiochem (San Diego, CA) or Chem-Impex Intl (Wood Dale, IL). Other chemicals and solvents were purchased from the following sources: trifluoroacetic acid (TFA), anisole, 1,2-ethanedithiol, thioanisole, piperidine, acetic anhydride, 2-Naphthoic acid and Pivaloic acid (Aldrich, Milwaukee, WI), HOBt and NMP (Chem-Impex Intl, Wood Dale, IL), dichloromethane, methanol and HPLC grade solvents from Fischer Scientific, Pittsburgh, PA. The purity of the peptides was checked by LC/MS. The purification of the peptides was achieved using Preparative HPLC system (Agilent technologies, 1100 Series) on a C_{18}-bonded silica column (Tosoh Biospec preparative column, ODS-80TM, Dim: 21.5 mm x 30cm). The peptides were eluted with a gradient system [50% to 90% of B solvent (acetonitrile:water 60:40 with 0.1% TFA)].

[0159] All peptides were synthesized in a stepwise fashion via the solid-phase method, using Rink amide MBHA resin (0.5-0.66 mmol/g) or wang resin (1.2 mmol/g). The side chain's protecting groups were Arg (Pbf), Glu (OtBu) and Tyr (tBu). Each Fmoc-protected amino acid was coupled to this resin using a 1.5 to 3-fold excess of the protected amino acids. The coupling reagents were N-hydroxybenzotriazole (HOBt) and diisopropyl carbodiimide (DIC), and the coupling was monitored by Ninhydrin test. The Fmoc group were removed with 20% piperidine in NMP 30-60 minutes treatment and then successive washes with CH_2Cl_2, 10%TEA in CH_2Cl_2, Methanol and CH_2Cl_2. Coupling steps were followed by acetylation or with other capping groups as necessary.

46

[0160] A mixture of TFA, thioanisole, ethanedithiol and anisole (90:5:3:2, v/v) was used (4-5 hours at room temperature) to cleave the peptide from the peptide-resin and remove all of the side chain protecting groups. The crude peptide mixture was filtered from the sintered funnel, which was washed with TFA (2-3 times). The filtrate was concentrated into thick syrup and added into cold ether. The peptide precipitated as a white solid after keeping overnight in the freezer and centrifugation. The solution was decanted and the solid was washed thoroughly with ether. The resulting crude peptide was dissolved in buffer (acetonitrile:water 60:40 with 0.1% TFA) and dried. The crude peptide was purified by HPLC using preparative C-18 column (reverse phase) with a gradient system 50 – 90% B in 40 minutes [Buffer A: water containing 0.1% (v/v) TFA, Buffer B: Acetonitrile:water (60:40) containing 0.1% (v/v) TFA]. The pure fractions were concentrated over Speedvac. The yields varied from 5% to 20%.

[0161] Capped peptides synthesized as described above are shown in Table 4.

Table 4

SEQ ID NO	Sequence
34	Ac-E-F-R-NH2
83	Ac-e-f-r-y-NH_2
86	Ac-e-r-f-NH2
91	Ac-E-BIP-R-NH2
97	2-Nap-E-F-R-NH2
98	Ac-y-e-f-r-NH2
99	2-Nap-e-f-r-yNH2
100	Piv-e-f-r-y-NH2
101	Fmoc-e-f-r-y-NH2
102	2-Nap-e-r-f-NH2
103	2-Nap-y-e-f-r-NH2
104	Piv-E-F-R-NH2
105	NA-E-F-R-NH2
106	3,5-ditertiary-butyl-4-hydroxy-PhCO-E-(E-BIP-R-NH2)
118	Ac-y-e-r-f-NH2
119	Ac-r-f-e-NH2
120	Fmoc-E-F-R-OH
121	NA-y-e-r-f-NH2
122	NA-E-BIP-R-NH2
123	Ac-e-r-f-y-NH2
124	NA-e-r-f-y-NH2
126	NA-e-f-r-NH2
125	2-Nap-E-BIP-R-NH2

[0162] Ac denotes acetylated.

[0163] Piv denotes pivolylated.

[0164] 1-Nap & 2-Nap indicate naphthylic acid capped.

[0165] Fmoc denotes an N-terminus modified with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl.

[0166] NA denotes nicotinic acid.

[0167] BIP denotes biphenylalanine.

[0168] Isoxazole denotes 5-methyl-isoxazole-3-carboxylic acid derivative.

[0169] Alternatively, the peptides of the invention may be prepared by way of segment condensation, i.e., the joining together of small constituent peptide chains to form a larger peptide chain, as described, for example, in Liu et al., 1996, *Tetrahedron Lett.* 37(7):933-936; Baca, et al., 1995, *J. Am. Chem. Soc.* 117:1881-1887; Tam et al., 1995, *Int. J. Peptide Protein Res.* 45:209-216; Schnolzer and Kent, 1992, *Science* 256:221-225; Liu and Tam, 1994, *J. Am. Chem. Soc.* 116(10):4149-4153; Liu and Tam, 1994, *PNAS. USA* 91:6584-6588; Yamashiro and Li, 1988, *Int. J. Peptide Protein Res.* 31:322-334; Nakagawa et al., 1985, *J. Am Chem. Soc.* 107:7087-7083; Nokihara et al., 1989, *Peptides* 1988:166-168; Kneib-Cordonnier et al., 1990, *Int. J. Pept. Protein Res.* 35:527-538; the disclosures of which are incorporated herein in their entirety by reference thereto). Other methods useful for synthesizing the peptides of the invention are described in Nakagawa et al., 1985, *J. Am. Chem. Soc.* 107:7087-7092.

[0170] For peptides produced by segment condensation, the coupling efficiency of the condensation step can be significantly increased by increasing the coupling time. Typically, increasing the coupling time results in increased racemization of the product (Sieber et al., 1970, *Helv. Chim. Acta* 53:2135-2150). However, since glycine lacks a chiral center it does not undergo racemization (proline residues, due to steric hindrance, also undergo little or no racemization at long coupling times). Thus, embodiments containing internal glycine residues can be synthesized in bulk in high yield via segment condensation by synthesizing constituent segments which take advantage of the fact that glycine residues do not undergo racemization. Thus, embodiments containing internal glycine residues provide significant synthetic advantages for large-scale bulk preparation.

[0171] Mediators of RCT containing N- and/or C-terminal blocking groups can be prepared using standard techniques of organic chemistry. For example, methods for acylating the N-terminus of a peptide or amidating or esterifying the C-terminus of a

peptide are well-known in the art. Modes of carrying other modifications at the N- and/or C-terminus will be apparent to those of skill in the art, as will modes of protecting any side-chain functionalities as may be necessary to attach terminal blocking groups.

[0172] Pharmaceutically acceptable salts (counter ions) can be conveniently prepared by ion-exchange chromatography or other methods as are well known in the art.

[0173] Compounds of the invention which are in the form of tandem multimers can be conveniently synthesized by adding the linker(s) to the peptide chain at the appropriate step in the synthesis. Alternatively, the helical segments can be synthesized and each segment reacted with the linker. Of course, the actual method of synthesis will depend on the composition of the linker. Suitable protecting schemes and chemistries are well known, and will be apparent to those of skill in the art.

[0174] Compounds of the invention which are in the form of branched networks can be conveniently synthesized using the trimeric and tetrameric resins and chemistries described in Tam, 1988, *PNAS* USA 85:5409-5413 and Demoor et al., 1996, *Eur. J. Biochem.* 239:74-84. Modifying the synthetic resins and strategies to synthesize branched networks of higher or lower order, or which contain combinations of different peptide helical segments, is well within the capabilities of those of skill in the art of peptide chemistry and/or organic chemistry.

[0175] Formation of disulfide linkages, if desired, is generally conducted in the presence of mild oxidizing agents. Chemical oxidizing agents may be used, or the compounds may simply be exposed to atmospheric oxygen to effect these linkages. Various methods are known in the art, including those described, for example, by Tam et al., 1979, *Synthesis* 955-957; Stewart et al., 1984, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2d Ed., Pierce Chemical Company Rockford, IL; Ahmed et al., 1975, *J. Biol. Chem.* 250:8477-8482; and Pennington et al., 1991 *Peptides* 1990:164-166, Giralt and Andreu, Eds., ESCOM Leiden, The Netherlands. An additional alternative is described by Kamber et al., 1980, *Helv. Chim. Acta* 63:899-915. A method conducted on solid supports is described by Albericio, 1985, *Int. J. Peptide Protein Res.* 26:92-97. Any of these methods may be used to form disulfide linkages in the peptides of the invention. Additional chemically synthesized amino acid-derived compounds are shown in the following Table 5.

TABLE 5

COMPOUND #	SEQUENCE	MOL. FORMULA	MOL. WEIGHT
1	Ac-E-F-R-NH$_2$	$C_{29}H_{33}N_7O_5$	491.55
2	Ac-e-r-f-NH$_2$	$C_{29}H_{33}N_7O_5$	491.55
3	Ac-E-BIP-R-NH$_2$	$C_{38}H_{37}N_7O_5$	567.64
4	Ac-e-f-r-y- NH$_2$	$C_{31}H_{42}N_8O_5$	654.72
5	2-Naph-E-F-R-NH$_2$	$C_{31}H_{37}N_7O_5$	603.68
6	Ac-y-e-f-r- NH$_2$	$C_{31}H_{42}N_8O_5$	654.72
7	2-Nap-e-f-r-y- NH$_2$	$C_{40}H_{46}N_8O_5$	766.85
8	Piv-e-f-r-y-NH$_2$	$C_{34}H_{48}N_8O_5$	696.80
9	Fmoc-e-f-r-y-NH$_2$	$C_{44}H_{50}N_8O_7$	834.93
10	2-Nap-e-r-f-NH$_2$	$C_{31}H_{37}N_7O_5$	603.68
11	2-Nap- y-e-f-r- NH$_2$	$C_{40}H_{46}N_8O_5$	766.85
12	Piv-E-F-R-NH$_2$	$C_{25}H_{39}N_7O_5$	533.63
13	NA-E-F-R-NH$_2$	$C_{26}H_{34}N_8O_5$	554.61
14	Ac-y-e-r-f-NH$_2$	$C_{31}H_{42}N_8O_5$	654.72
15	Ac-r-f-e-NH$_2$	$C_{29}H_{33}N_7O_5$	491.55
16	Fmoc-E-F-R-OH	$C_{32}H_{40}N_6O_5$	672.74
17	NA-y-e-r-f-NH$_2$	$C_{35}H_{43}N_9O_5$	717.78
18	NA-E-BIP-R-NH$_2$	$C_{35}H_{38}N_8O_5$	630.70
19	NA-e-r-f-y-NH$_2$	$C_{35}H_{43}N_9O_5$	717.78
20	2-Nap-E-BIP-R-NH$_2$	$C_{37}H_{41}N_7O_5$	679.77
21	NA-e-f-r-NH$_2$	$C_{26}H_{34}N_8O_5$	554.61
22	3,5-ditertiary-butyl-4-hydroxy-PhCO-E-BIP-R-NH$_2$	$C_{41}H_{55}N_7O_7$	757.93
23	1-Nap-L-Alanine	$C_{13}H_{13}NO_2$	215.25
24	1-Nap-D-Alanine	$C_{13}H_{13}NO_2$	215.25
25	2-Nap-L-Alanine	$C_{13}H_{13}NO_2$	215.25
26	2-Nap-D-Alanine	$C_{13}H_{13}NO_2$	215.25
27	L-Biphenylalanine	$C_{15}H_{15}NO_2$	241.3
28	D-Biphenylalanine	$C_{15}H_{15}NO_2$	241.3
29	NA-f-r-e-NH$_2$	$C_{26}H_{34}N_8O_5$	554.61
30	1-Nap-e-r-f-y-NH$_2$	$C_{40}H_{46}N_8O_5$	766.84
31	1-Nap-E-BIP-R-NH$_2$	$C_{37}H_{41}N_7O_5$	679.77
32	NA-y-f-r-e-NH$_2$	$C_{35}H_{43}N_9O_5$	717.78
33	Ac-y-f-r-e-NH$_2$	$C_{31}H_{42}N_8O_5$	654.72
34	NA-e-r-f-NH$_2$	$C_{26}H_{34}N_8O_5$	554.61
35	2-Nap-e-f-r-y-OH	$C_{40}H_{45}N_7O_7$	767.84
36	3,5-ditertiary-butyl-4-hydroxy-PhCO-f-r-e-y-NH$_2$	$C_{44}H_{60}N_8O_9$	845.01
37	NA-f-r-e-y-NH$_2$	$C_{35}H_{43}N9_8O_5$	717.78
38	NA-f-r-NH$_2$	$C_{21}H_{27}N_7O_3$	425.49
39	Ac-e-BIP-r-NH$_2$	$C_{28}H_{37}N_7O_5$	567.64
40	Ac-e-bip-r-NH$_2$	$C_{28}H_{37}N_7O_5$	567.64
41	Isoxazole-e-bip-r-NH$_2$	$C_{31}H_{38}N_8O_7$	634.69
42	1-Nap-r-f-e-y-NH$_2$	$C_{40}H_{46}N_8O_5$	766.84

43	1-Nap-f-r-e-y-NH_2	$C_{40}H_{46}N_8O_8$	766.84
44	Ac-E-BIP-R-OH	$C_{32}H_{38}N_8O_6$	568.63
45	3,5-ditertiary-butyl-4-hydroxy-PhCO-e-r-f-NH_2	$C_{35}H_{51}N_7O_7$	681.82
46	Ac-f-r-e-y-NH_2	$C_{31}H_{42}N_8O_8$	654.72
47	Ac-r-f-e-y-NH_2	$C_{31}H_{42}N_8O_8$	654.72
48	3,5-ditertiary-butyl-4-hydroxy-PhCO-f-e-r-NH_2	$C_{35}H_{51}N_7O_7$	681.82
49	Isoxazole-r-e-f-y-NH_2	$C_{34}H_{43}N_9O_9$	721.77
50	Ac-r-e-f-y-NH_2	$C_{31}H_{42}N_8O_8$	654.72
51	NA-r-e-f-y-NH_2	$C_{35}H_{43}N_9O_8$	717.78
52	3,5-ditertiary-butyl-4-hydroxy-PhCO-r-e-f-y-NH_2	$C_{44}H_{60}N_8O_9$	845.01
53	Isaxazole-f-e-r-NH_2	$C_{32}H_{31}N_7O_7$	558.59
54	Isoxazole-y-r-e-f-NH_2	$C_{34}H_{43}N_9O_9$	721.77
55	NA-y-r-e-f-NH_2	$C_{35}H_{43}N_9O_8$	717.78
56	3,5-ditertiary-butyl-4-hydroxy-PhCO-f-r-e-y-NH_2	$C_{44}H_{60}N_8O_9$	845.01
57	3,5-ditertiary-butyl-4-hydroxy-PhCO-f-r-NH_2	$C_{30}H_{44}N_6O_4$	552.72
58	Isoxazole-f-e-r-y-NH_2	$C_{34}H_{43}N_9O_9$	721.77
59	3,5-ditertiary-butyl-4-hydroxy-PhCO-r-f-e-y-NH_2	$C_{44}H_{60}N_8O_9$	845.01
60	Ac-f-e-r-y-NH_2	$C_{31}H_{42}N_8O_8$	654.72
61	3,5-ditertiary-butyl-4-hydroxy-PhCO-f-r-NH_2	$C_{30}H_{44}N_6O_4$	552.72
62	NA-y-f-e-r-NH_2	$C_{35}H_{43}N_9O_8$	717.78
63	Isaxazole-y-f-e-r-NH_2	$C_{34}H_{43}N_9O_9$	721.77
64	NA-f-e-r-NH_2	$C_{26}H_{34}N_8O_6$	554.61
65	3,5-ditertiary-butyl-4-hydroxy-PhCO-y-f-e-r-NH_2	$C_{44}H_{60}N_8O_9$	845.01
66	Isoxazole-r-f-e-NH_2	$C_{32}H_{31}N_7O_7$	558.59
67	1-Nap-y-f-e-r-NH_2	$C_{40}H_{46}N_8O_8$	766.84
68	1-Nap-r-f-e-NH_2	$C_{31}H_{37}N_7O_6$	603.68
69	NA-r-f-e-NH_2	$C_{26}H_{34}N_8O_6$	554.61
70	Ac-E-F(4-I)-R-NH_2	$C_{22}H_{32}IN_7O_6$	617.44
71	NA-R-BIP-E-NH_2	$C_{32}H_{38}N_8O_6$	630.70
72	1-Nap-R-BIP-E-NH_2	$C_{37}H_{41}N_7O_6$	679.77
73	Ac-R-BIP-E-NH_2	$C_{28}H_{37}N_7O_6$	567.64
74	Ac-E-BIP-K-NH_2	$C_{28}H_{37}N_5O_6$	539.63
75	Ac-D-BIP-K-NH_2	$C_{27}H_{35}N_5O_6$	525.60
76	Ac-d-BIP-r-NH_2	$C_{27}H_{37}N_5O_6$	553.62
77	Ac-e-bip-k-NH_2	$C_{28}H_{37}N_5O_6$	539.63
78	Ac-d-bip-k-NH_2	$C_{27}H_{35}N_5O_6$	525.60
79	Ac-d-bip-r-NH_2	$C_{27}H_{37}N_5O_6$	553.62
80	Ac-E-R-BIP-NH_2	$C_{28}H_{37}N_7O_6$	567.64

81	2-Pyrazine-CO-E-R-BIP-NH_2	$C_{31}H_{37}N_9O_6$	631.60
82	Piperonyl-CO-E-R-BIP-NH_2	$C_{34}H_{39}N_7O_8$	673.72
83	Ac-E-bip-R-NH_2	$C_{28}H_{37}N_7O_6$	567.64
84	Ac-e-f(4-I)-r-NH_2	$C_{22}H_{32}IN_7O_5$	617.44
85	Glutaric-BIP-R-NH_2	$C_{26}H_{34}N_6O_5$	510.59
86	Glutaric-bip-r-NH_2	$C_{26}H_{34}N_6O_5$	510.59
87	Ac-E-BIP-Agmatine	$C_{27}H_{36}N_6O_5$	524.62
88	Ac-e-bip-Agmatine	$C_{27}H_{36}N_6O_5$	524.62
89	Ac-R-BIP-GABA	$C_{27}H_{36}N_6O_5$	524.62
90	Ac-r-bip-GABA	$C_{27}H_{36}N_6O_5$	524.62
91	Agmatine-BIP-E-NH_2	$C_{25}H_{32}N_6O_5$	496.56
92	Agmatine-bip-e-NH_2	$C_{25}H_{32}N_6O_5$	496.56
93	Ac-e-bip(4-tBu)-r-NH_2	$C_{32}H_{45}N_7O_6$	673.75
94	Ac-E-BIP(4-tBu)-R-NH_2	$C_{32}H_{45}N_7O_6$	673.75
95	Glutaric-BIP-K-NH_2	$C_{26}H_{34}N_4O_5$	482.58
96	Glutaric-bip-k-NH_2	$C_{26}H_{34}N_4O_5$	482.58

[0176] The abbreviations used for the D-enantiomers of the genetically encoded amino acids are lower-case equivalents of the one-letter symbols shown in Table 1. For example, "R" designates L-arginine and "r" designates D-arginine.

[0177] Ac denotes acetylated.

[0178] Piv denotes pivolylated.

[0179] 1-Nap & 2-Nap indicate naphthylic acid capped.

[0180] Fmoc denotes an N-terminus modified with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl.

[0181] NA denotes nicotinic acid.

[0182] BIP denotes biphenylalanine.

[0183] Isoxazole denotes 5-methyl-isoxazole-3-carboxylic acid derivative

[0184] If the peptide is composed entirely of gene-encoded amino acids, or a portion of it is so composed, the peptide or the relevant portion may also be synthesized using conventional recombinant genetic engineering techniques.

[0185] For recombinant production, a polynucleotide sequence encoding the peptide is inserted into an appropriate expression vehicle, i.e., a vector which contains the necessary elements for the transcription and translation of the inserted coding sequence, or in the case of an RNA viral vector, the necessary elements for replication and translation. The expression vehicle is then transfected into a suitable target cell which will express the

peptide. Depending on the expression system used, the expressed peptide is then isolated by procedures well-established in the art. Methods for recombinant protein and peptide production are well known in the art (see, e.g., Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.; and Ausubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. each of which is incorporated by reference herein in its entirety.)

[0186] To increase efficiency of production, the polynucleotide can be designed to encode multiple units of the peptide separated by enzymatic cleavage sites—either homopolymers (repeating peptide units) or heteropolymers (different peptides strung together) can be engineered in this way. The resulting polypeptide can be cleaved (e.g., by treatment with the appropriate enzyme) in order to recover the peptide units. This can increase the yield of peptides driven by a single promoter. In a preferred embodiment, a polycistronic polynucleotide can be designed so that a single mRNA is transcribed which encodes multiple peptides (i.e., homopolymers or heteropolymers) each coding region operatively linked to a cap-independent translation control sequence; e.g., an internal ribosome entry site (IRES). When used in appropriate viral expression systems, the translation of each peptide encoded by the mRNA is directed internally in the transcript; e.g., by the IRES. Thus, the polycistronic construct directs the transcription of a single, large polycistronic mRNA which, in turn, directs the translation of multiple, individual peptides. This approach eliminates the production and enzymatic processing of polyproteins and may significantly increase yield of peptide driven by a single promoter.

[0187] A variety of host-expression vector systems may be utilized to express the peptides described herein. These include, but are not limited to, microorganisms such as bacteria transformed with recombinant bacteriophage DNA or plasmid DNA expression vectors containing an appropriate coding sequence; yeast or filamentous fungi transformed with recombinant yeast or fungi expression vectors containing an appropriate coding sequence; insect cell systems infected with recombinant virus expression vectors (e.g., baculovirus) containing an appropriate coding sequence; plant cell systems infected with recombinant virus expression vectors (e.g., cauliflower mosaic virus or tobacco mosaic virus) or transformed with recombinant plasmid expression vectors (e.g., Ti plasmid) containing an appropriate coding sequence; or animal cell systems.

[0188] The expression elements of the expression systems vary in their strength and specificities. Depending on the host/vector system utilized, any of a number of suitable transcription and translation elements, including constitutive and inducible promoters, may be used in the expression vector. For example, when cloning in bacterial systems, inducible promoters such as pL of bacteriophage λ, plac, ptrp, ptac (ptrp-lac hybrid promoter) and the like may be used; when cloning in insect cell systems, promoters such as the baculovirus polyhedron promoter may be used; when cloning in plant cell systems, promoters derived from the genome of plant cells (e.g., heat shock promoters; the promoter for the small subunit of RUBISCO; the promoter for the chlorophyll a/b binding protein) or from plant viruses (e.g., the 35S RNA promoter of CaMV; the coat protein promoter of TMV) may be used; when cloning in mammalian cell systems, promoters derived from the genome of mammalian cells (e.g., metallothionein promoter) or from mammalian viruses (e.g., the adenovirus late promoter; the vaccinia virus 7.5 K promoter) may be used; when generating cell lines that contain multiple copies of expression product, SV40-, BPV- and EBV-based vectors may be used with an appropriate selectable marker.

[0189] In cases where plant expression vectors are used, the expression of sequences encoding the peptides of the invention may be driven by any of a number of promoters. For example, viral promoters such as the 35S RNA and 19S RNA promoters of CaMV (Brisson et al., 1984, *Nature* 310:511-514), or the coat protein promoter of TMV (Takamatsu et al., 1987, *EMBO J.* 6:307-311) may be used; alternatively, plant promoters such as the small subunit of RUBISCO (Coruzzi et al., 1984, *EMBO J.* 3:1671-1680; Broglie et al., 1984, *Science* 224:838-843) or heat shock promoters, e.g., soybean hsp17.5-E or hsp17.3-B (Gurley et al., 1986, *Mol. Cell. Biol.* 6:559-565) may be used. These constructs can be introduced into plant cells using Ti plasmids, Ri plasmids, plant virus vectors, direct DNA transformation, microinjection, electroporation, etc. For reviews of such techniques see, e.g., Weissbach & Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Section VIII, pp. 421-463; and Grierson & Corey, 1988, *Plant Molecular Biology*, 2d Ed., Blackie, London, Ch. 7-9.

[0190] In one insect expression system that may be used to produce the peptides of the invention, Autographa californica, nuclear polyhidrosis virus (AcNPV) is used as a vector to express the foreign genes. The virus grows in *Spodoptera frugiperda* cells. A coding sequence may be cloned into non-essential regions (for example the polyhedron

gene) of the virus and placed under control of an AcNPV promoter (for example, the polyhedron promoter). Successful insertion of a coding sequence will result in inactivation of the polyhedron gene and production of non-occluded recombinant virus (i.e., virus lacking the proteinaceous coat coded for by the polyhedron gene). These recombinant viruses are then used to infect Spodoptera frugiperda cells in which the inserted gene is expressed (e.g., see Smith et al., 1983, *J. Virol.* 46:584; Smith, U.S. Patent No. 4,215,051). Further examples of this expression system may be found in *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, Ausubel et al., eds., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience.

[0191] In mammalian host cells, a number of viral based expression systems may be utilized. In cases where an adenovirus is used as an expression vector, a coding sequence may be ligated to an adenovirus transcription/translation control complex, e.g., the late promoter and tripartite leader sequence. This chimeric gene may then be inserted in the adenovirus genome by in vitro or in vivo recombination. Insertion in a non-essential region of the viral genome (e.g., region E1 or E3) will result in a recombinant virus that is viable and capable of expressing peptide in infected hosts. (e.g., See Logan & Shenk, 1984, *PNAS* USA 81:3655-3659). Alternatively, the vaccinia 7.5 K promoter may be used, (see, e.g., Mackett et al., 1982, *PNAS* USA 79:7415-7419; Mackett et al., 1984, J. Virol. 49:857-864; Panicali et al., 1982, *PNAS* USA 79:4927-4931).

[0192] Other expression systems for producing the peptides of the invention will be apparent to those having skill in the art.

Purification of Peptides

[0193] The peptides of the invention can be purified by art-known techniques such as reverse phase high performance liquid chromatography (e.g., the crude peptides synthesized by solid-phase synthesis methods with N^{α}-Fmoc chemistry, described above were purified by reverse phase HPLC using preparative C-18 column), ion exchange chromatography, gel electrophoresis, affinity chromatography and the like. The actual conditions used to purify a particular peptide will depend, in part, on synthesis strategy and on factors such as net charge, hydrophobicity, hydrophilicity, etc., and will be apparent to those having skill in the art. Multimeric branched peptides can be purified, e.g., by ion exchange or size exclusion chromatography.

[0194] For affinity chromatography purification, any antibody which specifically binds the peptide may be used. For the production of antibodies, various host animals, including but not limited to rabbits, mice, rats, etc., may be immunized by injection with a peptide. The peptide may be attached to a suitable carrier, such as BSA, by means of a side chain functional group or linkers attached to a side chain functional group. Various adjuvants may be used to increase the immunological response, depending on the host species, including but not limited to Freund's (complete and incomplete), mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, dinitrophenol, and potentially useful human adjuvants such as BCG (bacilli Calmette-Guerin) and *Corynebacterium parvum*.

[0195] Monoclonal antibodies to a peptide may be prepared using any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These include but are not limited to the hybridoma technique originally described by Kohler and Milstein, 1975, *Nature* 256:495-497, or Kaprowski, U.S. Pat. No. 4,376,110 which is incorporated by reference herein; the human B-cell hybridoma technique) Kosbor et al., 1983, *Immunology Today* 4:72; Cote et al., 1983, *PNAS* USA 80:2026-2030); and the EBV-hybridoma technique (Cole et al., 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies" Morrison et al., 1984, *PNAS* USA 81:6851-6855; Neuberger et al., 1984, *Nature* 312:604-608; Takeda et al., 1985, *Nature* 314:452-454, Boss, U.S. Pat. No. 4,816,397; Cabilly, U.S. Pat. No. 4,816,567; which are incorporated by reference herein) by splicing the genes from a mouse antibody molecule of appropriate antigen specificity together with genes from a human antibody molecule of appropriate biological activity can be used. Or "humanized" antibodies can be prepared (see, e.g., Queen, U.S. Pat. No. 5,585,089 which is incorporated by reference herein). Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies (U.S. Pat. No. 4,946,778) can be adapted to produce peptide-specific single chain antibodies.

[0196] Antibody fragments which contain deletions of specific binding sites may be generated by known techniques. For example, such fragments include but are not limited to $F(ab')_2$ fragments, which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule and Fab fragments, which can be generated by reducing the disulfide bridges of

the $F(ab')_2$ fragments. Alternatively, Fab expression libraries may be constructed (Huse et al., 1989, *Science* 246:1275-1281) to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity for the peptide of interest.

[0197] The antibody or antibody fragment specific for the desired peptide can be attached, for example, to agarose, and the antibody-agarose complex is used in immunochromatography to purify peptides of the invention. See, Scopes, 1984, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag New York, Inc., NY, Livingstone, 1974, *Methods In Enzymology: Immunoaffinity Chromatography of Proteins* 34:723-731.

Pharmaceutical Formulations and Methods of Treatment

[0198] The mediators of RCT of the invention can be used to treat any disorder in animals, especially mammals including humans, for which lowering serum cholesterol is beneficial, including without limitation conditions in which increasing serum HDL concentration, activating LCAT, and promoting cholesterol efflux and RCT is beneficial. Such conditions include, but are not limited to hyperlipidemia, and especially hypercholesterolemia, and cardiovascular disease such as atherosclerosis (including treatment and prevention of atherosclerosis) and coronary artery disease; restenosis (e.g., preventing or treating atherosclerotic plaques which develop as a consequence of medical procedures such as balloon angioplasty); and other disorders, such as ischemia, and endotoxemia, which often results in septic shock.

[0199] The mediators of RCT can be used alone or in combination therapy with other drugs used to treat the foregoing conditions. Such therapies include, but are not limited to simultaneous or sequential administration of the drugs involved.

[0200] For example, in the treatment of hypercholesterolemia or atherosclerosis, the formulations of molecular mediators of RCT can be administered with any one or more of the cholesterol lowering therapies currently in use; e.g., bile-acid resins, niacin, and/or statins. Such a combined treatment regimen may produce particularly beneficial therapeutic effects since each drug acts on a different target in cholesterol synthesis and transport; i.e., bile-acid resins affect cholesterol recycling, the chylomicron and LDL population; niacin primarily affects the VLDL and LDL population; the statins inhibit cholesterol synthesis, decreasing the LDL population (and perhaps increasing LDL receptor expression); whereas the mediators of RCT affect RCT, increase HDL, increase LCAT activity and promote cholesterol efflux.

[0201] The mediators of RCT may be used in conjunction with fibrates to treat hyperlipidemia, hypercholesterolemia and/or cardiovascular disease such as atherosclerosis.

[0202] The mediators of RCT of the invention can be used in combination with the anti-microbials and anti-inflammatory agents currently used to treat septic shock induced by endotoxin.

[0203] The mediators of RCT of the invention can be formulated as peptide-based compositions or as peptide-lipid complexes which can be administered to subjects in a variety of ways, preferrably via oral administration, to deliver the mediators of RCT to the circulation. Exemplary formulations and treatment regimens are described below.

[0204] In another preferred embodiment of the present invention, methods are provided for ameliorating and/or preventing one or more symptoms of hypercholesterolemia and/or atherosclerosis. The methods preferably involve administering to an organism, preferably a mammal, more preferably a human one or more of the peptides of this invention (or mimetics of such peptides). The peptide(s) can be administered, as described herein, according to any of a number of standard methods including, but not limited to injection, suppository, nasal spray, time-release implant, transdermal patch, and the like. In one particularly preferred embodiment, the peptide(s) are administered orally (e.g. as a syrup, capsule, or tablet).

[0205] The methods involve the administration of a single polypeptide of this invention or the administration of two or more different polypeptides. The polypeptides can be provided as monomers or in dimeric, oligomeric or polymeric forms. In certain embodiments, the multimeric forms may comprise associated monomers (e.g. ionically or hydrophobically linked) while certain other multimeric forms comprise covalently linked monomers (directly linked or through a linker).

[0206] While the invention is described with respect to use in humans, it is also suitable for animal, e.g. veterinary use. Thus preferred organisms include, but are not limited to humans, non-human primates, canines, equines, felines, porcines, ungulates, largomorphs, and the like.

[0207] The methods of this invention are not limited to humans or non-human animals showing one or more symptom(s) of hypercholesterolemia and/or atherosclerosis (e.g., hypertension, plaque formation and rupture, reduction in clinical events such as heart attack, angina, or stroke, high levels of low density lipoprotein, high levels of very low

density lipoprotein, or inflammatory proteins, etc.), but are useful in a prophylactic context. Thus, the peptides of this invention (or mimetics thereof) may be administered to organisms to prevent the onset/development of one or more symptoms of hypercholesterolemia and/or atherosclerosis. Particularly preferred subjects in this context are subjects showing one or more risk factors for atherosclerosis (e.g., family history, hypertension, obesity, high alcohol consumption, smoking, high blood cholesterol, high blood triglycerides, elevated blood LDL, VLDL, IDL, or low HDL, diabetes, or a family history of diabetes, high blood lipids, heart attack, angina or stroke, etc.).

[0208] In one preferred embodiment, the peptide mediators of RCT can be synthesized or manufactured using any technique described in earlier sections pertaining to synthesis and purification of the mediators of RCT. Stable preparations which have a long shelf life may be made by lyophilizing the peptides—either to prepare bulk for reformulation, or to prepare individual aliquots or dosage units which can be reconstituted by rehydration with sterile water or an appropriate sterile buffered solution prior to administration to a subject.

[0209] In another preferred embodiment, the mediators of RCT may be formulated and administered in a peptide-lipid complex. This approach has some advantages since the complex should have an increased half-life in the circulation, particularly when the complex has a similar size and density to HDL, and especially the pre-β-1 or pre-β-2 HDL populations. The peptide-lipid complexes can conveniently be prepared by any of a number of methods described below. Stable preparations having a long shelf life may be made by lyophilization—the co-lyophilization procedure described below being the preferred approach. The lyophilized peptide-lipid complexes can be used to prepare bulk for pharmaceutical reformulation, or to prepare individual aliquots or dosage units which can be reconstituted by rehydration with sterile water or an appropriate buffered solution prior to administration to a subject.

[0210] A variety of methods well known to those skilled in the art can be used to prepare the peptide-lipid vesicles or complexes. To this end, a number of available techniques for preparing liposomes or proteoliposomes may be used. For example, the peptide can be cosonicated (using a bath or probe sonicator) with appropriate lipids to form complexes. Alternatively the peptide can be combined with preformed lipid vesicles resulting in the spontaneous formation of peptide-lipid complexes. In yet another

alternative, the peptide-lipid complexes can be formed by a detergent dialysis method; e.g., a mixture of the peptide, lipid and detergent is dialyzed to remove the detergent and reconstitute or form peptide-lipid complexes (e.g., see Jonas et al., 1986, *Methods in Enzymol.* 128:553-582).

[0211] While the foregoing approaches are feasible, each method presents its own peculiar production problems in terms of cost, yield, reproducibility and safety. In accordance with one preferred method, the peptide and lipid are combined in a solvent system which co-solubilizes each ingredient and can be completely removed by lyophilization. To this end, solvent pairs should be carefully selected to ensure co-solubility of both the amphipathic peptide and the lipid. In one embodiment, the protein(s), peptide(s) or derivatives/analogs thereof, to be incorporated into the particles can be dissolved in an aqueous or organic solvent or mixture of solvents (solvent 1). The (phospho)lipid component is dissolved in an aqueous or organic solvent or mixture of solvents (solvent 2) which is miscible with solvent 1, and the two solutions are mixed. Alternatively, the peptide and lipid can be incorporated into a co-solvent system; i.e., a mixture of the miscible solvents. A suitable proportion of peptide (protein) to lipids is first determined empirically so that the resulting complexes possess the appropriate physical and chemical properties; i.e., usually (but not necessarily) similar in size to HDL. The resulting mixture is frozen and lyophilized to dryness. Sometimes an additional solvent must be added to the mixture to facilitate lyophilization. This lyophilized product can be stored for long periods and will remain stable.

[0212] The lyophilized product can be reconstituted in order to obtain a solution or suspension of the peptide-lipid complex. To this end, the lyophilized powder may be rehydrated with an aqueous solution to a suitable volume (often 5 mgs peptide/ml which is convenient for intravenous injection). In a preferred embodiment the lyophilized powder is rehydrated with phosphate buffered saline or a physiological saline solution. The mixture may have to be agitated or vortexed to facilitate rehydration, and in most cases, the reconstitution step should be conducted at a temperature equal to or greater than the phase transition temperature of the lipid component of the complexes. Within minutes, a clear preparation of reconstituted lipid-protein complexes results.

[0213] An aliquot of the resulting reconstituted preparation can be characterized to confirm that the complexes in the preparation have the desired size distribution; e.g., the

size distribution of HDL. Gel filtration chromatography can be used to this end. For example, a Pharmacia Superose 6 FPLC gel filtration chromatography system can be used. The buffer used contains 150 mM NaCl in 50 mM phosphate buffer, pH 7.4. A typical sample volume is 20 to 200 microliters of complexes containing 5 mgs peptide/ml. The column flow rate is 0.5 mls/min. A series of proteins of known molecular weight and Stokes' diameter as well as human HDL are preferably used as standards to calibrate the column. The proteins and lipoprotein complexes are monitored by absorbance or scattering of light of wavelength 254 or 280 nm.

[0214] The mediators of RCT of the invention can be complexed with a variety of lipids, including saturated, unsaturated, natural and synthetic lipids and/or phospholipids. Suitable lipids include, but are not limited to, small alkyl chain phospholipids, egg phosphatidylcholine, soybean phosphatidylcholine, dipalmitoylphosphatidylcholine, dimyristoylphosphatidylcholine, distearoylphosphatidylcholine 1-myristoyl-2-palmitoylphosphatidylcholine, 1-palmitoyl-2-myristoylphosphatidylcholine, 1-palmitoyl-2-stearoylphosphatidylcholine, 1-stearoyl-2-palmitoylphosphatidylcholine, dioleoylphosphatidylcholine dioleophosphatidylethanolamine, dilauroylphosphatidylglycerol phosphatidylcholine, phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol, sphingomyelin, sphingolipids, phosphatidylglycerol, diphosphatidylglycerol, dimyristoylphosphatidylglycerol, dipalmitoylphosphatidylglycerol, distearoylphosphatidylglycerol, dioleoylphosphatidylglycerol, dimyristoylphosphatidic acid, dipalmitoylphosphatidic acid, dimyristoylphosphatidylethanolamine, dipalmitoylphosphatidylethanolamine, dimyristoylphosphatidylserine, dipalmitoylphosphatidylserine, brain phosphatidylserine, brain sphingomyelin, dipalmitoylsphingomyelin, distearoylsphingomyelin, phosphatidic acid, galactocerebroside, gangliosides, cerebrosides, dilauroylphosphatidylcholine, (1,3)-D-mannosyl-(1,3)diglyceride, aminophenylglycoside, 3-cholesteryl-6'-(glycosylthio)hexyl ether glycolipids, and cholesterol and its derivatives.

[0215] The pharmaceutical formulation of the invention contain the peptide mediators of RCT or the peptide-lipid complex as the active ingredient in a pharmaceutically acceptable carrier suitable for administration and delivery *in vivo*. As the peptides may contain acidic and/or basic termini and/or side chains, the peptides can be

included in the formulations in either the form of free acids or bases, or in the form of pharmaceutically acceptable salts.

[0216] Injectable preparations include sterile suspensions, solutions or emulsions of the active ingredient in aqueous or oily vehicles. The compositions may also contain formulating agents, such as suspending, stabilizing and/or dispersing agent. The formulations for injection may be presented in unit dosage form, e.g., in ampules or in multidose containers, and may contain added preservatives.

[0217] Alternatively, the injectable formulation may be provided in powder form for reconstitution with a suitable vehicle, including but not limited to sterile pyrogen free water, buffer, dextrose solution, etc., before use. To this end, the mediators of RCT may be lyophilized, or the co-lyophilized peptide-lipid complex may be prepared. The stored preparations can be supplied in unit dosage forms and reconstituted prior to use in vivo.

[0218] For prolonged delivery, the active ingredient can be formulated as a depot preparation, for administration by implantation; e.g., subcutaneous, intradermal, or intramuscular injection. Thus, for example, the active ingredient may be formulated with suitable polymeric or hydrophobic materials (e.g., as an emulsion in an acceptable oil) or ion exchange resins, or as sparingly soluble derivatives; e.g., as a sparingly soluble salt form of the mediators of RCT.

[0219] Alternatively, transdermal delivery systems manufactured as an adhesive disc or patch which slowly releases the active ingredient for percutaneous absorption may be used. To this end, permeation enhancers may be used to facilitate transdermal penetration of the active ingredient. A particular benefit may be achieved by incorporating the mediators of RCT of the invention or the peptide-lipid complex into a nitroglycerin patch for use in patients with ischemic heart disease and hypercholesterolemia.

[0220] For oral administration, the pharmaceutical compositions may take the form of, for example, tablets or capsules prepared by conventional means with pharmaceutically acceptable excipients such as binding agents (e.g., pregelatinised maize starch, polyvinylpyrrolidone or hydroxypropyl methylcellulose); fillers (e.g., lactose, microcrystalline cellulose or calcium hydrogen phosphate); lubricants (e.g., magnesium stearate, talc or silica); disintegrants (e.g., potato starch or sodium starch glycolate); or wetting agents (e.g., sodium lauryl sulfate). The tablets may be coated by methods well

known in the art. Liquid preparations for oral administration may take the form of, for example, solutions, syrups or suspensions, or they may be presented as a dry product for constitution with water or other suitable vehicle before use. Such liquid preparations may be prepared by conventional means with pharmaceutically acceptable additives such as suspending agents (e.g., sorbitol syrup, cellulose derivatives or hydrogenated edible fats); emulsifying agents (e.g., lecithin or acacia); non-aqueous vehicles (e.g., almond oil, oily esters, ethyl alcohol or fractionated vegetable oils); and preservatives (e.g., methyl or propyl-p-hydroxybenzoates or sorbic acid). The preparations may also contain buffer salts, flavoring, coloring and sweetening agents as appropriate. Preparations for oral administration may be suitably formulated to give controlled release of the active compound.

[0221] For buccal administration, the compositions may take the form of tablets or lozenges formulated in conventional manner. For rectal and vaginal routes of administration, the active ingredient may be formulated as solutions (for retention enemas) suppositories or ointments.

[0222] For administration by inhalation, the active ingredient can be conveniently delivered in the form of an aerosol spray presentation from pressurized packs or a nebulizer, with the use of a suitable propellant, e.g., dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, dichlorotetrafluoroethane, carbon dioxide or other suitable gas. In the case of a pressurized aerosol the dosage unit may be determined by providing a valve to deliver a metered amount. Capsules and cartridges of e.g. gelatin for use in an inhaler or insufflator may be formulated containing a powder mix of the compound and a suitable powder base such as lactose or starch.

[0223] The compositions may, if desired, be presented in a pack or dispenser device which may contain one or more unit dosage forms containing the active ingredient. The pack may for example comprise metal or plastic foil, such as a blister pack. The pack or dispenser device may be accompanied by instructions for administration.

[0224] The peptide mediators of RCT and/or peptide-lipid complexes of the invention may be administered by any suitable route that ensures bioavailability in the circulation. This can be achieved by parenteral routes of administration, including intravenous (IV), intramuscular (IM), intradermal, subcutaneous (SC) and intraperitoneal (IP) injections. However, other routes of administration may be used. For example,

absorption through the gastrointestinal tract can be accomplished by oral routes of administration (including but not limited to ingestion, buccal and sublingual routes) provided appropriate formulations (e.g., enteric coatings) are used to avoid or minimize degradation of the active ingredient, e.g., in the harsh environments of the oral mucosa, stomach and/or small intestine. Oral administration has the advantage of easy of use and therefore enhanced compliance. Alternatively, administration via mucosal tissue such as vaginal and rectal modes of administration may be utilized to avoid or minimize degradation in the gastrointestinal tract. In yet another alternative, the formulations of the invention can be administered transcutaneously (e.g., transdermally), or by inhalation. It will be appreciated that the preferred route may vary with the condition, age and compliance of the recipient.

[0225] The actual dose of peptide mediators of RCT or peptide-lipid complex used will vary with the route of administration, and should be adjusted to achieve circulating plasma concentrations of 1.0 mg/l to 2 g/l. Data obtained in animal model systems described herein show that the ApoA-I agonists of the invention associate with the HDL component, and have a projected half-life in humans of about five days. Thus, in one embodiment, the mediators of RCT can be administered by injection at a dose between 0.5 mg/kg to 100 mg/kg once a week. In another embodiment, desirable serum levels may be maintained by continuous infusion or by intermittent infusion providing about 0.1 mg/kg/hr to 100 mg/kg/hr.

[0226] Toxicity and therapeutic efficacy of the various mediators of RCT can be determined using standard pharmaceutical procedures in cell culture or experimental animals for determining the LD_{50} (the dose lethal to 50% of the population) and the ED_{50} (the dose therapeutically effective in 50% of the population). The dose ratio between toxic and therapeutic effects is the therapeutic index and it can be expressed as the ratio LD_{50} /ED_{50}. ApoA-I peptide agonists which exhibit large therapeutic indices are preferred.

Other Uses

[0227] The mediators of RCT agonists of the invention can be used in assays in vitro to measure serum HDL, e.g., for diagnostic purposes. Because the mediators of RCT associate with the HDL and LDL component of serum, the agonists can be used as "markers" for the HDL and LDL population. Moreover, the agonists can be used as markers for the subpopulation of HDL that are effective in RCT. To this end, the agonist

can be added to or mixed with a patient serum sample; after an appropriate incubation time, the HDL component can be assayed by detecting the incorporated mediators of RCT. This can be accomplished using labeled agonist (e.g., radiolabels, fluorescent labels, enzyme labels, dyes, etc.), or by immunoassays using antibodies (or antibody fragments) specific for the agonist.

[0228] Alternatively, labeled agonist can be used in imaging procedures (e.g., CAT scans, MRI scans) to visualize the circulatory system, or to monitor RCT, or to visualize accumulation of HDL at fatty streaks, atherosclerotic lesions, etc. (where the HDL should be active in cholesterol efflux).

Assays For Analysis of Mediators of Reverse Cholesterol Transport

LCAT Activation Assay

[0229] The mediators of RCT in accordance with preferred embodiments of the present invention can be evaluated for potential clinical efficacy by various *in vitro* assays, for example, by their ability to activate LCAT *in vitro*. In the LCAT assay, substrate vesicles (small unilamellar vesicles or "SUVs") composed of egg phophatidylcholine (EPC) or 1-palmitoyl-2-oleyl-phosphatidyl-choline (POPC) and radiolabelled cholesterol are preincubated with equivalent masses either of peptide or ApoA-I (isolated from human plasma). The reaction is initiated by addition of LCAT (purified from human plasma). Native ApoA-I, which was used as positive control, represents 100% activation activity. "Specific activity" (i.e., units of activity (LCAT activation)/unit of mass) of the molecular mediators can be calculated as the concentration of mediator that achieves maximum LCAT activation. For example, a series of concentrations of the peptide (e.g., a limiting dilution) can be assayed to determine the "specific activity" for the peptide--the concentration which achieves maximal LCAT activation (i.e., percentage conversion of cholesterol to cholesterol ester) at a specific timepoint in the assay (e.g., 1 hr.). When plotting percentage conversion of cholesterol at, e.g., 1 hr., against the concentration of peptide used, the "specific activity" can be identified as the concentration of peptide that achieves a plateau on the plotted curve.

Preparation of Substrate Vesicles

[0230] The vesicles used in the LCAT assay are SUVs composed of egg phosphatidylcholine (EPC) or 1-palmitoyl-2-oleyl-phosphatidylcholine (POPC) and cholesterol with a molar ratio of 20:1. To prepare a vesicle stock solution sufficient for 40

assays, 7.7 mg HPC (or 7.6 mg POPC; 10 μmol), 78 μg (0.2 μmol) 4-^{14} C-cholesterol, 116 μg cholesterol (0.3 μmol) are dissolved in 5 ml xylene and lyophilized. Thereafter 4 ml of assay buffer is added to the dry powder and sonicated under nitrogen atmosphere at 4°C. Sonication conditions: Branson 250 sonicator, 10 mm tip, 6×5 minutes; Assay buffer: 10 mM Tris, 0.14 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4. The sonicated mixture is centrifuged 6 times for 5 minutes each time at 14,000 rpm (16,000×g) to remove titanium particles. The resulting clear solution is used for the enzyme assay.

Purification of LCAT

[0231] For the LCAT purification, dextran sulfate/Mg^{2+} treatment of human plasma is used to obtain lipoprotein deficient serum (LPDS), which is sequentially chromatographed on Phenylsepharose, Affigelblue, ConcanavalinA sepharose and anti-ApoA-I affinity chromatography.

Preparation of LPDS

[0232] To prepare LPDS, 500 ml plasma is added to 50 ml dextran sulfate (MW=500,000) solution. Stir 20 minutes. Centrifuge for 30 minutes at 3000 rpm (16,000×g) at 4°C. Use supernatant (LPDS) for further purification (ca. 500 ml).

Phenylsepharose Chromatography

[0233] The following materials and conditions were used for the phenylsepharose chromatography. Solid phase: phenylsepharose fast flow, high subst. grade, Pharmaciacolumn: XK26/40, gel bed height: 33 cm, V = ca, 175 mlflow rates: 200 ml/hr (sample)wash: 200 ml/hr (buffer)elution: 80 ml/hr (distilled water)buffer: 10 mM Tris, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 7.4, 0.01% sodium azide.

[0234] Equilibrate the column in Tris-buffer, add 29 g NaCl to 500 ml LPDS and apply to the column., Wash with several volumes of Tris buffer until the absorption at 280 nm wavelength is approximately at the baseline, then start the elution with distilled water. The fractions containing protein are pooled (pool size: 180 ml) and used for Affigelblue chromatography.

Affigelblue Chromatography

[0235] The phenylsepharose pool is dialyzed overnight at 4°C against 20 mM Tris-HCl, pH7.4, 0.01% sodium azide. The pool volume is reduced by ultrafiltration (Amicon YM30) to 50-60 ml and loaded on an Affigelblue column. Solid phase: Affigelblue, Biorad, 153-7301 column, XK26/20, gel bed height: ca. 13 cm; column

66

volume: approx. 70 ml. Flow rates: loading: 15 ml/h wash: 50 ml/h. Equilibrate column in Tris-buffer. Apply phenylsepharose pool to column. Start in parallel to collect fractions. Wash with Tris-buffer. The pooled fractions (170 ml) were used for ConA chromatography.

ConA Chromatography

[0236] The Affigelblue pool was reduced via Amicon (YM30) to 30-40 ml and dialyzed against ConA starting buffer (1 mM Tris HCl pH7.4; 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $MnCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 0.01% sodium azide) overnight at 4°C. Solid phase: ConA sepharose (Pharmacia) column: XK26/20, gel bed height: 14 cm (75 ml). Flow rates: loading 40 ml/h washing (with starting buffer): 90 ml/h elution: 50 ml/h, 0.2M Methyl-α-D-mannoside in 1 mM Tris, pH 7.4. The protein fractions of the mannoside elutions were collected (110 ml), and the volume was reduced by ultrafiltration (YM30) to 44 ml. The ConA pool was divided in 2 ml aliquots, which are stored at -20°C.

Anti-ApoA-I Affinity Chromatography

[0237] Anti-ApoA-I affinity chromatography was performed on Affigel-Hz material (Biorad), to which the anti-ApoA-I abs have been coupled covalently. Column: XK16/20, V = 16 ml. The column was equilibrated with PBS pH 7.4. Two ml of the ConA pool was dialyzed for 2 hours against PBS before loading onto the column. Flow rates: loading: 15 ml/hour washing (PBS) 40 ml/hour. The pooled protein fractions (V=14 ml) are used for LCAT assays. The column is regenerated with 0.1 M. Citrate buffer (pH 4.5) to elute bound A-I (100 ml), and immediately after this procedure reequilibrated with PBS.

Pharmacokinetics of the Mediators of RCT

[0238] The following experimental protocols can be used to demonstrate that the mediators of RCT are stable in the circulation and associate with the HDL component of plasma.

Synthesis and/or Radiolabeling of Peptide Agonists

[0239] ^{125}I-Labeled LDL was prepared by the iodine monochloride procedure to a specific activity of 500-900 cpm/ng (Goldstein and Brown 1974 *J. Biol. Chem.* 249:5153-5162). Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts were determined at final specific activities of 500-900 cpm/ng as described (Goldstein and Brown 1974 *J. Biol. Chem.* 249:5153-5162). In every case, >99% radioactivity was

precipitable by incubation of the lipoproteins at 4°C with 10% (wt/vol) trichloroacetic acid (TCA). The Tyr residue was attached to N-Terminus of each peptide to enable its radioiodination. The peptides were radioiodinated with $Na^{125}I$ (ICN), using Iodo-Beads (Pierce Chemicals) and following the manufacturer's protocol, to a specific activity of 800-1000 cpm/ng. After dialysis, the precipitable radioactivity (10% TCA) of the peptides was always >97%.

[0240] Alternatively, radiolabeled peptides could be synthesized by coupling ^{14}C-labeled Fmoc-Pro as the N-terminal amino acid. L-[U-^{14} C]X, specific activity 9.25 GBq/mmol, can be used for the synthesis of labeled agonists containing X. The synthesis may be carried out according to Lapatsanis, *Synthesis*, 1983, 671-173. Briefly, 250 μM (29.6 mg) of unlabeled L-X is dissolved in 225 μl of a 9% Na_2CO_3 solution and added to a solution (9% Na_2CO_3) of 9.25 MBq (250 μM) ^{14}C-labeled L-X. The liquid is cooled down to 0° C, mixed with 600 μM (202 mg) 9-fluorenylmethyl-N-succinimidylcarbonate (Fmoc-OSu) in 0.75 ml DMF and shaken at room temperature for 4 hr. Thereafter, the mixture is extracted with Diethylether (2×5ml) and chloroform (1×5ml), the remaining aqueous phase is acidified with 30% HCl and extracted with chloroform (5×8 ml). The organic phase is dried over Na_2SO_{41} filtered off and the volume is reduced under nitrogen flow to 5 ml. The purity was estimated by TLC ($CHCl_3$:MeOH:Hac, 9:1:0.1 v/v/v, stationary phase HPTLC silicagel 60, Merck, Germany) with UV detection, e.g., radiochemical purity:Linear Analyzer, Berthold, Germany; reaction yields may be approximately 90% (as determined by LSC).

[0241] The chloroform solution containing ^{14}C-peptide X is used directly for peptide synthesis. A peptide resin containing amino acids 2-22, can be synthesized automatically as described above and used for the synthesis. The sequence of the peptide is determined by Edman degradation. The coupling is performed as previously described except that HATU (O-(7-azabenzotriazol-1-yl)1-, 1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphate) is preferably used instead of TBTU. A second coupling with unlabeled Fmoc-L-X is carried out manually.

Pharmacokinetics in Mice

[0242] In each experiment, 300 – 500 μg/kg (0.3 – 0.5 mg/kg) [or more such as 2.5 mg/k] radiolabeled peptide may be injected intraperitoneally into mice which were fed normal mouse chow or the atherogenic Thomas-Harcroft modified diet (resulting in

severely elevated VLDL and IDL cholesterol). Blood samples are taken at multiple time intervals for assessment of radioactivity in plasma.

Stability in Human Serum

[0243] 100 μg of labeled peptide may be mixed with 2 ml of fresh human plasma (at 37°C) and delipidated either immediately (control sample) or after 8 days of incubation at 37°C (test sample). Delipidation is carried out by extracting the lipids with an equal volume of 2:1 (v/v) chloroform:methanol. The samples are loaded onto a reverse-phase C_{18} HPLC column and eluted with a linear gradient (25-58% over 33 min) of acetonitrile (containing 0.1% w TFA). Elution profiles are followed by absorbance (220 nm) and radioactivity.

Formation of Pre-β Like Particles

[0244] Human HDL may be isolated by KBr density ultra centrifugation at density d = 1.21 g/ml to obtain top fraction followed by Superose 6 gel filtration chromatography to separate HDL from other lipoproteins. Isolated HDL is adjusted to a final concentration of 1.0 mg/ml with physiological saline based on protein content determined by Bradford protein assay. An aliquot of 300 μl is removed from the isolated HDL preparation and incubated with 100 μl labeled peptide (0.2-1.0 μg/μl) for two hours at 37°C. Multiple separate incubations are analyzed including a blank containing 100 μl physiological saline and four dilutions of labeled peptide. For example: (i) 0.20 μg/μl peptide:HDL ratio = 1:15; (ii) 0.30 μg/μl peptide:HDL ratio = 1:10; (iii) 0.60 μg/μl peptide:HDL ratio = 1:5; and (iv) 1.00 μg/μl peptide:HDL ratio = 1:3. Following the two hour incubation, a 200 μl aliquot of the sample (total volume = 400 μl) is loaded onto a Superose 6 gel filtration column for lipoprotein separation and analysis and 100 μl is used to determine total radioactivity loaded.

Association of Mediators With Human Lipoproteins

[0245] The association of peptide mediators with human lipoprotein fractions can be determined by incubating labeled peptide with each lipoprotein class (HDL, LDL and VLDL) and a mixture of the different lipoprotein classes. HDL, LDL and VLDL are isolated by KBr density gradient ultracentrifugation at d = 1.21 g/ml and purified by FPLC on a Superose 6B column size exclusion column (chromatography is carried out with a flow rate of 0.7 ml/min and a running buffer of 1 mM Tris (pH 8), 115 mM NaCl, 2 mM EDTA and 0.0% NaN_3). Labeled peptide is incubated with HDL, LDL and VLDL at a

peptide:phospholipid ratio of 1:5 (mass ratio) for 2 h at 37° C. The required amount of lipoprotein (volumes based on amount needed to yield 1000 μg) is mixed with 0.2 ml of peptide stock solution (1 mg/ml) and the solution is brought up to 2.2 ml using 0.9% of NaCl.

[0246] After incubating for 2 hr at 37°C, an aliquot (0.1 ml) is removed for determination of the total radioactivity (e.g., by liquid scintilation counting or gamma counting depending on labeling isotope), the density of the remaining incubation mixture is adjusted to 1.21 g/ml with KBr, and the samples centrifuged at 100,000 rpm (300,000 g) for 24 hours at 4° C in a TLA 100.3 rotor using a Beckman tabletop ultracentrifuge. The resulting supernatant is fractionated by removing 0.3 ml aliquots from the top of each sample for a total of 5 fractions, and 0.05 ml of each fraction is used for counting. The top two fractions contain the floating lipoproteins, the other fractions (3-5) correspond to proteins/peptides in solution.

Selective Binding to HDL Lipids

[0247] Human plasma (2 ml) is incubated with 20; 40, 60, 80, and 100 μg of labeled peptide peptide for 2 hr at 37°C. The lipoproteins are separated by adjusting the density to 1.21 g/ml and centrifugation in TLA 100.3 rotor at 100,000 rpm (300,000 g) for 36 hr at 4° C. The top 900 μl (in 300 μl fractions) is taken for the analysis. 50 μl from each 300 μl fraction is counted for radioactivity and 200 μl from each fraction is analyzed by FPLC (Superose 6/Superose 12 combination column).

Use of the Mediators of Reverse Cholesterol Transport in Animal Model Systems

[0248] The efficacy of the mediators of RCT of the invention can be demonstrated in rabbits or other suitable animal models.

Preparation of the Phospholipid/Peptide Complexes

[0249] Small discoidal particles consisting of phospholipid (DPPC) and peptide are prepared following the cholate dialysis method. The phospholipid is dissolved in chloroform and dried under a stream of nitrogen. The peptide is dissolved in buffer (saline) at a concentration of 1-2 mg/ml. The lipid film is redissolved in buffer containing cholate (43°C) and the peptide solution is added at a 3:1 phospholipid/peptide weight ratio. The mixture is incubated overnight at 43° C and dialyzed at 43°C (24 hr), room temperature (24 hr) and 4°C (24 hr), with three changes of buffer (large volumes) at temperature point. The complexes may be filter sterilized (0.22 μm) for injection and storage at 4°C.

Isolation and Characterization of the Peptide/Phospholipid Particles

[0250] The particles may be separated on a gel filtration column (Superose 6 HR). The position of the peak containing the particles is identified by measuring the phospholipid concentration in each fraction. From the elution volume, the Stokes radius can be determined. The concentration of peptide in the complex is determined by measuring the phenylalanine content (by HPLC) following a 16 hr acid hydrolysis.

Injection in the Rabbit

[0251] Male New Zealand White rabbits (2.5-3 kg) are injected intravenously with a dose of phospholipid/peptide complex (5 or 10 mg/kg bodyweight, expressed as peptide) in a single bolus injection not exceeding 10-15 ml. The animals are slightly sedated before the manipulations. Blood samples (collected on EDTA) are taken before and 5, 15, 30, 60, 240 and 1440 minutes after injection. The hematocrit (Hct) is determined for each sample. Samples are aliquoted and stored at -20°C before analysis.

Analysis of the Rabbit Sera

[0252] The total plasma cholesterol, plasma triglycerides and plasma phospholipids are determined enzymatically using commercially available assays, for example, according to the manufacturer's protocols (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany and Biomerieux, 69280, Marcy-L'etoile, France).

[0253] The plasma lipoprotein profiles of the fractions obtained after the separation of the plasma into its lipoprotein fractions may be determined by spinning in a sucrose density gradient. For example, fractions are collected and the levels of phospholipid and cholesterol can be measured by conventional enzymatic analysis in the fractions corresponding to the VLDL, ILDL, LDL and HDL lipoprotein densities.

Working Examples

[0254] The short-term goal was to identify compound mimics of ApoA-I that function in HDL-mediated cholesterol transport to the liver. The long term goal was to modify the compounds so they can interact with a subset of lipoproteins and target them to the liver and amplify the rate of cholesterol-rich lipoproteins catabolism (reverse cholesterol transport). Unlike the current treatments (resins, statins, fibrates), that regulate cholesterol transport to peripheral tissues, the approach adopted herein involves amplification of RCT rate by increasing of the HDL cholesterol (HDL-C) levels and

catabolism of the cholesterol-rich low density lipoproteins. The rational for this approach is the long acknowledged inverse relationship between rate of RCT and cardiovascular risk.

[0255] *Lipoprotein isolation* – Human plasma lipoproteins were isolated from fresh fasting plasma that was obtain by plasmapheresis from normal donors. LDL (d=1.019-1.063 g/ml) was isolated under strict sterile, endotoxin-free conditions by sequential ultracentrifugation using KBr for density adjustment. It was dialyzed against 0.15 mM NaCl containing 0.3 mM EDTA and probucol, pH 7.4, filter-sterilized, and stored at 4°C.

[0256] *Radioiodination* – ^{125}I-Labeled LDL was prepared by the iodine monochloride procedure at final specific activities of about 500-900 cpm/ng (Goldstein and Brown 1974 *J. Biol. Chem.* 249:5153-5162). Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts were performed at final specific activities of about 500-900 cpm/ng (Goldstein and Brown 1974 *J. Biol. Chem.* 249:5153-5162). In every case, >99% radioactivity was precipitable by incubation of the lipoproteins at 4°C with 10% (wt/vol) trichloroacetic acid (TCA). The Tyr residue was attached to N-Terminus of each peptide to enable its radioiodination. The peptides were radioiodinated with $Na^{125}I$ (ICN), using Iodo-Beads (Pierce Chemicals) and following the manufacturer's protocol, to a specific activity of 800-1000 cpm/ng. After dialysis, the precipitable radioactivity (10% TCA) of the peptides was always >97%.

[0257] *Plasma stability and lipoproteins distribution of peptides* – The LDLR-/- mice used for these studies were males, 2 months old, and were Chow-fed. Blood was drawn from nonfasted mice into heparin-coated tubes, and was subjected to low speed centrifugation at 4°C to obtain the plasma. To measure the plasma stability, 5-6 μg of radioiodinated peptide was added to 0.25 ml of plasma. After incubation at 37°C, aliquots were removed and subjected to precipitation with 10% TCA. To study the association of ApoA-I peptides with lipoproteins and/or other proteins in plasma, 6-8 μg of radioiodinated peptide was incubated for 2 hrs at 37°C with 0.12 ml of mouse plasma. Following incubation, the mixture was separated on 1% agarose gel (Paragon system, Beckman Coulter) according to manufacturer's instructions, and radioactivity was quantified in the bands representing LDL, HDL, and albumin.

[0258] *Tissue distribution of peptides* – 12 μg of radioiodinated peptide was injected intravenously into the tail vein of apo A-1 deficient mice under metofane anesthesia. The mice were sacrificed 40 min after injection, and blood was removed by perfusion with cold PBS via a cannula into the left ventricle. 40 min later mice were bled by retroorbital bleeding into heparinized tubes.

[0259] *Mediator-LDL complexes* – Peptide/lipoprotein complexes were formed by incubation of excess amounts of radiolabeled peptide (SEQ ID NO: 1) for 2 hrs at 25°C with human plasma LDL diluted into PBS at a molar ratio 25:1. The complexes were extensively dialyzed at 4°C to remove free peptide against PBS containing 20 μM of butylated hydroxy toluene (BHT) until counted in dialyzing solution radioactivity was less than 400-600 cpm/ml for at least 2 hrs. Formed complexes were used immediately.

[0260] *Plasma clearance and tissue distribution of SEQ ID NO: 1-LDL complexes* – ^{125}I- LDL (0.2 nmol) was incubated at 37°C in PBS alone, or with 4 nmol of SEQ ID NO: 1. After 2 h, the mixture was dialyzed against PBS containing 20 mM BHT. ^{125}I-LDL alone or SEQ ID NO: 1/^{125}I- LDL complex were injected intravenously into the tail vein of nonfasted mice under metofane anesthesia. Mice were bled at the certain time points after the injection by retroorbital bleeding into heparinized tubes. The blood was subjected to low speed centrifugation (1800 g, 4°C) and the 10% TCA precipitable radioactivity of the plasma was measured. The mice were sacrificed 40 min after injection, and blood and nonspecifically bound radioactivity were removed by perfusion with cold PBS via a cannula into the left ventricle. An incision was made in the interior vena cava to clear the perfusate. Within 15 min, the liver, kidneys, spleen, and heart were removed, cleaned, weighed, and counted for ^{125}I radioactivity. Entire organs were counted with exception of liver, which was counted in pieces. Radioactivity detected per organ or per 1 g of wet tissue was expressed as a percent of the initial total injected radioactivity that was TCA precipitable.

[0261] *Effect of single bolus injections of peptides on plasma lipoprotein profile* – To monitor effect of peptides on plasma cholesterol levels and its distribution among the different lipoprotein classes, the nonradioiodinated free peptides (100 μg in 100 μl of PBS) were injected intravenously into the tail vein of nonfasted C57BL/6J wild type mice, which have been placed on high fat cholate-containing diet four days prior to experiment. To control for the effect of external and/or internal nonspecific factors (stress of handling,

anesthetic, blood drawing) on plasma lipoprotein profile, a similar group of mice was injected with only PBS. Different groups of mice were sacrificed before and at various times after injections and blood was drawn by retroorbital puncture and subjected to low speed centrifugation at 4°C to obtain the plasma. Plasma samples were obtained, combined within each group (4 mice), and subjected to gel filtration chromatography on a Superose 6 (HR 10/30 column, FPLC) to monitor cholesterol lipoproteins distribution and agarose gel electrophoresis (Paragon Systems) to monitor phospholipid lipoproteins distribution.

[0262] *Effect of time-released peptides on plasma lipoprotein profile* – To determine relatively long-term effect of SEQ ID NO: 1 and its derivatives on plasma lipoprotein profile, the Alzet Mini-Osmotic pumps (220µl), containing various peptides or PBS, were surgically inserted in canulated Chow fed C57BL/6J mice. The pumps with flow rate equal to 8 µl/hr were used for 20 hrs continuous infusion of peptides. The pumps with flow rate equal to 1 µl/hr were used for 160 hrs continuous infusions of peptides. At the end point (20 or 160 hrs after pumps insertion) mice were sacrificed, and blood was drawn by retroorbital puncture and subjected to low speed centrifugation at 4°C to obtain the plasma. Bile was immediately removed from gall bladders using insulin syringes, and stored on ice until use.

[0263] *Sample analysis* – Total serum cholesterol and HDL cholesterol were determined using the Infinity colorimetric-enzymatic method (Sigma 401-25P) according to manufacturer's instructions, changing only the suggested 37°C incubation time from 10 to 15 min. To determine HDL cholesterol, low density lipoproteins were precipitated from plasma using a modified Burstein-Samaille method according to manufacturer's instructions (Boehringer Mannheim 543004), modifying only the ratio of reagent:water from 4:1 to 4:2. Gall bladder derived bile was diluted twice with deionized water, and cholesterol was determined using Infinity reagents. 3α-Hydroxybile acids were quantified using a colorimetric-enzymatic method (Sigma 450).

[0264] To monitor cholesterol distribution among the different lipoprotein classes, plasma samples were combined within each group (usually 4-6 mice per group), and subjected to FPLC size-exclusion chromatography on a Superose 6 (HR 10/30 column, Amersham-Pharmacia) using an isocratic 10 mM Tris/150 mM NaCl/1mM EDTA buffer system at a flow rate of 0.15 ml/min. Fractions (0.15 ml) were collected into 96-well plates containing 0.055 ml of 1:1 mixture of 0.5% Triton X-100 and 20 mM Sodium Cholate.

Total and free cholesterol in plasma fractions was determined by using the fluorescent method of W. Gamble, et al. (Gamble et al., 1978, *Journal Lipid Res.*, 16:1068-1070). 96-well plates were read on Dual-Scanning Microplate Spectrofluorometer Gemini XS (Molecular Devices). The areas under the lipoprotein peaks were quantified by using Unicorn software (Version 3.21.02). The amount of esterified cholesterol was assessed by subtraction of free cholesterol from total cholesterol.

[0265] To monitor the distribution of phospholipid among the lipoprotein classes, plasma samples were combined within each group (usually 4-6 mice per group), and subjected to agarose gel electrophoresis, which was carried out using the Paragon system (Beckman Coulter) according to manufacturer's instructions, with following staining with Paragon Lipo Stain (Beckman Coulter 655910). Once dried, the gels were scanned on Personal Densitometer SI (Molecular Dynamics) and bands were quantified using ImageQuant™ software (Version 5.2).

[0266] *Effect of peptides on PLTP activity* – PLTP activity was measured using a fluorescent kit (Cardiovascular Targets, Inc., P7700). PLTP source was serum obtained from C57BL/6J male 2 months old mice, which were Chow-fed or maintained on high fat cholate containing diet for four days. 1X Mouse serum was preincubated with PBS or 0.4, 2, 5, and 10 μg of peptides at RT for 30 minutes. Following preincubation, the mixture was diluted 10 times, and 10 μl (0.8 υl neat serum) was immediately mixed into reaction wells of pre-chilled 96-well plate, containing assay system (Cardiovascular Targets, Inc., P7700). The microplates were read at 37°C in SpectraMax 190 (Molecular Devices), for 30 minutes.

[0267] *LDL mediated cholesterol accumulation in human HepG2 cells* – HepG2 cells were cultured at 37°C in DMEM supplemented with 10% FBS. 24 hrs before the experiment cells were plated in a 24 wells plate at the density of $2.5x10^5$ per well in serum free media (500 μl RPMI supplemented with 1% Nutridoma-HU, Roche, 903454321) to permit up-regulation of LDL-receptors. On the day of experiment, cells were washed twice with PBS, and 25 μg of isolated human LDL (Academy Bio-Medical Co., 20P-L101) preincubated with PBS or peptides for 1 hr at RT was added to the cells in 500 μl of SFM with following incubation at 37°C for 6 hrs. Following incubation, media was removed, cells were washed twice with RT PBS, and total cholesterol was extracted by Hexane-

Isopropanol mixture (3:2), and dried under the Nitrogen gas. The dried samples were solubilized in 160 µl TE buffer (10 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) containing 0.1% Triton X-100 and 4 mM of Sodium Cholate. Total and free cholesterol in the samples were quantified using the fluorescent method of W. Gamble, et al. (Gamble et al., 1978, *Journal Lipid Res.*, 16:1068-1070). The amount of esterified cholesterol was assessed by subtraction of free cholesterol from total cholesterol. The results are shown in *Figure 24*.

[0268] *Ac-LDL mediated cholesterol accumulation in human macrophages* – THP-1 cells were cultured at 370C in RPMI supplemented with 10% FBS. 48 hrs before the loading experiment cells were plated in a 24 wells plate at the density of 1x106 per well in serum free media (500ul RPMI supplemented with 1% Nutridoma-HU, Roche, Lot#: 903454321) in presence of 5x10-8 M PMA. On the day of experiment, PBS or 50ug of human acetylated LDL, (Biomedical technologies Inc. BT-906) pre-incubated with PBS or peptides for 1hr at room temperature were added to the cells. Treated cells were incubated for 24 hr at 37°C in a humidified 5% CO2 incubator. Following incubation, media was removed, cells were washed 2x with 37°C PBS and Hexane-Isopropanol (3:2) mixture was added to the cells to extract cholesterol. 30 min later samples were transfered into glass tubes and dried under the Nitrogen. Formed pellet was solubilized in 160ul of TE buffer (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA) containing o.1% Triton X-100 & 4mM Sodium Cholate. Total and free cholesterol were quantified by using the fluorescent method of W. Gamble, et al (Gamble et al, 1978, Journal Lipid Res., 16:1068-1070). The amount of esterified cholesterol was assessed by subtraction of free cholesterol from total cholesterol. The results are shown in *Figure 25*.

[0269] *Oxidized-LDL mediated cholesterol accumulation in human vascular smooth muscle cells* – vascular smooth muscle cells were cultured at 37°C In SmGm-2 (Cambrex, cc-3182) supplemented with 5% FBS. 24 hrs before the experiment cells were plated in a 24 wells plate at the density of 85,000 per well in 500ul of serum free assay media (SmGM-2 supplemented with 1% Nutridoma-HU, Roche, Lot#: 903454321). On the day of experiment; cells were washed twice with PBS, and 25ug of Oxidized human LDL (Biomedical technologies Inc. BT-906) pre-incubated with PBS or peptides for 1hr at room temperature were added to the cells in 500ul of serum free assay media (SFM). Treated cells were incubated for 24 hr at 370C in a humidified 5% CO2 incubator. Following the

incubation, media was removed, cells were washed 2x with 37°C PBS and cholesterol was extracted by hexane-isopropanol (3:2) mixture. Samples were dried under the nitrogen. Dried samples were solubilized in 160ul of TE buffer (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA) containing 0.1% Triton X-100 and 4mM Sodium Cholate. Total and free cholesterol in the samples were quantified using the fluorescent method described in W. Gamble, et al (Gamble et al, 1978, Journal Lipid Res., 16:1068-1070). The amount of esterified cholesterol was assessed by subtraction of free cholesterol from total cholesterol. The results are shown in ***Figure 26.***

[0270] *Cholesterol efflux from Ac-LDL preloaded human macrophages* – THP-1 cells were cultured at 37°C in RPMI supplemented with 10% FBS, 48 hrs before the loading experiment cells were plated in a 24 wells plate at the density of $1x10^6$ per well in 500 ul of serum free media (RPMI supplemented with 1% Nutridoma-HU, Roche, Lot#: 903454321)) in presence of $5x10^{-8}$ M PMA. On the day of experiment, PBS or 50ug of human acetylated LDL, (Biomedical technologies Inc. BT-906) were added to the cells in serum free media in presence of 5x10-8M PMA. Treated cells were incubated for 24 hr at 37°C in a humidified 5% CO2 incubator. Following incubation, media was removed, cells were washed with serum free media, and PBS or compounds were added to the cells in 500ul of serum free media (no PMA). Treated cells were incubated at 37°C in a humidified 5% CO2 incubator for another 48 hr. Compounds were refreshed every 24 hr. Following incubation, media was removed, cells were washed 2x with 37°C PBS, and Hexane-Isopropanol (3:2) mixture was added to the cells to extract cholesterol. 30 min later samples were transfered into glass tubes and dried under the Nitrogen. Formed pellet was solubilized in 160ul of TE buffer (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA) containing 0.1% Triton X-100 & 4mM Sodium Cholate. Total and free cholesterol were quantified by using the fluorescent method of W. Gamble, et al (Gamble et al, 1978, Journal Lipid Res., 16:1068-1070). The amount of esterified cholesterol was assessed by subtraction of free cholesterol from total cholesterol. The results are shown in ***Figure 27.***

[0271] We analyzed the ApoA-I primary, secondary, and tertiary structure to design the series of compounds. The potential lead compounds, to affect the lipoprotein metabolism, preferably exhibit both ability to bind to lipoproteins and to the liver lipoprotein binding sites. Therefore, all the compounds were radiolabeled and screened for

their tissue distribution *in vivo* (mice) and ability to bind mouse plasma lipoproteins *in vitro*.

[0272] *Characterization of the peptide mediators of RCT in vitro* – Twelve compounds were radioiodinated and incubated with plasma from mice deficient in the LDL-receptor (LDLR-/-). These mice have a lipoprotein profile similar to that in humans. Following incubation at 37°C for 2hrs, the mixture was separated on agarose gels and radioactivity was quantified in the bands representing LDL, HDL, and albumin. Results are summarized in *Figure 2*. Based on these results, the compounds that demonstrated significant association with lipoproteins were further characterized *in vivo*.

[0273] *Characterization of the peptide mediators of RCT in vivo* – The radiolabeled compounds were injected intravenously into mice. At the end point mice were bled and perfused extensively to remove circulating (nonspecific) radioactivity. Whole blood and potential target organs were harvested and counted. The total radioactivity in the collected organs and the entire blood volume of the mouse was calculated and the organ-bound radioactivity was expressed as a percentage of the total radioactivity. The results for organs bound radioactivity following injections of compounds are shown in *Figure 3*. Based on these data, SEQ ID NO: 1 was selected for further *in vivo* characterization.

[0274] *Further characterization of SEQ ID NO: 1 in vivo – Figure 4* illustrates the organ distribution of SEQ ID NO: 1. Because this compound associated with the liver preferentially to a dramatic extent, compare to other organs and peptides, we chose to focus our efforts on this compound.

[0275] To determine if SEQ ID NO: 1 can associate with human LDL, we attempted to form the complex of ^{125}I-SEQ ID NO: 1 with isolated human LDL. It has been demonstrated that SEQ ID NO: 1 forms the stable [LDL-^{125}I-SEQ ID NO: 1] complex, where approximately 6 to 8 copies of [^{125}I-SEQ ID NO: 1] were bound per LDL particle. To determine if SEQ ID NO: 1 influences lipoprotein transport to the liver, we injected the ^{125}I–LDL alone or in complex with SEQ ID NO: 1 into LDLR-/- mice (no LDL-receptor) and A-I-/- mice, which have a functional hepatic LDL-receptor. Liver associated radioactivity was assessed and results are presented in *Figure 5*. In both mouse genotypes, complexing of [^{125}I–LDL] with SEQ ID NO: 1 before injection resulted in a significant increase in liver-bound [^{125}I–LDL]. These data indicate that enhanced liver binding of [^{125}I-LDL-SEQ ID NO: 1] complex (compare to [^{125}I-LDL]) is mediated by: (a) unknown-yet

liver lipoprotein binding sites; (b) LDL-receptors. To assess the contribution of LDL-receptors alone, the binding of [^{125}I-LDL] and [^{125}I-LDL-SEQ ID NO: 1] to the liver of LDLR-/- mice was subtracted from their respective binding to the liver of A-I-/- mice, and data were normalized per gram of wet tissue. The result of this subtraction is presented in ***Figure 6*** and shows substantial increase in complex binding to the LDL-receptors compare to [^{125}I-LDL] alone. These data are in a good agreement with enhanced plasma clearance of ^{125}I–LDL-SEQ ID NO: 1 complex compare to ^{125}I–LDL alone when injected in ApoA1-/- mice (***Figure 7***). Influence of SEQ ID NO: 1 on ^{125}I–LDL binding to kidney, spleen, lung, heart, testis, adrenal, and prostate is shown in ***Figure 8***. It is noteworthy that no increase in ^{125}I–LDL-SEQ ID NO: 1 complex binding to the heart was observed.

[0276] ***Impact of SEQ ID NO: 1 on lipoprotein metabolism (Single bolus injections)*** – We examined the impact of SEQ ID NO: 1 on cholesterol metabolism in mildly hyperlipidemic wild type C57BL/6J mice fed a cholate-containing high fat diet (HFC). Mice were divided into two groups – control and experimental. Each group contained 4 mice. Experimental mice were injected intravenously with SEQ ID NO: 1 (100 μg in 100 μl of PBS), whereas control group - with 100 ul of PBS. Different groups of mice were bled at 0 min (no injections), 30, 60, 90, 120, and 180 min after injections, plasma was obtained, combined within each group, and subjected FPLC analysis. Cholesterol distribution among the different lipoprotein classes was assessed and data were expressed as cholesterol content (Act*ml) or area under the VLDL, IDL/LDL, and HDL peaks, respectively. The results are presented in ***Figures 9, 10 and 11***. Although, there was no significant impact of SEQ ID NO: 1 on VLDL level over the entire time course, kinetics of the liver response was noticeably different compare to PBS control (***Figure 9***). Significant lowering of IDL/LDL (proatherogenic and atherogenic lipoproteins) was observed at 90, 120, and 180 min after SEQ ID NO: 1 injections (***Figure 10***). Effect of SEQ ID NO: 1 lasts up to 180 min and completely vanished at 240 min time point. These data are in agreement with *in vivo* half-life data of ^{125}I-SEQ ID NO: 1, which is approximately 2 to 3 hrs. There was observed slight but significant decrease of HDL-C levels after single bolus injections of SEQ ID NO: 1 (***Figure 11***), indicating possible increase of HDL clearance. Linear regression analysis of single bolus injections data is presented in ***Figures 12-14*** and shows significant impact of SEQ ID NO: 1 on plasma levels of pro- and atherogenic lipoproteins (IDL and LDL).

[0277] *Effect of "frame-shift" derived peptides on lipoprotein metabolism (Single bolus injections)* – We performed the functional frame-shift of the entire region of mouse apolipoprotein A1 where SEQ ID NO: 1 derived from (helix 6, Pro166 – Pro188, precursor protein). Frame-shift was done in both directions (form N- to C- and from C- to N-Terminus). Sixteen (16) peptides were designed, synthesized and tested for possible effects on cholesterol metabolism of mildly hyperlipidemic C57BL/6J mice fed a cholate-containing high fat diet (HFC). Mice were divided into two groups – control and experimental. Each group contained 4 mice. Experimental mice were injected intravenously with each peptide (100 µg in 100 µl of PBS), whereas control group - with 100 µl of PBS. Different groups of mice were bled at 0 min (no injections), 90, and 180 min after injections, plasma was obtained, combined within each group, and subjected to FPLC analysis. Cholesterol distribution among the different lipoprotein classes was assessed and cholesterol content (Act*ml) or area under the VLDL, IDL/LDL, and HDL peaks was quantified. The data are expressed as percent of change of total cholesterol (TC) content of VLDL, IDL/LDL, and HDL classes in experimental mice relative to control (PBS injected) mice. The results are presented in ***Tables 6 and 7***. It can be seen in ***Tables 6 and 7*** that SEQ ID NO: 1, which belongs to N-terminal part of Helix 6, has the strongest impact on plasma levels of low density lipoproteins compare to other sequences, whereas SEQ ID NO: 7, which belongs to the C-terminal part of Helix 6, demonstrated the marked HDL-C elevating properties.

Effect of Frame-shift Derived Peptides on Plasma Lipoprotein Profile. 90 Min After Single Bolus Injections (SBI).

#	AMPS	Sequence	M.W.	VLDL	IDL/LDL	HDL
1	908	YEFFDFMEDH	1481.4	-91	-99	-6.9
2	13877	PVAEEFRDRARTHVDELRTQLAP	2709.8	0	-18.4	-1.8
3	13878	EEFRDRARTHVDELRTQLAP	2580.1	36.4	13.3	-18.1
4	13879	FRDRARTHVDELRTQLAP	2293.8	-4	-3	19.8
5	13880	RDRARTHVDELRTQLAP	2088.4	-3.8	13.9	11.1
6	13881	MRTHVDELRTQLAP	1958.8	-1.8	-8.1	-8.3
7	13881	RTHVDELRTQLAP	1794.7	-6.5	6.8	9.1
8	13882	THVDELRTQLAP	1679.8	39	3.9	81
9	13883	DELRTQLAP	1011.2	8.2	10.4	8.2
10	13884	PVAEEFRDRARTHVDELR	2366.4	47	33.8	18.1
11	13885	PVAEEFRDRARTHV	1709.9	0	9.7	-29.3
12	13886	PVAEEFRDELR	1449.3	-4	8.9	8
13	13888	PVAEEFRDRM	1280.2	-41	2.1	13.8
14	13887	PVAEEFRDR	1136.3	-10	8.8	11.4
15	13889	PVAEEF	731.8	39.7	8	20
16	13890	PVAEF	614.6	44	18	18.8

Table 6. Mice were divided into two groups (4 mice in each group). Peptides or PBS were injected intravenously into experimental or control mice, respectively. At 90 min after SBI plasma was obtained, combined within each group, and applied on Superose 6 column. Data are expressed as % of change of TC (Area (Act*ml) or area under the VLDL, IDL/LDL, and HDL peaks compare to PBS control.

Effect of Frame-Shift Derived Peptides on Plasma Lipoprotein Profile. 180 Min After Single Bolus Injections (SBI).

#	AVPS	Sequence	IDL/LDL	VLDL	IDL/LDL	HDL
1	[illegible]	[illegible]	1491.9	-59.91	-94.11	-90
2	[illegible]	[illegible]	[illegible]	19.5	3.1	4.8
3	[illegible]	[illegible]	[illegible]	-18.6	-5.8	-18.7
4	[illegible]	[illegible]	[illegible]	-9	-7.1	-8.8
5	[illegible]	[illegible]	[illegible]	-91.6	-7.8	4.8
6	[illegible]	[illegible]	[illegible]	-2.9	-15.3	0
7	[illegible]	[illegible]	[illegible]	-17.8	0	-14.3
8	[illegible]	[illegible]	[illegible]	28.7	-11.1	28.4
9	[illegible]	[illegible]	[illegible]	19.9	12.8	-18.1
10	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0	8.8	8.4
11	[illegible]	[illegible]	[illegible]	-89.7	-4.8	-88.1
12	[illegible]	[illegible]	[illegible]	-17	-5.8	-4.8
13	[illegible]	[illegible]	[illegible]	35.8	19.8	4.8
14	[illegible]	[illegible]	[illegible]	-89.7	8.1	0
15	[illegible]	[illegible]	[illegible]	81	14.8	8.8
16	[illegible]	[illegible]	[illegible]	8.7	7.8	7.2

Table 7. Mice were divided into two groups (4 mice in each group). Peptides or PBS were injected intravenously into experimental or control mice, respectively. At 180 min after SBI plasma was obtained, combined within each group, and applied on Superose 6 column. Data are expressed as % of change of TC [Area (Act*ml) or area under the VLDL, IDL/LDL, and HDL peaks relative to PBS control.

[0278] *Effect of chemically modified derivatives of SEQ ID NO: 1 and peptides derived from other mouse apoA1 regions on mouse plasma lipoprotein profile (Single bolus injections)* – To increase SEQ ID NO: 1 hydrophobicity, Phenyl Acetyl or Pivalic Acid were attached to N-Terminal Tyr residue of SEQ ID NO: 1, or Tyr residue was removed from N-terminus. These peptides were tested for possible effect on cholesterol metabolism of mildly hyperlipidemic C57BL/6J mice fed a cholate-containing high fat diet (HFC). Mice were divided into two groups – control and experimental. Each group contained 4 mice. Experimental mice were injected intravenously with each peptide (100 µg in 100 µl of PBS), whereas control group - with 100 µl of PBS. Different groups of mice were bled at 0 min (no injections), 90, and 180 min after injections, plasma was obtained, combined within each group, and subjected to FPLC analysis. Cholesterol distribution among the different lipoprotein classes was assessed and cholesterol content (Act*ml) or area under the VLDL, IDL/LDL, and HDL peaks was quantified. The data are expressed as percent of change of total cholesterol (TC) content of VLDL, IDL/LDL, and HDL classes in experimental mice relative to control (PBS injected) mice. The results are presented in

Table 8. It can be seen in the table that all above modifications did not result in increase of SEQ ID NO: 1 potency. The few peptides belonging to other regions of mouse apolipoprotein A1 were also tested in this model and did not demonstrate any remarkable activity (***Table 8***).

Effect of chemically modified derivatives of AVP3006 and peptides derived from other mouse apoA1 regions on mouse plasma lipoprotein profile. Single bolus injections

#	AVP#	Sequence	M.W.	VLDL	IDL/LDL	HDL
		Plasma after 90				
1	13008	Ph YEPEDRMETH	1897.7	31.7	3.1	-4.8
2	30748	Ph YEPEDRMETH	1496	11	-1.3	8.7
3	30884	EPEDRMETH	1339.3	-4.4	0	-11.3
4	13004	WDRVDE	878.1	-17.4	-18.1	-13.6
5	13009	RDRDYVDEFEE	1318.4	31.4	8.2	0
6	13010	YLDEPEDRWDE	1694.8	8.8	11.7	19.8
7	13011	TPEPVDNLEETDW	1698.1	26.5	11.7	8.8
8	13012	WDRVDEAHVYDAVED	2098.3	-2.6	0	0
		180 plasma after 90				
1	13008	Ph YEPEDRMETH	1897.7	-17.1	-21.3	-21.8
2	30748	Ph YEPEDRMETH	1496	-14.8	-19.8	-7.4
3	30884	EPEDRMETH	1339.5	8.8	-11	-8
4	13004	WDRVDE	878.1	-16.5	18.8	-11.7
5	13009	RDRDYVDEFEE	1318.4	18.4	0	0
6	13010	YLDEPEDRWDE	1694.8	-19.8	-8.8	-80
7	13011	TPEPVDNLEETDW	1698.1	-8	0	-19.1
8	13012	WDRVDEAHVYDAVED	2098.3	18.4	19.8	19.1

Table 8. Mice were divided into two groups (4 mice in each group). Peptides or PBS were injected intravenously into experimental or control mice, respectively. At 90 and 180 min after SEI plasma was obtained, combined within each group, and applied on Superose 6 column. Data are expressed as % of change of TC (Area (Act*ml) or area under the VLDL, IDL/LDL, and HDL peaks relative to PBS control.

[0279] *Impact of SEQ ID NO: 1 on lipoprotein metabolism (20 hrs pumps)* – To determine relatively long-term effect of SEQ ID NO: 1 on plasma lipoprotein profile, the Alzet Mini-Osmotic pumps, containing SEQ ID NO: 1 or PBS, were surgically inserted in canulated Chow fed C57BL/6J mice. The pumps flow rate was equal to 8 ul per hr, which provided the delivery amount of SEQ ID NO: 1 per hr as indicated for ***Figure 9***. Mice were switched on HFC diet immediately after surgery. 20 hrs later plasma samples were obtained, combined within each group (4 to 6 mice), and subjected to FPLC analysis and agarose gel electrophoresis for assessment of cholesterol and phospholipid distribution among the lipoprotein classes. The results are presented in ***Figure 15*** and show dramatic decrease in low density lipoproteins levels in plasma of mice, which received SEQ ID NO: 1, whereas the plasma HDL cholesterol levels in these mice were elevated. The LDL lowering effect was attenuated with increase of SEQ ID NO: 1 concentration. This phenomenon can be explained by self-competition between free and LDL-bound form of

SEQ ID NO: 1 for the liver lipoprotein binding sites. In contrast, HDL cholesterol levels were positively correlated with SEQ ID NO: 1 concentration. The increase in plasma HDL-C indicates of possible activation of LCAT (lecithin:cholesterol acyltransferase) or increased production of ApoA-I, whereas elevated plasma levels of HDL phospholipids (data not shown) suggest involvement of PLTP (phospholipid transfer protein) in the mechanism of SEQ ID NO: 1 action. Thus, obtained data indicate SEQ ID NO: 1 multi-functionality and suggest its involvement in both HDL and LDL pathways.

[0280] *Impact of SEQ ID NO: 1 structural derivatives (3 to 13 amino acid residues) on lipoprotein metabolism (20 hrs pumps)* – To determine relatively long-term effect on plasma lipoprotein profile, the Alzet Mini-osmotic pumps, containing SEQ ID NO: 1 derivatives or PBS, were surgically inserted in canulated Chow fed C57BL/6J mice. The pumps flow rate was equal to 8 ul per hr, which provided the deliveries of 30-40 μg of peptides per hr. Mice were switched on HFC diet immediately after surgery. 20 hrs later plasma samples were obtained, combined within each group (4 to 6 mice), and subjected to FPLC analysis and agarose gel electrophoresis for assessment of cholesterol and phospholipid distribution among the lipoprotein classes. The data for HDL-C are presented in *Figure 16* and demonstrate significant decrease of plasma levels of low density lipoproteins in peptides treated mice, whereas the plasma HDL cholesterol levels in these mice were elevated. However, few peptides (such as SEQ ID NOs: 35 and 87) caused the opposite effect, i.e., increase of the plasma levels of low density lipoproteins and decrease in high density lipoproteins cholesterol and phospholipids. This reversal of effect is valuable information for SAR purposes in light of close structural relationships of these "clearance blocking" peptides with "clearance enhancing" peptides. The modest increase in plasma HDL-C might indicate on possible activation of LCAT (lecithin: cholesterol acyltransferase) or increased production of ApoA-I, whereas elevated plasma levels of HDL phospholipids suggest involvement of PLTP (phospholipid transfer protein) in the mechanism of peptides action. Thus, obtained data suggest that SEQ ID NO: 1 derivatives are involved in both HDL and LDL pathways.

[0281] *Long term effect of SEQ ID NO: 34 ("template", 3 amino acid residues peptide) and its modified derivatives (SEQ ID Nos: 8 and 91) on lipoprotein metabolism (7 days pumps)* – To determine long-term effect of these peptides on plasma lipoprotein profile, the Alzet Mini-osmotic pumps, containing peptides or PBS, were surgically

inserted in cannlated Chow fed C57BL/6J mice. The pumps flow rate was equal to 1 µl per hr, which provided the deliveries of indicated in *Figure 17* amount of each peptide per hr. Mice were switched on HFC diet immediately after surgery. 160 hrs later mice were sacrificed, plasma samples were obtained, combined within each group (4 to 6 mice), and subjected to FPLC analysis and agarose gel electrophoresis for assessment of cholesterol and phospholipid distribution among the lipoprotein classes. Bile was immediately removed from gall bladders and total cholesterol/bile acids contents were determined as described in methods. The data are presented in *Figure 17* and demonstrate significant decrease of plasma levels of low density lipoproteins in peptides treated mice, elevation of plasma HDL cholesterol (and HDL phospholipid—data not shown), and dramatic increase of Gall Bladder total cholesterol and bile acids amount. The modest increase in plasma HDL-C might indicate on possible activation of LCAT (lecithin: cholesterol acyltransferase) or increased production of ApoA-I, whereas elevated plasma levels of HDL phospholipids suggest activation of PLTP (phospholipid transfer protein), which is known to be involved in maintenance of plasma HDL levels and generating nascent HDL particles (primary cholesterol acceptors). It can be seen in *Figure 17* that administration of SEQ ID Nos: 34, 86 and 91 into mice resulted in an increase in the amount of phospholipid in the HDL zone, which is usually accompanied by an increase in total cholesterol and bile acids recovered from the gall bladder. The increased amount of cholesterol / bile acids in a Gall Bladder, along with decrease of plasma low density lipoprotein levels (VLDL, IDL, LDL) and increase of the HDL levels, indicates on enhanced "Plasma > Liver > Gall Bladder" cholesterol flux, i.e., reverse cholesterol transport in presence of the peptides in accordance with preferred aspects of the present invention, as illustrated in *Figure 17*.

[0282] *Effect of peptides on PLTP activity* – It can be seen in *Figure 18* that incubation of mouse plasma with SEQ ID Nos: 34, 86, 91 and 96 resulted in activation of PLTP. Mouse plasma (source of enzyme), obtained from Chow fed mice and from mice fed with high fat cholate containing diet for 4 days, was incubated with PBS or the peptide of SEQ ID Nos: 34, 86, 91 and 96 (0.4, 2, 5, and 10ug) at RT for 30 min. Reaction was started by addition of 0.3 µl of plasma/PBS or plasma/SEQ ID NO mixture to 100 µl of assay solution containing fluorescent substrate. PLTP activity was monitored on Spectrofluorometer for 20 min at 37°C. Each bar represents the Mean ± SEM obtained from 3 independent experiments. These data are in a good agreement with results of

studying the long-term effect of these peptides on mouse plasma HDL levels (e.g., the results obtained with 7 days pumps, shown in *Figure 17*) and provide strong evidence in favor of PLTP involvement in *in vivo* mechanisms of peptide action. Peptides corresponding to SEQ ID Nos: 35 and 36 did not have any significant effect on PLTP activity. It is noteworthy that these two peptides also did not show significant activity upon infusion into mice for 20 hrs (see *Figure 16*).

[0283] *Effect of Acute Oral Administration of SEQ ID NO 91 (AVP-26249) on Mouse Plasma Lipoprotein Profile and Bile Acid / Cholesterol in Bile* – With reference to *Figure 19*, bars shown for 2.5 and 20 ug represent mean ± SEM of 2 independent experiments and bars shown for 5 and 10 ug represent mean ± SEM of 3 independent experiments with C57BL/6J fed HFD. No error bars - single experiment. Effect is expressed as % of change relative to PBS control (0%).

[0284] *Effect of Ad Lib Oral Administration of SEQ ID NO: 91 (AVP-26249) into Chow Fed ApoE-/- mice on Plasma TC (Total Cholesterol)* – With reference to *Figure 20*, two months old ApoE-/- male mice were fed Chow diet. On a day of the experiment at T0 (Time 0) mice were bled (50ul), plasma TC was determined, and mice were divided into groups (4 mice per group) with similar T0 group mean cholesterol values. Control mice received drinking water and experimental mice received water solution of compound. Mice were bled every 72-96 hr, and plasma cholesterol was quantified. Each bar represents mean± SEM of 4 animals and is representative of 15 determinations carried out biweekly. Amount of SEQ ID NO: 91 is expressed as mg per kg (mpk), consumed per 24 hr.

[0285] *Effect of SEQ ID NOS: 91, 145, 146 and 118 (AVP-26249, 26451, 26452, and 26355, respectively) on Plasma Cholesterol Levels in ApoE-/- Mice Fed High Fat Diet* – With reference to *Figure 21*, three months old ApoE-/- male mice were maintained on Chow diet. On day 0, mice were bled, plasma TC was determined, and mice were divided into groups (4 mice per group) with similar group mean cholesterol and weight values. Control mice received drinking water and experimental mice received water solution of compounds. Four weeks later, mice were switched on high fat diet. Mice were bled once in a 10 days, and total plasma cholesterol was quantified. Each bar represents the mean ± SEM of 4 animals and is representative of 7 determinations. Amount of SEQ ID NO is expressed as mg per kg (mpk), consumed per 24 hr.

[0286] *Effect of SEQ ID NOS: 91, 145, 146 and 118 (AVP-26249, 26451, 26452, and 26355, respectively) on Amount of Cholesterol Excreted by ApoE-/- Mice Fed High Fat Diets* – With reference to *Figure 22*, eight groups of 5 months old ApoE-/- male mice (4 mice in each group) were maintained on high fat diet. Control mice received drinking water, whereas experimental mice received water solutions of compounds "Ad Lib". Mice were placed in metabolic cages overnight. Next day, feces were collected, dried for 72 hr, weighed, and total cholesterol was extracted and quantified. Each bar represents the mean ± SEM of two independent "metabolic cage" experiments that were performed 2.4 and 3.4 weeks after the mice were fed high fat diet. Amount of SEQ ID NO is expressed as mg per kg (mpk), consumed per 24 hr.

[0287] In conclusion, the results summarized in *Figures 2-22* and *Tables 6-8* demonstrate that hyperlipidemic mice administered the peptide mediators of RCT designed in accordance with the Molecular Model of the present invention, via either intravenous or oral delivery routes, exhibited substantial improvements in plasma lipoprotein profile, which are due to enhanced clearance of low density (atherogenic) lipoproteins and elevation of plasma levels of antiatherogenic high density lipoproteins.

[0288] With reference to *Figure 23*, a schematic diagram shows an *in vitro* triangle used in a screening method to identify test compounds likely to enhance RCT *in vivo*. The cultured macrophage cells are used to assess the effects of test RCT mediator compounds on both ac-LDL cholesterol accumulation and cholesterol efflux from pre-loaded macrophage cells (macrophages which accumulate cholesterol contribute to foam cell formation and atherosclerotic plaque formation). Thus, this compartment of the triangle is used to evaluate the effectiveness of test compounds on RCT as well as pathogenesis of atherosclerosis. The cultured primary smooth muscle cells are used to assess the effects of test RCT mediator compounds on ox-LDL accumulation in the vascular wall, which may also be related to the formation of foam cells and the progression of atherosclerosis. The cultured hepatocytes are used to assess the effects of the test RCT mediator compounds on cholesterol uptake by the liver. The use of the peripheral cells (macrophages and/or smooth muscle cells in combination with the liver cells) advantageously provides a monitor for RCT—reduced cholesterol accumulation and enhanced cholesterol efflux from the peripheral cells, as well as uptake by the liver (for metabolism and excretion).

[0289] *Effect of SEQ ID NOS: 91 and 146 (AVP-26249 and AVP-26452, respectively) on LDL Mediated Accumulation of Total Cholesterol in HepG2 Cells.* With reference to *Figure 24*, human HepG2 cells were plated in 24 wells plate at the density 2.5x105 per well in serum free (lipoprotein free) assay media. 48 hrs later 25ug of human LDL pre-incubated for 1hr at RT with PBS or compounds, were added to the cells in 500ul of serum free media. Treated cells were incubated for 24 hr at 37°C in a humidified 5% CO2 incubator. Each bar represents the Mean ± SEM of 2-3 independent experiments.

[0290] *Effect of SEQ ID NO: 91 (AVP-26249) on Ac-LDL Mediated Accumulation of Total Cholesterol and Cholesteryl Ester in Macrophages.* With reference to *Figure 25*, human THP-1 cells were plated in assay media in 24 wells plate at the density 1x106 per well in presence of 5x10-8 M of PMA. 48 hrs later 50ug of human AcLDL, pre-incubated for 1hr at RT with PBS (control), or AVP-26249, was added to the cells in 500ul of assay media. Treated cells were incubated for 24 hr at 370C in a humidified 5% CO2 incubator. Each bar represents the Mean ± SEM of 3-9 replicates.

[0291] *Effect of SEQ ID NOS: 91 and 146 (AVP-26249 and 26452, respectively) on Ox-LDL Mediated Accumulation of Total Cholesterol and Cholesteryl Ester in Vascular Smooth Muscle Cells.* With reference to *Figure 26*, human vascular smooth muscle cells were plated in 24 wells plate at the density 9x104 per well in serum free assay media. 24 hrs later PBS only or human oxidized LDL, pre-incubated for 1hr at RT with PBS, or with compounds, were added to the cells in 500ul of assay media. Treated cells were incubated for 24 hr at 37°C in a humidified 5% CO2 incubator. Each bar represents the Mean ± SEM of 4-7 independent experiments.

[0292] *Effect of SEQ ID NOS: 91 and 146 (AVP-26249 and AVP-26452, respectively) on Cholesterol Efflux from AcLDL-Loaded Macrophages.* With reference to *Figure 27*, human THP-1 cells were plated in assay media in 24 wells plate at the density 1x106 per well in presence of 5x10-8 M of PMA. 48 hrs later 50ug of human acetylated LDL or PBS were added to the cells in 500ul of assay media containing PMA. 24 hrs later cells were washed and PBS or compounds, were added to the cells in 500ul of assay media. Before and after each treatment cells were incubated at 37°C in a humidified 5% CO2 incubator. Each bar represents the Mean ± SEM of 5-6 independent experiments.

[0293] One goal is to move cholesterol from the macrophages and aorta cells into the liver for cholesterol clearance (See *Figure 30*). The ability of one of the test

compounds such as those shown in Tables 3-5 to effect RCT may be predicted based upon the assays performed as shown in Figures 24-27 above. That is, these three cell types provide a snapshot view of cholesterol status within the organism. The ability of a given compound to decrease levels of cholesterol and CE in a macrophage cell such as THP-1 cells and vascular smooth muscle cells while increasing cholesterol levels in hepatocytes such as (HepG2 cells) is predictive of its effectiveness in vivo. Accordingly, one embodiment of the present invention involves a screening method in which test compounds are assayed *in vitro* using macrophage, smooth muscle and liver cell lines such as those disclosed, to provide an indication of *in vivo* RCT.

[0294] *Effect of SEQ ID NO: 91 (AVP-26249) on Atherosclerotic Lesions Progression in Aorta of ApoE-/- Mice Fed High Fat Diets* With reference to ***Figure 28***, ApoE-/- male mice were maintained on Chow diet for 4 weeks and on HFD (1.25% of cholesterol) for 9.3 weeks. Mice received SEQ ID NO: 91 (AVP-26249) "ad lib" via the drinking water for 13.3 weeks. The concentrations of SEQ ID NO: 91 are zero (left panel), 1.4 μg/kg (middle panel) and 2.8 μg/kg (right panel). At euthanasia, animals were perfused with PBS, followed by formal-sucrose (4% paraformaldehyde and 5% sucrose in PBS, pH 7.4). The entire mouse aorta was dissected from the proximal ascendig aorta to the bifurcation of the iliac artery by using a dissecting microscope. Adventitial fat was removed and the artery was opened longitudinally, pinned flat onto black dissecting wax, stained with Sudan IV, and photographed at a fixed magnification. The photographs were digitized and the digital images are shown. Total aortic area and aortic lesion area were calculated by using Adope Photoshop 7.0 and NIH Scion Image software (data not shown).

[0295] *Effect of SEQ ID NO: 146 (AVP-26452) on Atherosclerotic Lesions Progression in Aorta of ApoE-/- Mice Fed High Fat Diets* With reference to ***Figure 29***, ApoE-/- male mice were maintained on Chow diet for 4 weeks and on HFD (1.25% of cholesterol) for 9.3 weeks. Mice received SEQ ID NO: 146 (AVP-26452) "ad lib" via the drinking water for 13.3 weeks. The concentrations of SEQ ID NO: 146 are zero (left panel), 1.4 μg/kg (middle panel) and 2.8 μg/kg (right panel).

REFERENCES CITED:

Alam et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 15641-15649
Anantharamaiah et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 10248-10255
Anantharamaiah et al. (1987) *J. Lipid Res.* 29, 309-318
Anantharamaiah et al. (1990) *Arteriosclerosis*, 10, 95-105
Arai et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 2366-2371
Argraves et al. (1997) *J. Clin. Invest.* 100, 2170-2181
Austin et al. (1988) *JAMA*, 260, 1917-1921
Austin et al. (1990) *Circulation*, 82, 495-506
Banka et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 10288-10297
Barbaras et al. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142, 63-69
Barter P (2000) *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 2029
Berneis and Krauss (2002) *J. Lipid Res.* 43, 1363-1379
Bhatnagar A. (1999) *in Lipoproteins and Health Disease*, pp. 737-752, Arnold; London
Bolibar et al. (2000) *Thromb. Haemost.* 84, 955-961
Boren et al. (2001) *J. Biol Chem.* 276, 9214-9218
Brouillette and Anantharamaiah (1995) *Biochim. Biophys. Acta.* 1256, 103-129
Brunzell JD (1995) in *The Meatbolic and Molecular Bases of Inherited Disorders*, pp. 1913-1932, McGraw-Hill, Inc., New York
Buchko et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 3039-3045
Camejo et al. (1985) *Atherosclerosis*, 55, 93-105
Campos et al. (1992) *Arteriosclerosis Thrombosis*, 12, 187-193
Canner et al. (1986) *JACC*, 8, 1245-1255
Cao et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 39561-39565
Castelli et al. (1986) *JAMA*, 256, 2835-2838
Castro and Fielding (1998) *Biochemistry*, 27, 25-29
Chait et al. (1993) *Am. J. Med.* 94, 350-356
Chambenoit et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 9955-9960;
Chang et al. (1997) *Annu Rev Biochem.* 66, 613-638
Chapman et al. (1998) *Eur Heart J*, Suppl A: A24-30
Chen and Albers (1985) *Biochim Biophys. Acta*, 836, 275-285
Chen et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 30794-30800
Cohen et al. (1999) *Curr Opin Lipidol.* 10, 259-268
Collet et al. (1997) *J. Lipid Res.* 38, 634-644
Collet et al. (1999) *J. Lipid Res.* 40, 1185-1193
Curtiss and Boisvert (2000) *Curr. Opin. Lipidol.* 11, 243-251
Datta et al. (2001) *J. Lipid Res.* 42, 1096-1104
Davis et al. (2002) *J. Lipid Res.* 43, 533-543
de Graaf et al. (1993) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76, 197-202
Downs et al. (1998) *JAMA*, 279, 1615-1622
Duverger et al. (1996) *Circulation*, 94, 713-717
Ehnholm et al. (1998) *J. Lipid Res.* 39, 1248-1253
Epand et al. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 9389-9396
Eriksson et al. (1999) *Circulation*, 100, 594-598
Fan et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 40071-40079
Fidge NH (1999) *J. Lipid Res.* 40, 187-201
Fielding et al. (1994) *Biochemistry*, 33, 6981-6985

Fitch WM (1977) *Genetics*, 86, 623-644
Fogelman et al. (2003) United States Patent Application Publication, US 2003/0045460 A1
Föger et al. (1996) *Arterioscler Thromb Vasc Biology*, 16, 1430-1436
Foger et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 36912-36920
Frank and Marcel (2000) *J. Lipid Res.* 41, 853-872
Frick et al. (1987) *N. England J. Medicine*, 317, 1237-1245
Fusukuhima et al. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 10651-10657
Gamble et al. (1978) *J. Lipid Res.* 16,1068-1070
Garber et al. (1992) *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 12, 886-894
Garber et al. (2001) *J. Lipid Res.* 42, 545-552
Garcia et al. (1996) *Biochemistry*, 35, 13064-13071
Genest et al. (1991) *Am J Cardiol.* 67, 1185-1189
Genest et al. (1992) *Circulation*, 85, 2025-2033
Genest et al. (1999) *J. Invest. Med.* 47, 31-42
Gibbons et al. (1995) *Am. J. Med.* 99, 378-385
Gillotte et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 2021-2028
Glomset JA (1968) *J. Lipid Res.* 9, 155-167
Goldberg I. (1996) *J. Lipid Res.* 37, 693-707
Golder-Novoselsky et al. (1995) *Biochim. Biophys. Acta*, 1254, 217-220
Goldstein and Brown (1974) *J. Biol. Chem.* 249,5153-5162
Gordon et al. (1989) *N Engl. J. Med.* 321, 1311-1315
Gotto AM (2001) *Circulation*, 103, 2213
Griffin et al. (1994) *Atherosclerosis*, 106, 241-253
Groen et al. (2001) *J. Clin. Invest.* 108, 843-850
Hajjar and Haberland (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 22975-22978
Hara and Yokoyama (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 3080-3086
Hedrick et al. (2001) *J. Lipid Res.* 42, 563-570
Huang et al. (1995) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biology*, 15, 1412-1418
Huang et al. (1997) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 2010-2015
Hulley et al. (1998) *JAMA*, 280, 605-613
Huuskonen and Ehnholm (2000) *Curr. Opin. Lipidol.* 11, 285-289
Huuskonen et al. (2000) *Atherosclerosis*, 151, 451-461
Ikewaki et al. (1993) *J. Clin. Invest.* 92, 1650-1658
Ikewaki et al. (1995) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biology*, 15, 306-312
Ishigami et al. (1994) *J. Biochem.* (Tokyo) 116, 257-262
Jaakkola et al. (1993) *Coron. Artery Dis.* 4, 379-385
Jauhiainen et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 4032-4036
Jiang et al. (1996) *J. Clin. Invest.* 98, 2373-2380
Jiang et al. (1999) *J. Clin. Invest.* 103, 907-914
Jonas A (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, 1084, 205-220
Jones et al. (1998) *Am. J. Cardiol.* 81, 582-587
Kaiser and Kézdy (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 1137-1140
Kanellis et al. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 11464-11472
Kawano et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 29477-29481
Kozarsky et al. (2000) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biology*, 20, 721-727
Krauss and Burke (1981) *J. Lipid Res.* 23, 97-104
Krieger M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95, 4077-4080

La Belle and Krauss (1990) *J Lipid Res.*,31, 1577-1588
Lindholm et al. (1998) *Biochemistry*, 37, 4863-4868
Liu and Krieger (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 34125-34135
Lund-Katz et al. (1993) In *"Peptides: Chemistry and Biology"* (R. Haughten, ed.) ESCOM Press, Leiden, The Netherlands
Lusa et al. (1996) *Biochem. J.* 313, 275-282
Main et al. (1996) *Biochim Biophys Acta*, 29, 17-24
Marotti et al. (1993) *Nature*, 364, 73-75
Martin-Jadraque et al. (1996) *Arch. Intern. Med.* 156, 1081-1088
Marzal-Casacuberta et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 6720-6728
Matsumoto et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 16778-16782
McLachlan AD (1977) *Nature*, 267, 465-466
McLean et al. (1991) *Biochemistry*, 30, 31-37
McManus et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 5043-5051
Mendez et al. (1994) *J. Clin. Invest.* 94, 1698-1705
Meng et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 8588-8596
Merkel et al. (2002) *J. Lipid Res.* 43, 1997-2006
Miccoli et al. (1997) *J. Lipid Res.* 38, 1242-1253
Miettinen et al. (1997) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biology*, 17, 3021-3032
Miller et al. (1987) *Am Heart J.* 113, 589-597
Milner et al. (1991) *Biochim Biophys Acta*, 26, 1082, 71-78
Mishra et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 7185-7191
Mishra et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 1602-1611
Mishra et al. (1998) *Biochemistry*, 37, 10313-10324
Morton RE (1999) *Curr Opin Lipidol.* 10, 321-327
Nagano et al. (2002) *J. Lipid Res.* 43, 1011-1018
Naito HK (1985) *Ann. NY Acad. Sci*, 454, 230-238
Nakagawa et al. (1985) *J. Am. Chem. Soc.* 107, 7087-7092
Ohnishi and Yokoyama (1993) *Biochemistry*, 32 (19), 5029-5035
Oka et al. (2000) *Clin. Chem.* 46, 1357-1364
Oka et al. (2000) *J. Lipid Res.* 41, 1651-1657
Oka et al. (2002) *J. Lipid Res.* 43, 1236-1243
Okamoto et al. (2000) *Nature*, 13, 406 (6792): 203-7
Oram and Lawn (2001) *J. Lipid Res.* 42, 1173-1179
Oram and Yokoyama (1997) *J Lipid Res.* 37, 2473-2491
Packard and Shepherd (1997) *Arteriosclerosis, Thromb, Vasc. Biology*, 17, 3542-3556
Palgunachari et al. (1996) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16, 328-338
Plump et al. (1997) *Prc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 9607-9611
Ponsin et al. (1986a) *J. Biol. Chem.* 261, 9202-9205
Ponsin et al. (1986b) *J. Clin. Invest.* 77, 559-567
Pownall et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77(6), 3154-3158
Pownall et al. (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, 833, 456-462
Puchois et al. (1987) *Atherosclerosis*, 68, 35-40
Pussinen et al. (1997) *J. Lipid Res.* 38, 12-21
Pussinen et al. (1998) *J. Lipid Res.* 39, 152-161
Qin et al. (2000) *J. Lipid Res.* 41, 269-276
Ramasamy et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 33480-33486

Ramaley et al. (1997) *Arterioscler Thromb. Vasc. Biology*, 17, 1813-1821
Reschly et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 9645-9654
Riemens et al. (1998) *Atherosclerosis*, 140, 71-79
Riemens et al. (1999) *J. Lipid Res.* 40, 1459-1466
Rinninger et al. (1998) *J. Lipid Res.* 39, 1335-1348
Ross R. (1993) *Nature*, 362, 801-809
Rothblat et al. (1999) *J. Lipid Res.* 40, 781-796
Rubin et al. (1991) *Nature*, 353, 265-267
Rubins, et al. (1999) *N. Engl. J. Med.* 341, 410-418
Santamarina-Fojo and Dugi (1994) *Curr. Opin. Lipidol.* 5, 117-125
Santamarina-Fojo et al. (2000) *Curr. Opin. Lipidol.* 11, 267-275
Schissel et al. (1996) *J. Clin. Invest.* 98, 1455-1464
Second Report of the Expert Panel (1994) *Circulation*, 89, 1329-1445
Segrest et al. (1983) *Journal Biol Chem.* 258, 2290-2295
Segrest et al. (1994) *Advances in Protein Chem.* 45, 303-369
Segrest et al. (2001) *J. Lipid Res.* 42, 1346-1367
Segrest JP (1974) *FEBS Lett.* 38, 247-253
Settasation et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 276, 26898-26905
Shaefer EJ (1994) *Eur. J. Clin. Invest.* 24, 441-443
Shatara et al. (2000) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 78, 367-371
Shepherd et al. (1995) *N. Engl. J. Med.* 333, 1301-1307
Sorci-Thomas et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 2665-2670
Sorci-Thomas et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 12156-12163
Sparks et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 25839-25847
Sparrow et al. (1981) In: *"Peptides: Synthesis-Structure-Function,"* Roch and Gross, Eds., Pierce Chem. Co., Rockford, IL. 253-256
Sparrow et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 10021-10027
Srinivas et al. (1990) *Virology*, 176, 48-57
Stein and Stein (1999) *Atherosclerosis*, 144, 285-303
Steiner et al. (1987) *Circulation*, 75, 124-130
Steinmetz and Utermann (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 2258-2264
Sviridov et al. (1996) *Biochemistry*, 35, 189-196
Sviridov et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 19707-19712
Sviridov et al. (2000) *J. Lipid Res.* 41, 1872-1882
Swinkels et al. (1989) *Arteriosclerosis*, 9, 604-613
Tall and Wang (2000) *J. Clin. Invest.* 106, 1205-1207
Tall et al. (2000) *Arterioscler. Thromb, Vasc. Biol.* 20, 1185-1188
Tall et al. (2001) *J. Clin. Invest.* 108, 1273-1275
Tall et al. (2001) *J. Clin. Invest.* 108, 1273-1275
Tangirala et al. (1999) *Circulation*, 100, 1816-1822
Temel et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 26565-26572
The BIP study group (2000) *Circulation*, 102, 21-27
The International Task Force for Prevention of Coronary Heart Disease (1998) *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 8, 205-271
Thuahnai et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 43801-43808
Tribble et al. (1992) *Atherosclerosis*, 93, 189-199
Trigatti et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 9322-9327

Tu et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 23098-23105
Utermann et al. (1984) *Eur. J. Biochem.* 144, 325-331
Vakkilainen et al. (2002) *J. Lipid Res.* 43, 598-603
van Eck et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 6298-6303
Venkatachalapathi et al. (1993) *Proteins*, 15, 349-359
von Eckardstein A. (1996) *Curr Opin Lipidol.* 7, 308-319
von Eckardstein and Assmann (2000) *Curr Opin Lipidol.* 11, 627-637
von Eckardstein et al. (1995) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 690-701
von Eckardstein et al. (1996) *Biochim. Biophys. Acta*, 1301, 255-262
von Eckardstein et al. (2001) *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 13
Webb et al. (2002) *J. Lipid Res.* 43, 1890-1898
Whayne et al. (1981) *Atherosclerosis*, 39, 411-424
Yamashita et al. (1991) *Metabolism*, 40, 756-763
Yamazaki et al. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 5847-5853
Zhong et al. (1994) *Peptide Research*, 7(2): 99-106
(1984) *JAMA*, 251, 365-374

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A mediator of reverse cholesterol transport comprising a molecule comprising an acidic region, a lipophilic or aromatic region and a basic region, said molecule having a structure adapted to complex with HDL and/or low density lipoprotein-cholesterol (LDL) and thereby enhance reverse cholesterol transport.

2. The mediator of reverse cholesterol transport of Claim 1, wherein said molecule has between 3 and 10 amino acid residues or analogs thereof, and comprises the sequence:

X1-X2-X3, wherein X1 is an acidic amino acid, X2 is a lipophilic or aromatic amino acid, and X3 is a basic amino acid, and wherein X1, X2 and X3 may be arranged in any sequential order;

wherein an amino terminal further comprises a first protecting group selected from the group consisting of an acetyl, phenylacetyl, pivolyl, 9-fluorenylmethyloxycarbonyl, 2-napthylic acid, nicotinic acid, a CH_3—$(CH_2)_n$—CO— where n ranges from 3 to 20, di-tert-butyl-4-hydroxy-phenyl, naphthyl, substituted naphthyl, f-MOC, biphenyl, substituted phenyl, substituted heterocycles, alkyl, aryl, substituted aryl, cycloalkyl, fused cycloalkyl, saturated heteroaryl, and substituted saturated heteroaryl; and

wherein a carboxy terminal further comprises a second protecting group selected from the group consisting of an amine, such as RNH_2 where R = H, di-tert-butyl-4-hydroxy-phenyl, naphthyl, substituted naphthyl, f-MOC, biphenyl, substituted phenyl, substituted heterocycles, alkyl, aryl, substituted aryl, cycloalkyl, fused cycloalkyl, saturated heteroaryl, and substituted saturated heteroaryl.

3. The mediator of reverse cholesterol transport of Claim 2, wherein one or more of X1, X2 or X3 are D amino acid residues.

4. The mediator of reverse cholesterol transport of Claim 2, wherein one or more of X1, X2 or X3 are modified synthetic or semisynthetic amino acids.

5. The mediator of reverse cholesterol transport of claim 4, wherein the modified synthetic or semi-synthetic amino acid is biphenylalanine.

6. A substantially pure amino acid-derived substance for treating and/or preventing hypercholesterolemia and/or atherosclerosis in a mammal, said substance having an amino and a carboxy terminal and comprising an L or D enantiomer of an acidic amino

acid residue or derivative thereof, an L or D enantiomer of a lipophilic or aromatic amino acid residue or derivative thereof, and an L or D enantiomer of a basic amino acid residue or derivative thereof,

wherein the amino terminal further comprises a first protecting group selected from the group consisting of an acetyl, phenylacetyl, pivolyl, 9-fluorenylmethyloxycarbonyl, 2-napthylic acid, nicotinic acid, a CH_3—$(CH_2)_n$—CO— where n ranges from 3 to 20, di-tert-butyl-4-hydroxy-phenyl, naphthyl, substituted naphthyl, f-MOC, biphenyl, substituted phenyl, substituted heterocycles, alkyl, aryl, substituted aryl, cycloalkyl, fused cycloalkyl, saturated heteroaryl, substituted saturated heteroaryl, and the like;

wherein the carboxy terminal further comprises a second protecting group selected from the group consisting of an amine, such as RNH_2 where R = H, di-tert-butyl-4-hydroxy-phenyl, naphthyl, substituted naphthyl, f-MOC, biphenyl, substituted phenyl, substituted heterocycles, alkyl, aryl, substituted aryl, cycloalkyl, fused cycloalkyl, saturated heteroaryl, substituted saturated heteroaryl, and the like; and

wherein said substance has at least one of the following properties: (1) it mimicks ApoA-I binding to LDL and HDL, (2) it binds preferentially to liver, (3) it enhances LDL uptake by liver LDL-receptors, (4) it lower the levels of LDL, IDL, and VLDL cholesterol, (5) it increases the levels of HDL cholesterol, and (6) it enhances plasma lipoprotein profiles.

7. A composition suitable for oral administration that ameliorates or prevents a symptom of hypercholesterolemia, wherein said composition comprises an amino acid-derived molecule having an acidic region, a lipophilic or aromatic region and a basic region, and wherein said amino acid-derived molecule has a first protecting group attached to an amino terminal and a second protecting group attached to a carboxyl terminal, and wherein said amino acid-derived molecule optionally comprises at least one D amino acid residue.

8. The composition of Claim 7, which includes at least one D amino acid residue

9. A peptide mediator of RCT, comprising the sequence:

X_a-X_b-(X1-X2-X3)-X_c-X_d

wherein

X_a is an acylated amino acid residue;

X_b is any 0-10 amino acid residues;

X1-X2-X3 are amino acid residues or derivatives thereof selected independently from an acidic amino acid residue, a lipophilic amino acid residue, and a basic amino acid residue or derivative thereof, with the proviso that one of said X1, X2 or X3 is an acidic residue, one of said X1, X2 or X3 is a lipophilic residue and one of said X1, X2 or X3 is a basic residue;

X_c is any 0-10 amino acid residues;

X_d is an amidated amino acid residue; and

wherein the peptide mediator has 15 or fewer amino acid residues and optionally comprises at least one D amino acid residue.

10. An RCT mediator, comprising a compound selected from the group consisting of the synthetic compounds 1-96 of Table 5.

11. An RCT mediator, comprising a compound selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 1 and 107-117.

12. An RCT mediator, comprising a compound selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 1, 26-36, 42, 45-47, 56-58, 68-70, 72-74, 76, 80, 81, 83-90 and 92-95.

13. A pharmaceutical composition comprising SEQ ID NO: 1.

14. A pharmaceutical composition comprising SEQ ID NO: 113.

15. A pharmaceutical composition comprising SEQ ID NO: 34.

16. A pharmaceutical composition comprising SEQ ID NO: 86.

17. A pharmaceutical composition comprising SEQ ID NO: 91.

18. A pharmaceutical composition comprising SEQ ID NO: 96.

19. A pharmaceutical composition comprising SEQ ID NO: 145.

20. A pharmaceutical composition comprising SEQ ID NO: 146.

21. A pharmaceutical composition comprising SEQ ID NO: 118.

22. A composition of any of Claims 1-21 for use in the preparation of a medicament suitable for administration for the treatment of hypercholesterolemia and/or atherosclerosis.

23. The composition of Claim 22, wherein said medicament is suitable for oral administration.

24. The composition of Claim 22, wherein said medicament is combined with a bile acid-binding resin, niacin, a statin, or a combination thereof.

25. An *in vitro* screening method for identifying test compounds that are likely to enhance reverse cholesterol transport *in vivo*, comprising:

measuring cholesterol accumulation in liver cells *in vitro* in the presence and absence of the test compounds;

measuring cholesterol accumulation and/or efflux in AcLDL-loaded macrophages *in vitro* in the presence and absence of test compounds; and

identifying test compounds that enhance cholesterol accumulation in liver cells and reduce cholesterol levels in macrophages.

26. The *in vitro* screening method of Claim 25, further comprising measuring cholesterol levels in OxLDL-loaded vascular smooth muscle cells *in vitro* in the presence and absence of test compounds, and wherein the step of identifying test compounds further comprises identifying compounds that enhance cholesterol accumulation in liver cells and reduce cholesterol levels in macrophages and/or reduce cholesterol levels in vascular smooth muscle cells.

27. The *in vitro* screening method of Claim 25, wherein said liver cells are human HepG2 hepatoma cells.

28. The *in vitro* screening method of Claim 25, wherein said macrophages are human THP-1 cells.

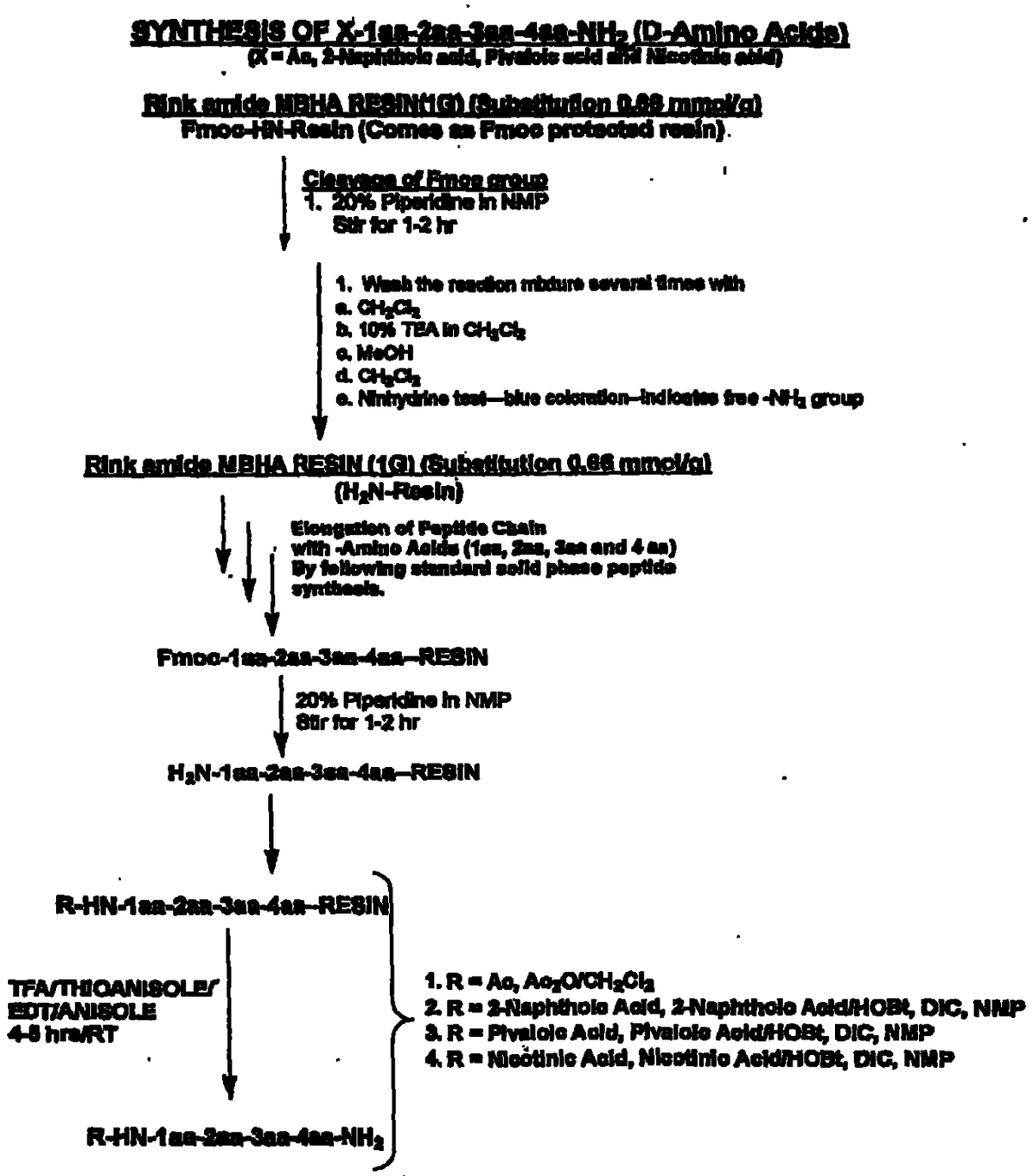
29. The *in vitro* screening method of Claim 26, wherein said vascular smooth muscle cells are primary aortic smooth muscle cells.

30. An *in vitro* screening method for identifying test compounds that are likely to enhance reverse cholesterol transport *in vivo*, comprising:

measuring cholesterol accumulation in liver cells *in vitro* in the presence and absence of the test compounds;

measuring cholesterol levels in AcLDL-loaded vascular smooth muscle cells *in vitro* in the presence and absence of test compounds; and

identifying test compounds that enhance cholesterol accumulation in liver cells and reduce cholesterol levels in vascular smooth muscle cells.



Schematic Representation of Solid Phase Peptide Synthesis

FIG. 1

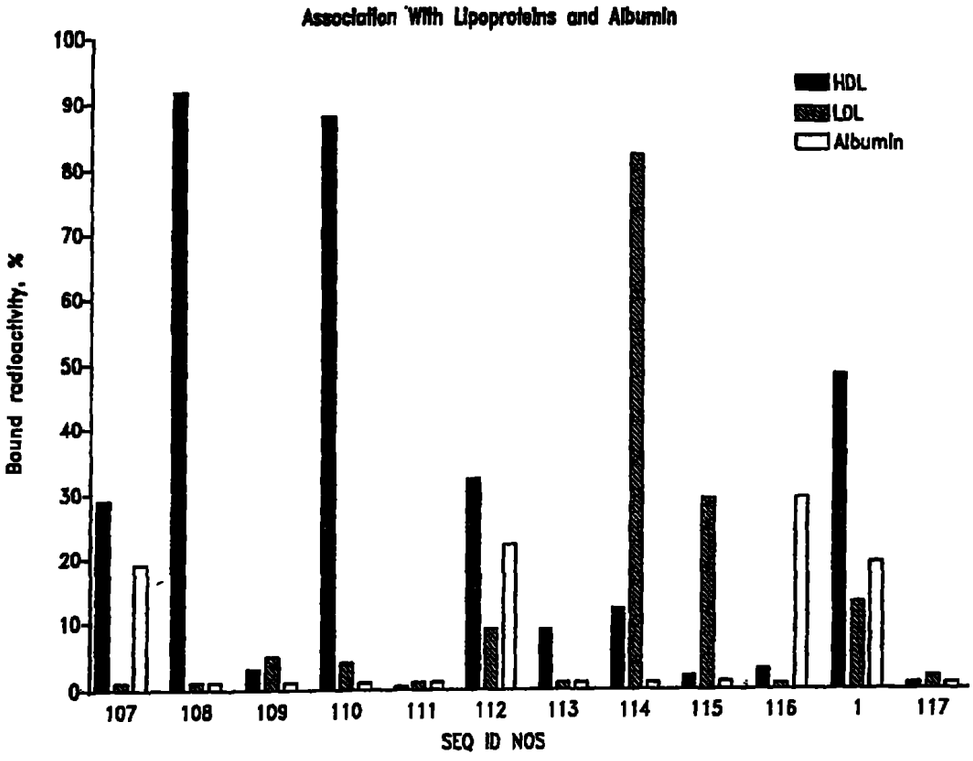

Association With Lipoproteins and Albumin
Bound radioactivity, %
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
HDL
LDL
Albumin
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
1
117
SEQ ID NOS

FIG. 2

WO 2004094471

PCT/US2004/013445

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

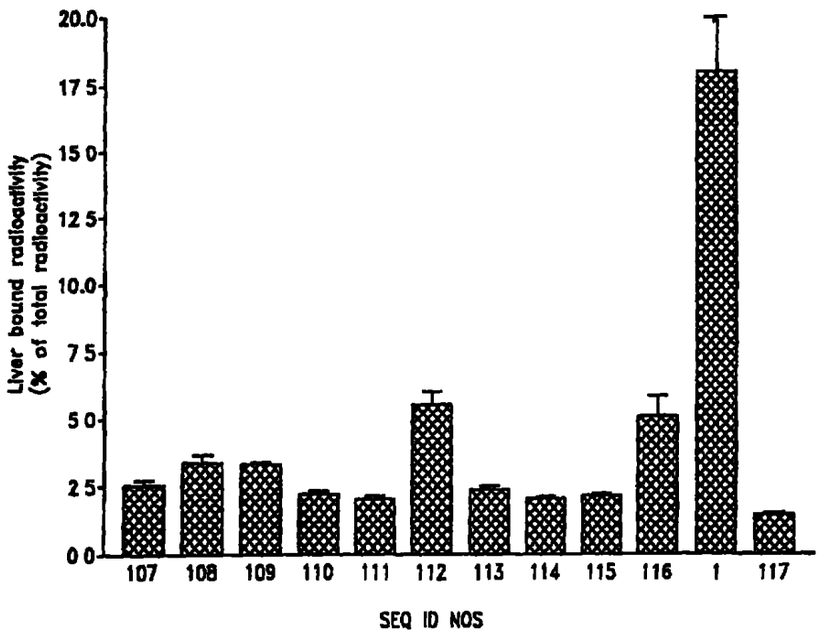


FIG. 3

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

FIG. 4

FIG. 5

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

FIG. 6

WO 2004/094471

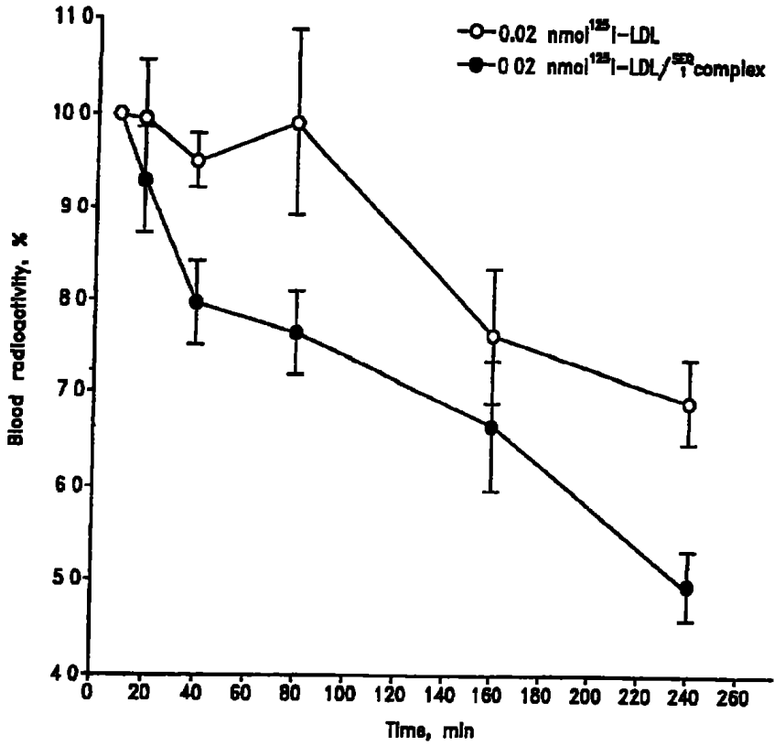


FIG. 7

PCT/US2004/013445

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

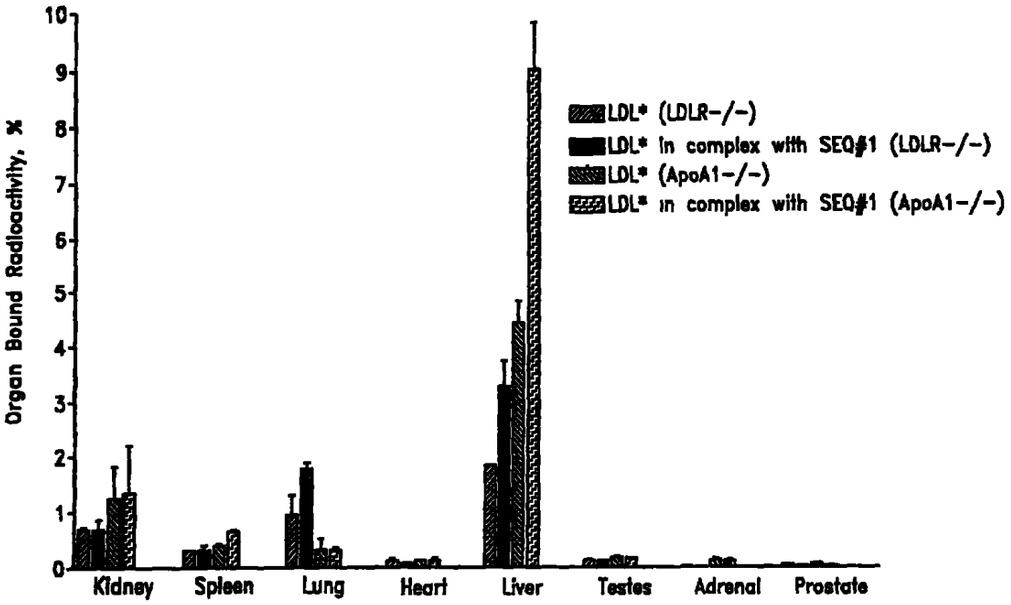


FIG. 8

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2004/094471

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

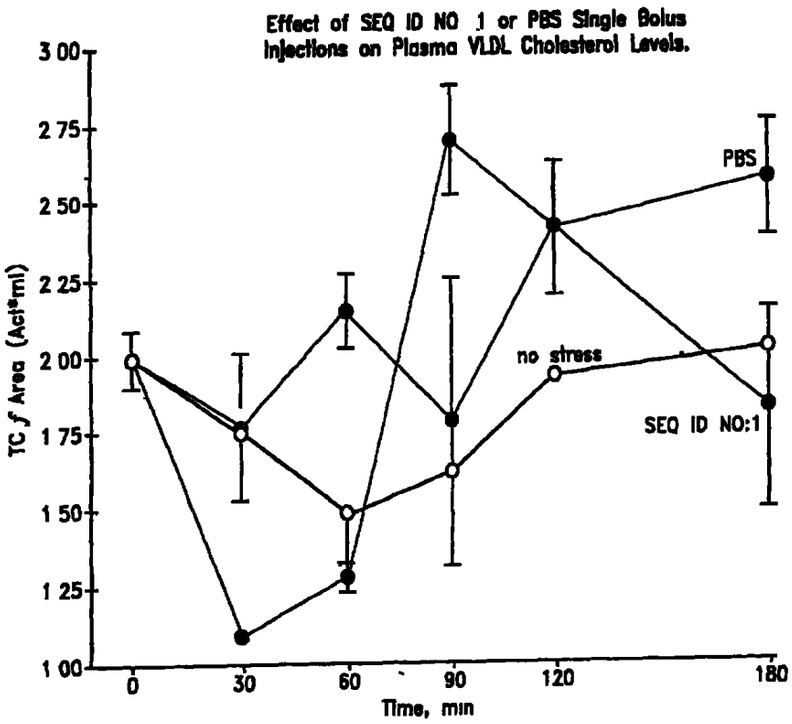


FIG. 9

PCT/US2004/012445

WO 2004/094471

PCT/US2004/012445

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

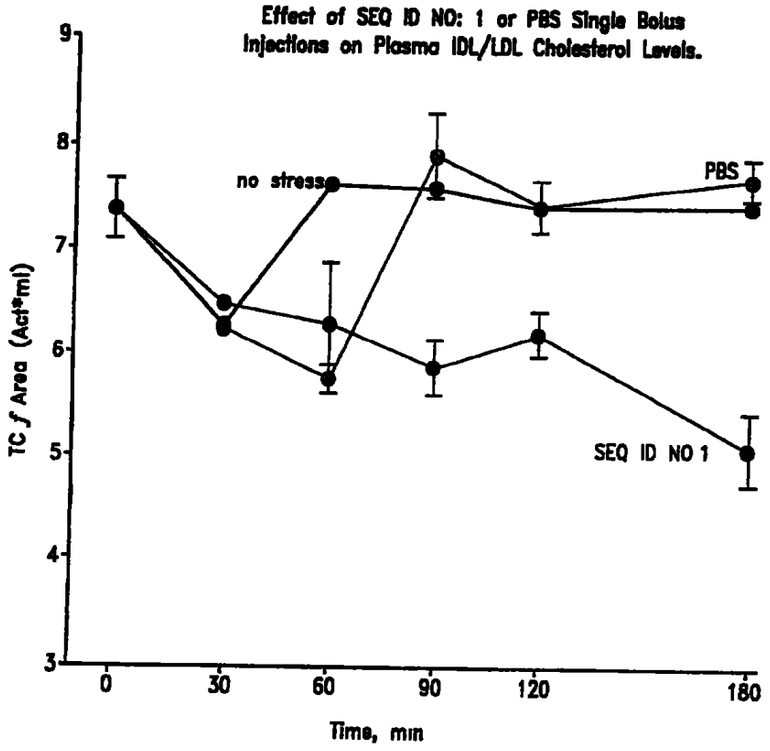


FIG. 10

WO 2004/094471

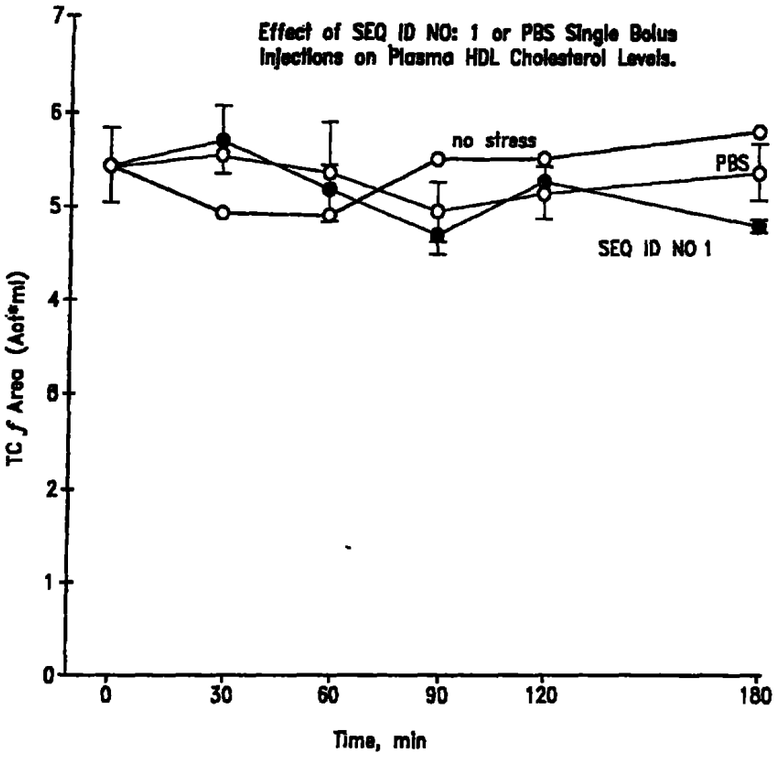


FIG. 11

PCT/US2004/012445

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2004094471

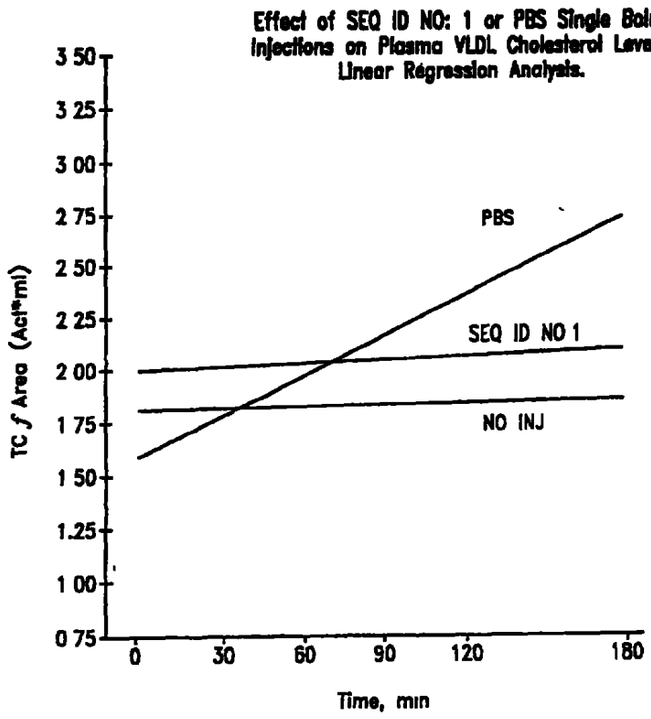


FIG. 12

PCT/US2004/012445

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2004/094471

PCT/US2004/012445

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

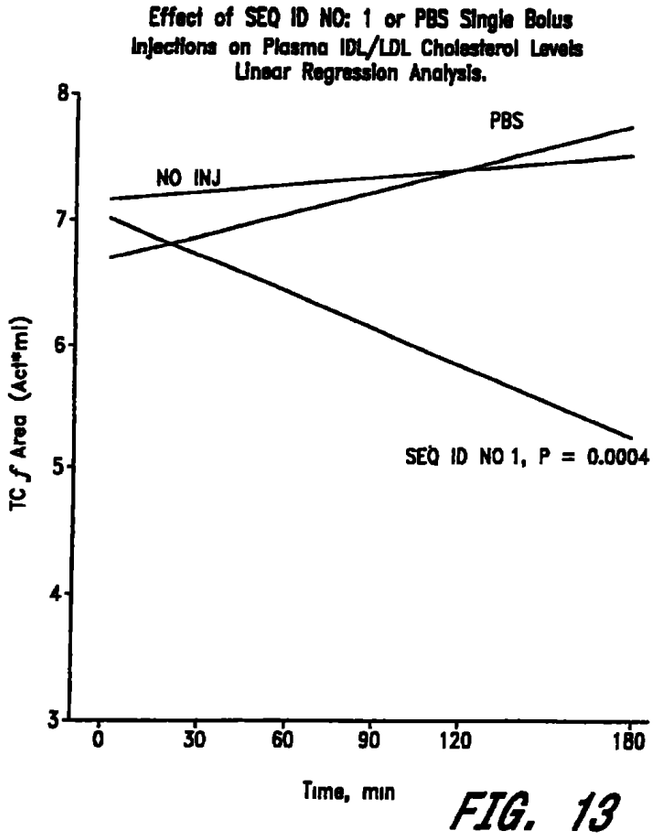


FIG. 13

WO 2004/094471

PCT/US2004/012443

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

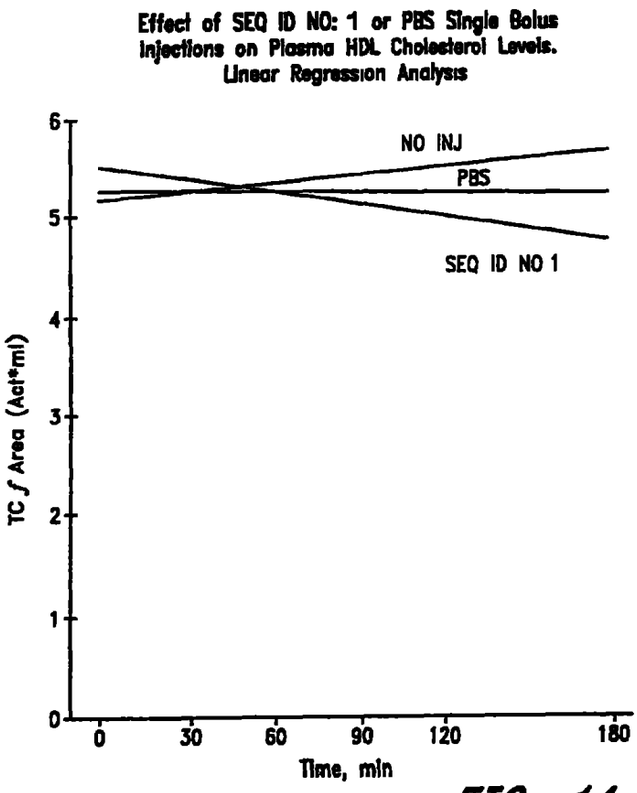


FIG. 14

WO 2004/094471

PCT/US2004/012445

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

FIG. 15

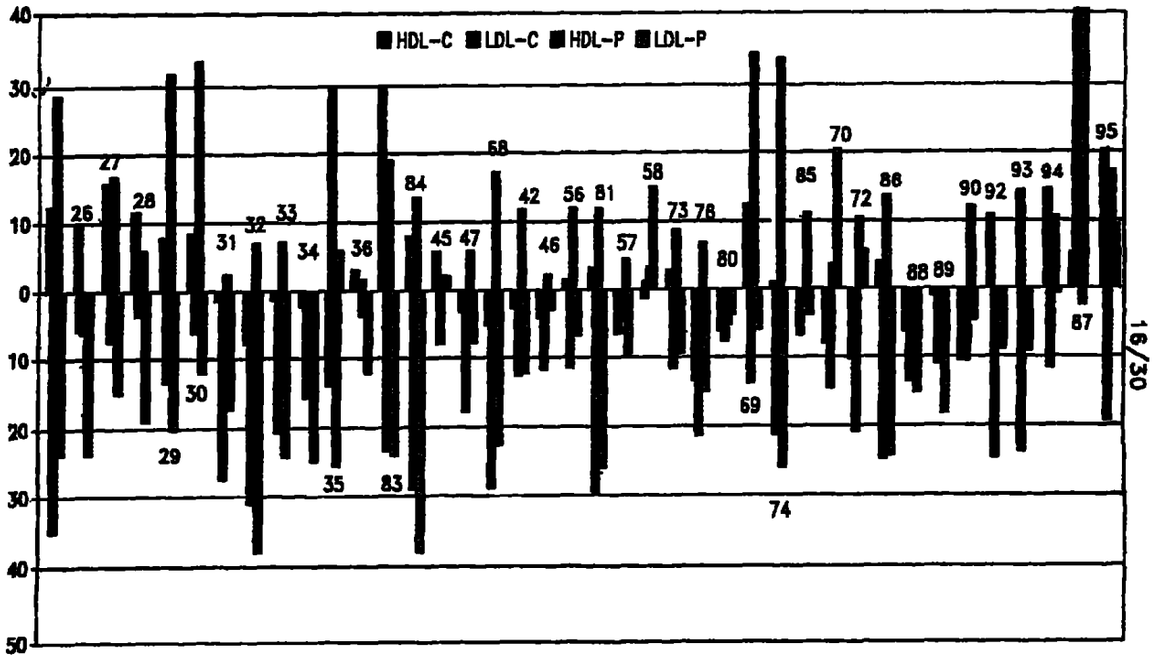


FIG. 16

WO 2004/094471
PCT/US2004/012445

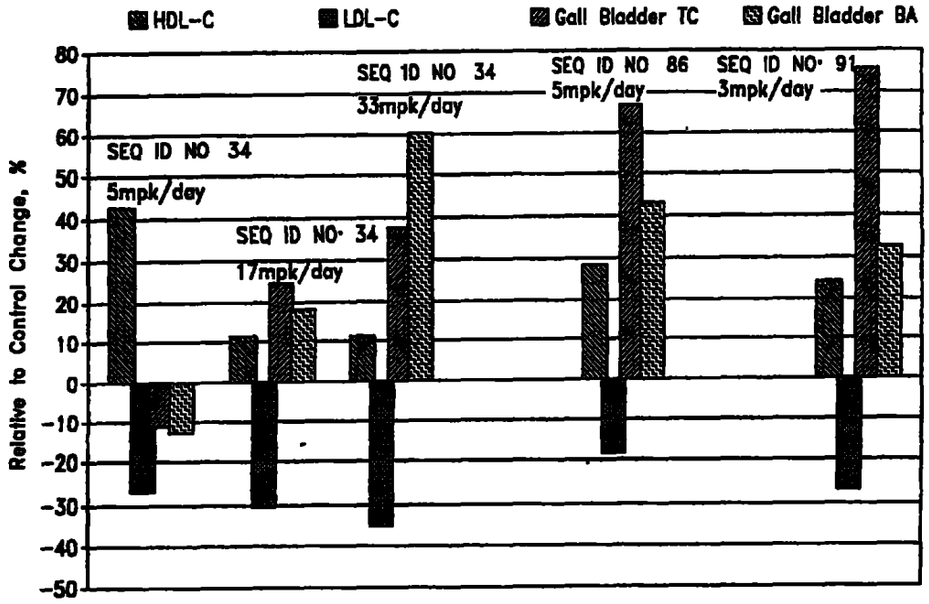

Effect of Continuous Administration (160Hr) of Selected Small Molecules Analogs on Mouse Plasma Lipoprotein Profile and Bile Cholesterol/Bile Acid content.
HDL-C
LDL-C
Gall Bladder TC
Gall Bladder BA
Relative to Control Change, %
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
-50
SEQ ID NO 34
5mpk/day
SEQ ID NO 34
17mpk/day
SEQ ID NO 34
33mpk/day
SEQ ID NO 86
5mpk/day
SEQ ID NO 91
3mpk/day

FIG. 17

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

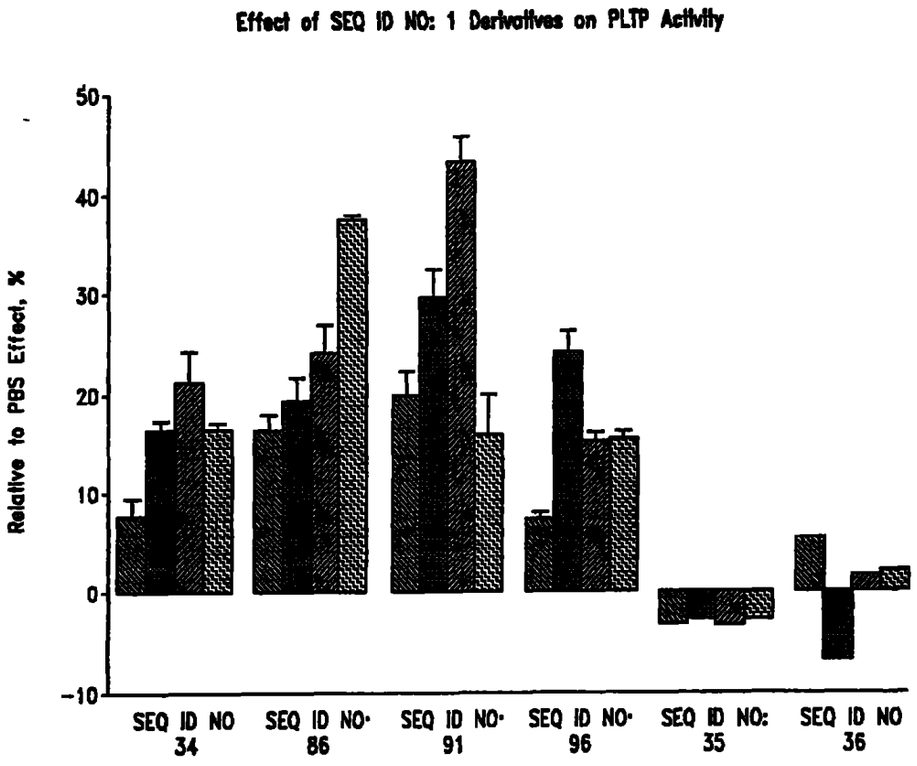


FIG. 18

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Acute Oral Administration of SEQ ID NO: 91.
Effecton on Mouse Plasma Lipoprotein Profile and Bile Acid/
Cholesterol in Bile. 90 Min After Administration.

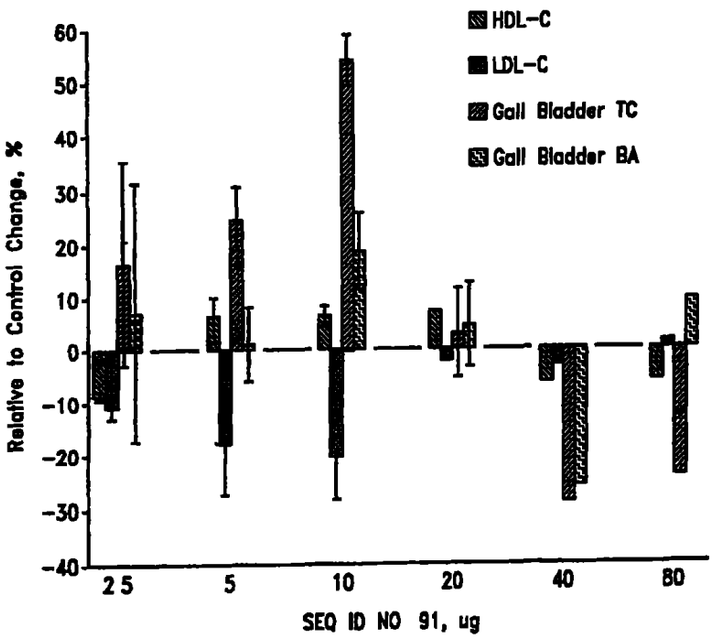


FIG. 19

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

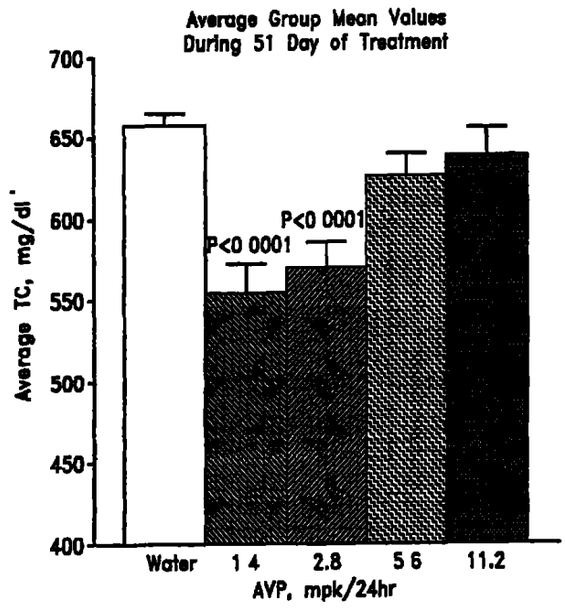


FIG. 20

WO 2004094471

PCT/US2004/012445

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

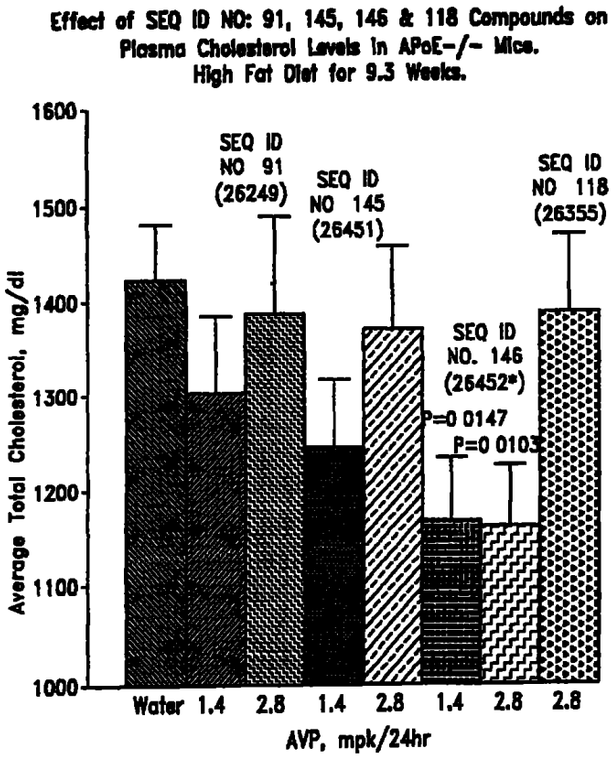


FIG. 21

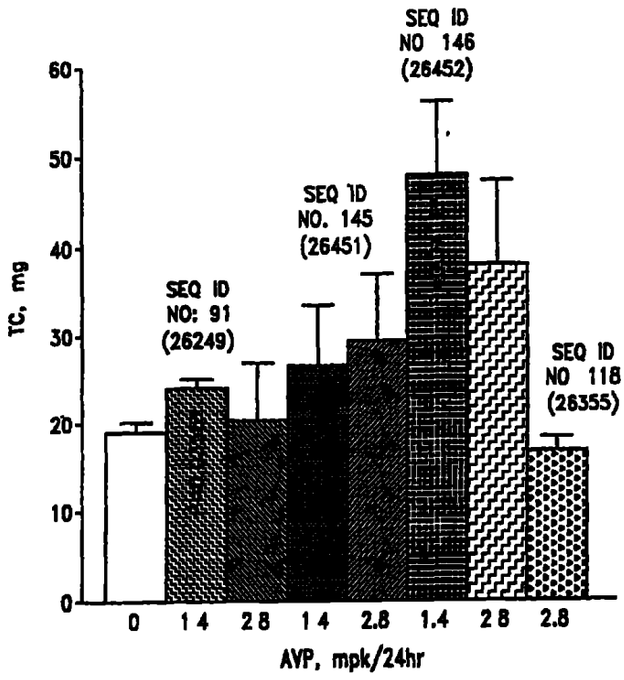

Effect of SEQ ID NOS: 91, 145, 146 & 118 on
Amount of Cholesterol Excreted by APoE-/- Mice
for 16 hr High Fat Diet
Total Amount Excreted
SEQ ID
NO 146
(26452)
SEQ ID
NO. 145
(26451)
SEQ ID
NO: 91
(26249)
SEQ ID
NO 118
(26355)
TC, mg
60
50
40
30
20
10
0
0
1.4
2.8
1.4
2.8
1.4
2.8
2.8
AVP, mpk/24hr

FIG. 22

Cell Culture In Vitro Triangle.
Foam cells formation
Macrophages
Aorta
THP-1
Primary SMC
Cholesterol
Cholesterol
LDL
Hepatocytes
HepG2

FIG. 23

Effect of AVP-26249 (SEQ ID NO: 91) and AVP-26452 (SEQ ID NO: 148) on LDL Mediated Accumulation of Total Cholesterol In HepG2 Cells.
Basal TC Level Is Subtracted.
25ug LDL ± Indicated In graph ug of AVP added per well.
AVP-26249
AVP-26452
P=0 0003
P=0 0401
P=0 0265
P=0 0204
P=0 0003
P=0 0061
TC, mg
0 8
0 7
0 6
0 5
0 4
0 3
0 2
0 1
0 0
0
25
2 5
10
25
2 5
10
AVP, ug

FIG. 24

WO 2004/094471

PCT/US2004/012445

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Effect of AVP-26249 (SEQ ID NO: 91) and Ac-LDL Mediated Accumulation of Total Cholesteryl Ester in Macrophages.

Basal TC and CE Level are Subtracted

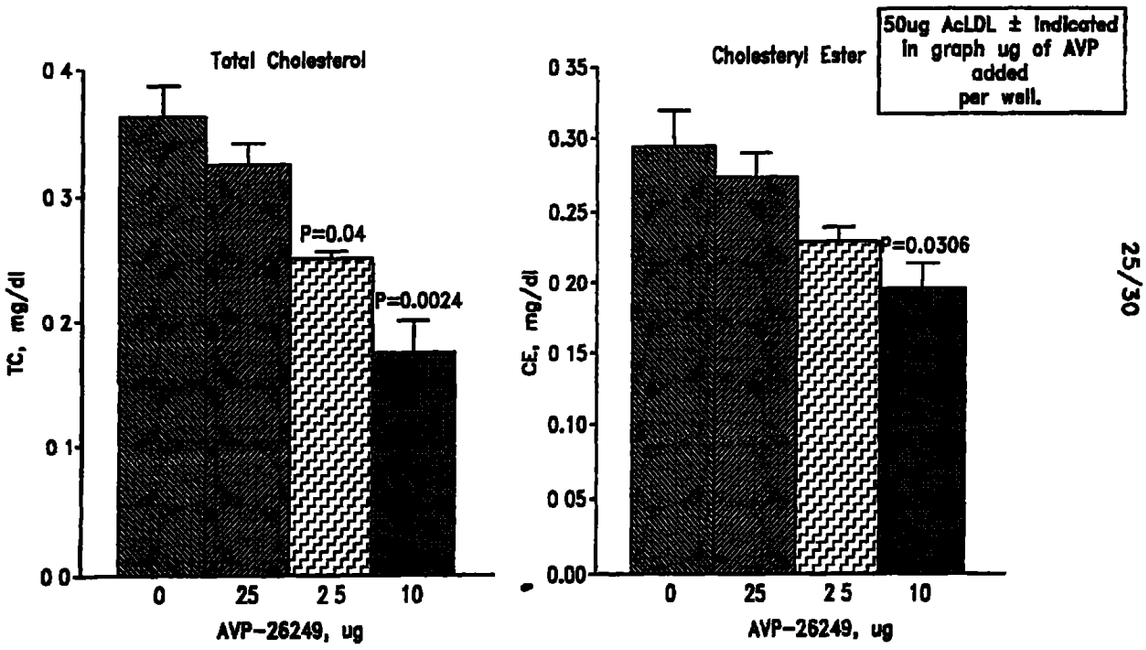


FIG. 25

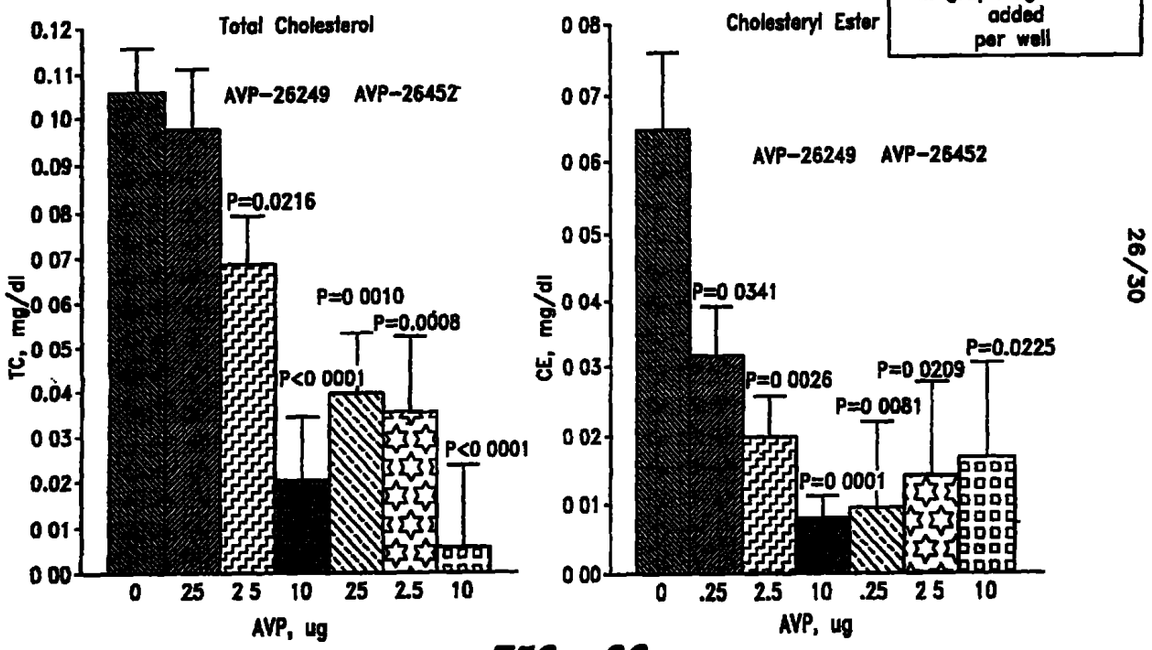


FIG. 26

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Effect of AVP-26249 (SEQ ID NO: 91) and AVP-26452 (SEQ ID NO: 146) on Cholesterol Efflux from AcLDL-Loaded Macrophages..

Basal TC and CE Level are Subtracted.

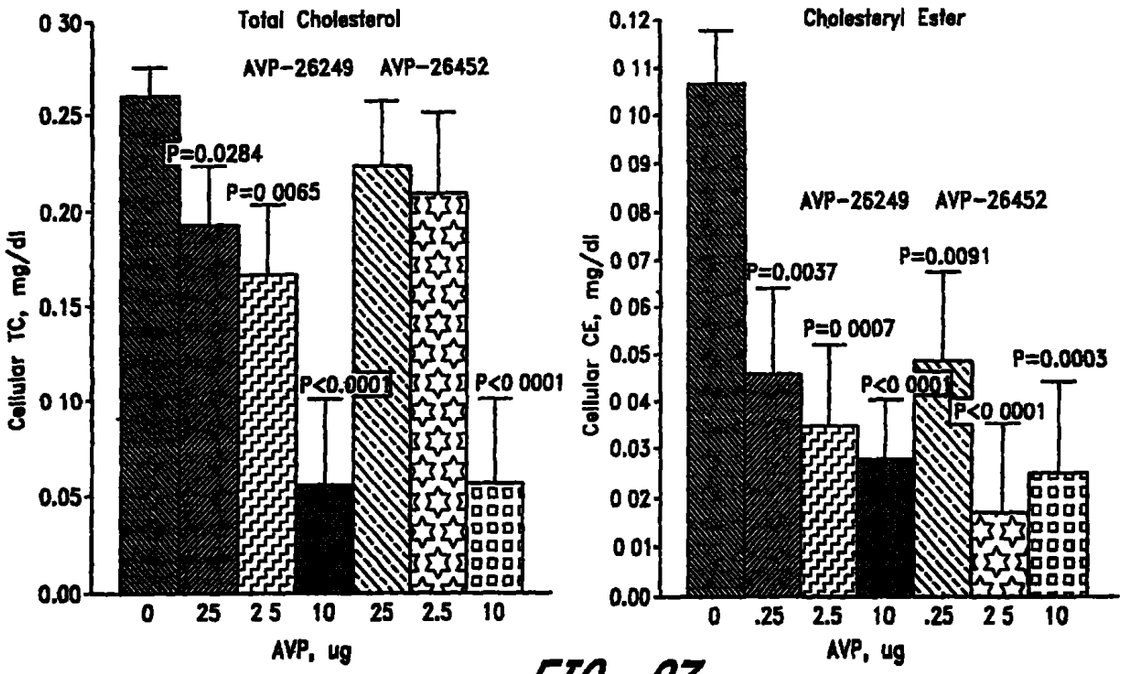


FIG. 27

Effect of (SEQ ID NO: 91) on Atherosclerotic Lesions Progression
In Aorta of ApoE-/- Mice
9.3 weeks HFD

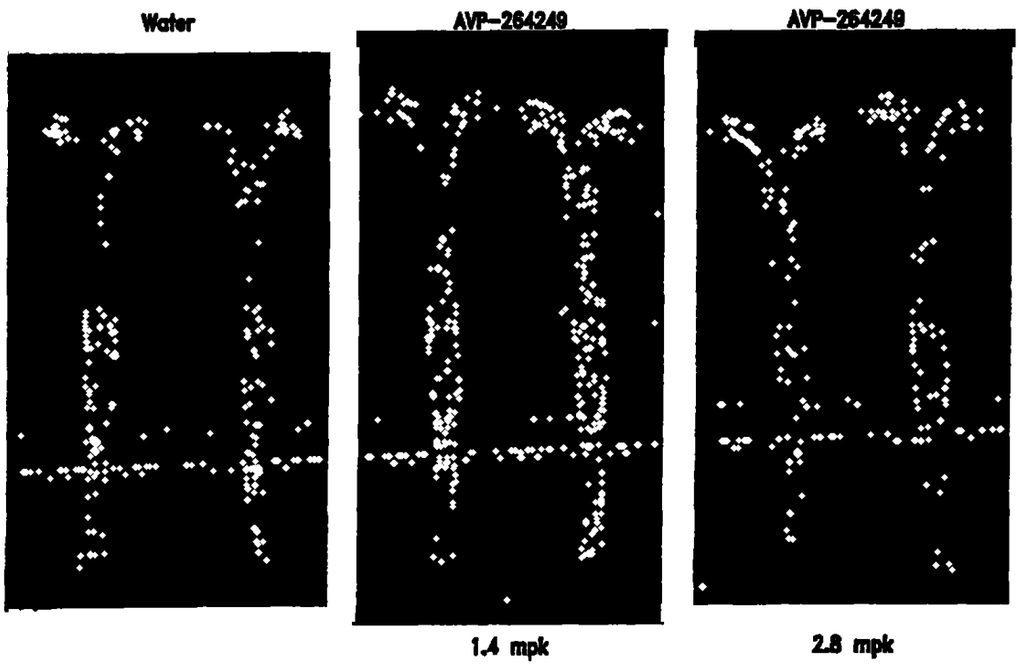


FIG. 28

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Effect of AVP-26452 (SEQ ID NO: 146) on Atherosclerotic Lesions Progression
in Aorta of ApoE-/- Mice.
9.3 weeks HFD

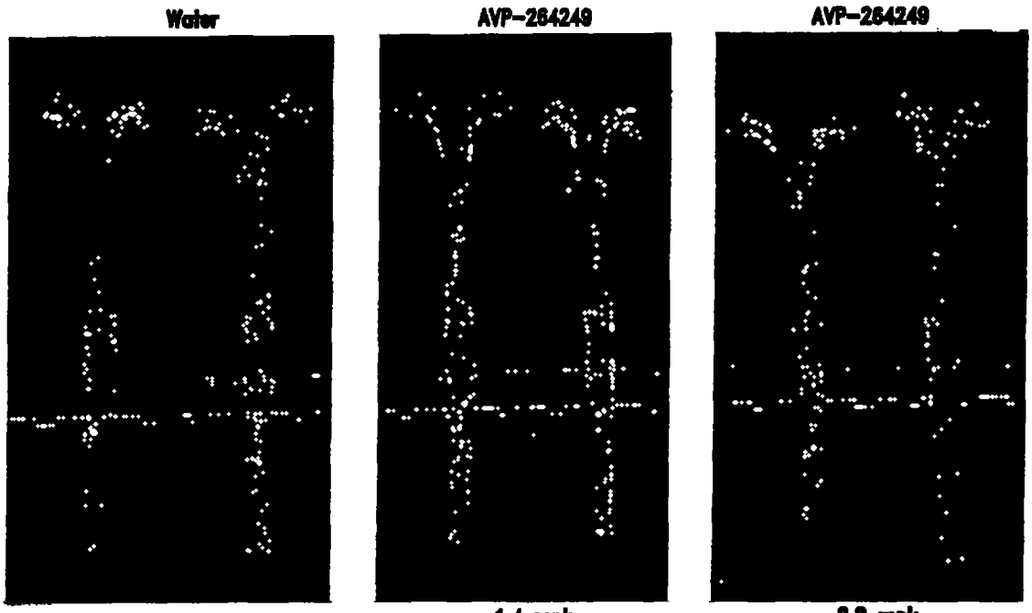


FIG. 29

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

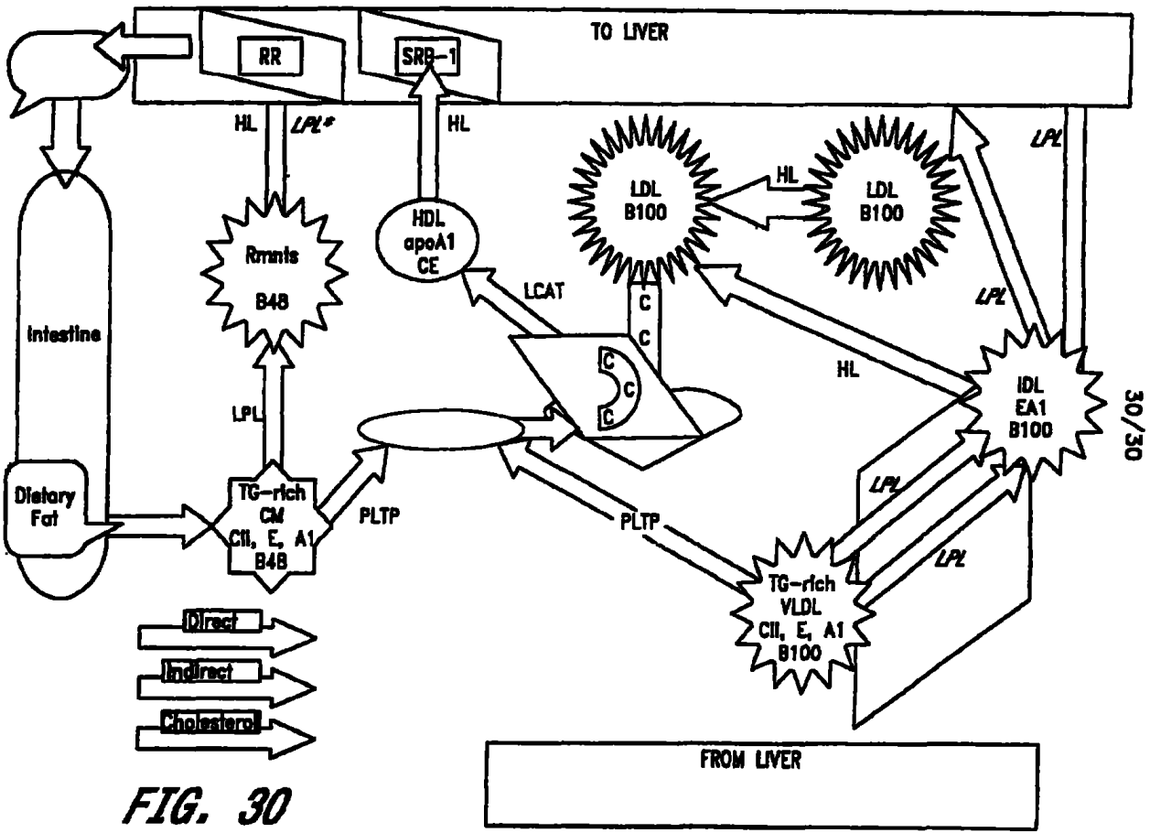

TO LIVER
RR
SRB-1
HL
LPL
HL
LDL
B100
HL
LDL
B100
LPL
Rmnts
B48
HDL
apoA1
CE
LCAT
C
C
C
C
C
LPL
HL
IDL
EA1
B100
Intestine
LPL
Dietary
Fat
TG-rich
CM
CII, E, A1
B48
PLTP
PLTP
LPL
LPL
TG-rich
VLDL
CII, E, A1
B100
Direct
Indirect
Cholesterol
FROM LIVER

FIG. 30

SEQUENCE LISTING

<110> AVANIR PHARMACEUTOCALS
Sircar, Jagadish
Alisala, Kashinatham
Nikoulin, Igor

<120> Mediators of Reverse Cholesterol
Transport for the Treatment of Hypercholesterolemia

<130> AVANIR.096VPC

<150> 60/464,667
<151> 2003-04-22

<160> 176

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (10)...(10)

<223> chemically synthesized peptide

<400> 1
Tyr Glu Phe Arg Asp Arg Met Arg Thr His
1 5 10

<210> 2
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (23)...(23)

<223> chemically synthesized peptide

<400> 2
Pro Val Ala Glu Glu Phe Arg Asp Arg Met Arg Thr His Val Asp Ser
1 5 10 15
Leu Arg Thr Gln Leu Ala Pro
20

<210> 3
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> ACETYLATION

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

<221> AMIDATION
<222> (20)...(20)

<223> chemically synthesized peptide

<400> 3
Glu Glu Phe Arg Asp Arg Met Arg Thr His Val Asp Ser Leu Arg Thr
1 5 10 15
Gln Leu Ala Pro
20

<210> 4
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (18)...(18)

<223> chemically synthesized peptide

<400> 4
Phe Arg Asp Arg Met Arg Thr His Val Asp Ser Leu Arg Thr Gln Leu
1 5 10 15
Ala Pro

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (17)...(17)

<223> chemically synthesized peptide

<400> 5
Arg Asp Arg Met Arg Thr His Val Asp Ser Leu Arg Thr Gln Leu Ala
1 5 10 15
Pro

<210> 6
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (13)...(13)

<223> chemically synthesized peptide

<400> 6
Arg Thr His Val Asp Ser Leu Arg Thr Gln Leu Ala Pro
1 5 10

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (12)...(12)

<223> chemically synthesized peptide

<400> 7
Thr His Val Asp Ser Leu Arg Thr Gln Leu Ala Pro
1 5 10

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (9)...(9)

<223> chemically synthesized peptide

<400> 8
Asp Ser Leu Arg Thr Gln Leu Ala Pro
1 5

<210> 9
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (14)...(14)

<223> chemically synthesized peptide

<400> 9
Pro Val Ala Glu Glu Phe Arg Asp Arg Met Arg Thr His Val
1 5 10

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (11)...(11)

<223> chemically synthesized peptide

<400> 10
Pro Val Ala Glu Glu Phe Arg Asp Arg Met Arg
1 5 10

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (10)...(10)

<223> chemically synthesized peptide

<400> 11
Pro Val Ala Glu Glu Phe Arg Asp Arg Met
1 5 10

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (9)...(9)

<223> chemically synthesized peptide

<400> 12
Pro Val Ala Glu Glu Phe Arg Asp Arg
1 5

<210> 13
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (6)...(6)

<223> chemically synthesized peptide

<400> 13

Pro Val Ala Glu Glu Phe
1 5

<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (5)...(5)

<223> chemically synthesized peptide

<400> 14
Pro Val Ala Glu Glu
1 5

<210> 15
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (14)...(14)

<223> chemically synthesized peptide

<400> 15
Met Arg Thr His Val Asp Ser Leu Arg Thr Gln Leu Ala Pro
1 5 10

<210> 16
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (18)...(18)

<223> chemically synthesized peptide

<400> 16
Pro Val Ala Glu Glu Phe Arg Asp Arg Met Arg Thr His Val Asp Ser
1 5 10 15
Leu Arg

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (7)...(7)

<223> chemically synthesized peptide

<400> 17
Trp Asp Lys Val Lys Asp Phe
1 5

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (11)...(11)

<223> chemically synthesized peptide

<400> 18
Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Ser
1 5 10

<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (11)...(11)

<223> chemically synthesized peptide

<400> 19
Tyr Leu Asp Glu Phe Gln Lys Lys Trp Lys Glu
1 5 10

<210> 20
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (14)...(14)

<223> chemically synthesized peptide

<400> 20
Thr Arg Asp Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Asp Trp

<210> 21
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (17)...(17)

<223> chemically synthesized peptide

<400> 21
Trp Asp Lys Val Lys Asp Phe Ala Asn Val Tyr Val Asp Ala Val Lys
1 5 10 15
Asp

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)...(1)
<223> N terminus is phenylacetylated

<221> AMIDATION
<222> (10)...(10)

<223> chemically synthesized peptide

<400> 22
Tyr Glu Phe Arg Asp Arg Met Arg Thr His
1 5 10

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (10)...(10)

<223> chemically synthesized peptide

<400> 23
Tyr Glu Phe Arg Asp Arg Met Arg Thr His
1 5 10

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(1)
<223> N-terminus is pivolylated

<221> AMIDATION
<222> (10)...(10)

<400> 24
Tyr Glu Phe Arg Asp Arg Met Arg Thr His
1 5 10

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (9)...(9)

<400> 25
Glu Phe Arg Asp Arg Met Arg Thr His
1 5

<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (7)...(7)

<400> 26
Glu Phe Arg Asp Arg Met Arg
1 5

<210> 27
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (8)...(8)

<400> 27

Phe Arg Asp Arg Met Arg Thr His
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> SITE
<222> (1)...(1)
<223> D-amino acid

<221> AMIDATION
<222> (9)...(9)

<221> SITE
<222> (9)...(9)
<223> D-amino acid

<400> 28
Tyr Phe Arg Asp Arg Met Arg Thr His
1 5

<210> 29
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> SITE
<222> (1)...(1)
<223> D-amino acid

<221> AMIDATION
<222> (8)...(8)

<400> 29
Glu Glu Phe Arg Asp Arg Met Arg
1 5

<210> 30
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> SITE
<222> (2)...(2)
<223> D-amino acid

<221> AMIDATION
<222> (8)...(8)

<221> SITE
<222> (8)...(8)
<223> D-amino acid.

<400> 30
Phe Arg Asp Arg Phe Arg Asp Arg
1 5

<210> 31
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (6)...(6)

<221> SITE
<222> (6)...(6)
<223> D-amino acid

<400> 31
Glu Phe Arg Asp Arg Met
1 5

<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (5)...(5)

<400> 32
Glu Phe Arg Asp Arg
1 5

<210> 33
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (4)...(4)

<400> 33
Glu Phe Arg Asp
1

<210> 34
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (3)...(3)

<400> 34
Glu Phe Arg
1

<210> 35
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> SITE
<222> (1)...(1)
<223> D-amino acid

<221> AMIDATION
<222> (7)...(7)

<221> SITE
<222> (7)...(7)
<223> D-amino acid

<400> 35
Arg Asp Arg Met Arg Thr His
1 5

<210> 36
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> SITE
<222> (1)...(1)
<223> D-amino acid

<221> AMIDATION

<222> (...(6)

<400> 36
Asp Arg Met Arg Thr His
1 5

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> SITE
<222> (2)...(2)
<223> D-amino acid

<221> AMIDATION
<222> (7)...(7)

<400> 37
Phe Arg Asp Arg Met Arg Thr
1 5

<210> 38
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (6)...(6)

<400> 38
Phe Arg Asp Arg Met Arg
1 5

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> SITE
<222> (2)...(2)
<223> D-amino acid

<221> AMIDATION
<222> (7)...(7)

<221> SITE

<222> (7)...(7)
<223> D-amino acid

<400> 39
Phe Phe Arg Asp Arg Met Arg
1 5

<210> 40
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (5)...(5)

<400> 40
Phe Arg Asp Arg Met
1 5

<210> 41
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (6)...(6)

<400> 41
Tyr Phe Arg Asp Arg Met
1 5

<210> 42
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (5)...(5)

<221> SITE
<222> (5)...(5)
<223> D-amino acid

<400> 42
Tyr Phe Arg Asp Arg
1 5

<210> 43
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (5)...(5)

<221> SITE
<222> (0)...(0)
<223> D-amino acid

<400> 43
Phe Arg Asp Arg Phe
1 5

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (9)...(9)

<400> 44
Glu Phe Arg Asp Arg Met Arg Thr Phe
1 5

<210> 45
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (6)...(6)

<221> SITE
<222> (6)...(6)
<223> D-amino acid

<400> 45
Glu Phe Arg Asp Arg Phe
1 5

<210> 46
<211> 6

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> SITE
<222> (2)...(2)
<223> D-amino acid

<221> SITE
<222> (4)...(4)
<223> D-amino acid

<221> AMIDATION
<222> (6)...(6)

<400> 46
Phe Arg Asp Arg Phe Phe
1 5

<210> 47
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> SITE
<222> (2)...(2)
<223> D-amino acid

<221> SITE
<222> (4)...(4)
<223> D-amino acid

<221> AMIDATION
<222> (6)...(6)

<400> 47
Phe Arg Asp Arg Phe Tyr
1 5

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> SITE
<222> (2)...(2)
<223> D-amino acid

<221> SITE

<222> (9)...(9)
<223> D-amino acid

<221> AMIDATION
<222> (9)...(9)

<400> 48
Phe Phe Asp Arg Phe Arg Asp Arg Phe
1 5

<210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> SITE
<222> (1)...(1)
<223> D-amino acids

<221> SITE
<222> (9)...(9)
<223> D-amino acid

<221> AMIDATION
<222> (9)...(9)

<400> 49
Met Arg Asp Arg Phe Arg Asp Arg Met
1 5

<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (9)...(9)

<400> 50
Phe Arg Asp Arg Phe Arg Asp Arg Phe
1 5

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (9)...(9)

<400> 51
Phe Arg Asp Arg Met Arg Asp Arg Met
1 5

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (9)...(9)

<400> 52
Met Arg Asp Arg Phe Arg Asp Arg Met
1 5

<210> 53
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> SITE
<222> (6)...(7)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (7)...(7)

<400> 53
Arg Met Arg Asp Arg Met Arg
1 5

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (9)...(9)

<400> 54
Phe Arg Asp Arg Met Arg Asp Arg Phe
1 5

<210> 55
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (11)...(11)

<400> 55
Glu Phe Arg Asp Arg Met Arg Asp Arg Phe Glu
1 5 10

<210> 56
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> SITE
<222> (3)...(3)
<223> D-amino acid

<221> AMIDATION
<222> (4)...(4)

<400> 56
Phe Arg Asp Arg
1

<210> 57
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (3)...(3)

<400> 57
Phe Arg Asp
1

<210> 58
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (4)...(4)

<400> 58
Tyr Phe Arg Asp
1

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> SITE
<222> (1)...(2)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (9)...(9)

<221> SITE
<222> (9)...(9)
<223> D-amino acid

<400> 59
Phe Arg Asp Arg Met Arg Asp Arg Met
1 5

<210> 60
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (5)...(5)

<400> 60
Met Arg Asp Arg Met
1 5

<210> 61
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION

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

<221> AMIDATION
<222> (5)...(5)

<221> SITE
<222> (1)...(1)
<223> D-amino acid

<400> 61
Met Arg Asp Arg Met
1 5

<210> 62
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (5)...(5)

<400> 62
Phe Arg Asp Arg Phe
1 5

<210> 63
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (5)...(5)

<221> SITE
<222> (5)...(5)
<223> D-amino acid

<400> 63
Phe Arg Asp Arg Phe
1 5

<210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION

<222> (7)...(7)

<400> 64
Arg Met Arg Asp Arg Met Arg
1 5

<210> 65
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (5)...(5)

<400> 65
Asp Arg Met Arg Asp
1 5

<210> 66
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> SITE
<222> (1)...(1)
<223> D-amino acid

<221> SITE
<222> (5)...(5)
<223> D-amino acid

<221> AMIDATION
<222> (5)...(5)

<400> 66
Asp Arg Met Arg Asp
1 5

<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> SITE
<222> (1)...(2)
<223> D-amino acids

<221> SITE
<222> (8)...(8)
<223> D-amino acid

<221> AMIDATION
<222> (9)...(9)

<400> 67
Phe Arg Asp Arg Met Arg Asp Arg Phe
1 5

<210> 68
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (6)...(6)

<400> 68
Arg Phe Glu Glu Phe Arg
1 5

<210> 69
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (5)...(5)

<221> SITE
<222> (5)...(5)
<223> D-amino acid

<400> 69
Phe Arg Thr Arg Phe
1 5

<210> 70
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (5)...(5)

<221> SITE
<222> (5)...(5)
<223> D-amino acid

<400> 70
Phe Arg Met Arg Phe
1 5

<210> 71
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> SITE
<222> (1)...(2)
<223> D-amino acids

<221> SITE
<222> (10)...(10)
<223> D-amino acid

<221> AMIDATION
<222> (10)...(10)

<400> 71
Glu Phe Arg Asp Arg Met Arg Asp Arg Phe
1 5 10

<210> 72
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (6)...(6)

<400> 72
Asp Arg Met Arg Asp Phe
1 5

<210> 73
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> SITE
<222> (1)...(4)

<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (13)...(13)

<400> 73
Tyr Tyr Tyr Pro Glu Phe Arg Asp Arg Met Arg Thr His
1 5 10

<210> 74
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> SITE
<222> (2)...(3)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (11)...(11)

<221> SITE
<222> (11)...(11)
<223> D-amino acid

<400> 74
Tyr Tyr Pro Glu Phe Arg Asp Arg Met Arg Thr
1 5 10

<210> 75
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> SITE
<222> (2)...(2)
<223> D-amino acid

<221> SITE
<222> (4)...(4)
<223> D-amino acid

<221> AMIDATION
<222> (12)...(12)

<221> SITE
<222> (12)...(12)
<223> D-amino acid

<400> 75
Tyr Tyr Tyr Pro Glu Phe Arg Asp Arg Met Arg Thr
1 5 10

<210> 76
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (8)...(8)

<221> SITE
<222> (8)...(8)
<223> D-amino acid

<400> 76
Glu Phe Arg Asp Arg Met Arg Tyr
1 5

<210> 77
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (11)...(11)

<400> 77
Tyr Tyr Tyr Pro Glu Phe Arg Asp Arg Met Arg
1 5 10

<210> 78
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (7)...(7)

<221> SITE
<222> (7)...(7)
<223> D-amino acid

<400> 78
Tyr Glu Phe Arg Asp Arg Met
1 5

<210> 79
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> SITE
<222> (1)...(1)
<223> D-amino acid

<221> SITE
<222> (4)...(4)
<223> D-amino acid

<221> AMIDATION
<222> (10)...(10)

<221> SITE
<222> (10)...(10)
<223> D-amino acid

<400> 79
Tyr Tyr Tyr Pro Glu Phe Arg Asp Arg Met
1 5 10

<210> 80
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (6)...(6)

<221> SITE
<222> (6)...(6)
<223> D-amino acid

<400> 80
Glu Phe Arg Asp Arg Tyr
1 5

<210> 81
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (5)...(5)

<221> SITE
<222> (5)...(5)
<223> D-amino acid

<400> 81
Glu Phe Arg Asp Tyr
1 5

<210> 82
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> SITE
<222> (1)...(1)
<223> D-amino acid

<221> SITE
<222> (4)...(4)
<223> D-amino acid

<221> AMIDATION
<222> (8)...(8)

<400> 82
Tyr Tyr Tyr Pro Glu Phe Arg Asp
1 5

<210> 83
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (4)...(4)

<400> 83
Glu Phe Arg Tyr
1

<210> 84
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> SITE
<222> (1)...(1)
<223> D-amino acid

<221> AMIDATION
<222> (6)...(6)

<400> 84
Tyr Tyr Pro Glu Phe Arg
1 5

<210> 85
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> SITE
<222> 1, 4, 9
<223> D-amino acid

<221> AMIDATION
<222> 9

<400> 85
Tyr Tyr Tyr Pro Glu Phe Arg Asp Arg
1 5

<210> 86
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> SITE
<222> (1)...(3)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (3)...(3)

<400> 86
Glu Arg Phe
1

<210> 87
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> 6

<400> 87
Glu Glu Phe Arg Asp Arg
1 5

<210> 88
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> 1

<221> AMIDATION
<222> 3

<400> 88
Glu Tyr Arg
1

<210> 89
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> 1

<221> MOD_RES
<222> 2
<223> modified Phe: 2-naphthyl-methyl glycine

<221> AMIDATION
<222> 3

<400> 89
Glu Phe Arg
1

<210> 90
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> 1

<221> MOD_RES
<222> 2
<223> Phe=L-1-b-naphthylalanine

<221> AMIDATION
<222> 3

<400> 90
Glu Phe Arg
1

<210> 91
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> 1

<221> MOD_RES
<222> 2
<223> Phe=biphenylalanine

<221> AMIDATION
<222> 3

<400> 91
Glu Phe Arg
1

<210> 92
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<400> 92
Glu Phe Arg
1

<210> 93
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> 1

<400> 93
Glu Phe Arg
1

<210> 94
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> AMIDATION
<222> 3

<400> 94
Glu Phe Arg
1

<210> 95
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> 1

<221> AMIDATION
<222> 3

<400> 95
Arg Phe Glu
1

<210> 96
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> 1

<221> SITE
<222> (1)...(3)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> 3

<400> 96
Glu Phe Arg
1

<210> 97
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> 1
<223> 2-naphthylic acid capped

<221> AMIDATION
<222> 3

<400> 97
Glu Phe Arg

FF-158

1

<210> 98
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> 1

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> 4

<400> 98
Tyr Glu Phe Arg
1

<210> 99
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> 1
<223> 2-naphthylic acid capped

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> 4

<400> 99
Glu Phe Arg Tyr
1

<210> 100
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> 1
<223> N-terminus is pivolylated

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> 4

<400> 100
Glu Phe Arg Tyr
1

<210> 101
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> 1
<223> N-terminus modified with
9-fluorenylmethyloxycarbonyl

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> 4

<400> 101
Glu Phe Arg Tyr
1

<210> 102
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> 1
<223> 2-naphthylic acid capped

<221> SITE
<222> (1)...(3)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> 3

<400> 102
Glu Arg Phe
1

<210> 103
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> 1
<223> 2-naphthylic acid capped

<221> SITE

<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> 4

<400> 103
Tyr Glu Phe Arg
1

<210> 104
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> 1
<223> N-terminus is pivolylated

<221> AMIDATION
<222> 3

<400> 104
Glu Phe Arg
1

<210> 105
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> 1
<223> N-terminus modified with nicotinic acid

<221> AMIDATION
<222> 3

<400> 105
Glu Phe Arg
1

<210> 106
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> di-tert-butyl-4-hydroxy-phenylalanine

<221> MOD_RES
<222> (4)...(4)
<223> Phe-biphenylalanine

<221> AMIDATION

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

<400> 106
Phe Glu Glu Phe Arg
1 5

<210> 107
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(0)

<221> AMIDATION
<222> (9)...(0)

<400> 107
Tyr Trp His Val Trp Gln Gln Asp Glu
1 5

<210> 108
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(0)

<221> AMIDATION
<222> (9)...(0)

<400> 108
Tyr Gln Trp Asp Lys Val Lys Asp Phe
1 5

<210> 109
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(0)

<221> AMIDATION
<222> (9)...(0)

<400> 109
Glu Asn Trp Asp Thr Leu Gly Ser Tyr
1 5

<210> 110
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

162

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(0)

<221> AMIDATION
<222> (11)...(0)

<400> 110
Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Ser
1 5 10

<210> 111
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(0)

<221> AMIDATION
<222> (17)...(0)

<400> 111
Val Arg Gln Glu Met Asn Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Gln Lys Val
1 5 10 15
Tyr

<210> 112
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(0)

<221> AMIDATION
<222> (12)...(0)

<400> 112
Tyr Gln Met Arg Glu Ser Leu Ala Gln Arg Leu Tyr
1 5 10

<210> 113
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(0)

<221> AMIDATION
<222> (15)...(0)

<400> 113
Thr Arg Asp Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Asp Trp Tyr
1 5 10 15

<210> 114
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(0)

<221> AMIDATION
<222> (10)...(0)

<400> 114
Asp Glu Phe Gln Lys Lys Trp Lys Glu Tyr
1 5 10

<210> 115
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(0)

<221> AMIDATION
<222> (12)...(0)

<400> 115
Trp Lys Glu Asp Val Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val
1 5 10

<210> 116
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(0)

<221> AMIDATION
<222> (13)...(0)

<400> 116
Tyr Ser Leu Ala Gln Arg Leu Ala Glu Leu Lys Ser Tyr
1 5 10

<210> 117
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(0)

<221> AMIDATION
<222> (13)...(0)

<400> 117
Gln Glu Ser Ala Arg Gln Lys Leu Gln Glu Leu Gln Tyr
1 5 10

<210> 118
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (4)...(4)

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<400> 118
Tyr Glu Arg Phe
1

<210> 119
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(1)

<221> AMIDATION
<222> (3)...(3)

<221> SITE
<222> (1)...(3)
<223> D-amino acids

<400> 119
Arg Phe Glu
1

<210> 120
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(1)
<223> N-terminus modified with
9-fluorenylmethyloxycarbonyl

<400> 120
Glu Phe Arg
1

<210> 121
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(1)
<223> N-terminus modified with nicotinic acid

<221> AMIDATION
<222> (4)...(4)

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<400> 121
Tyr Glu Arg Phe
1

<210> 122
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(1)
<223> N-terminus modified with nicotinic acid

<221> MOD_RES
<222> (2)...(2)
<223> Phe-biphenylalanine

<221> AMIDATION
<222> (3)...(3)

<400> 122
Glu Phe Arg
1

<210> 123
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(0)

<221> AMIDATION
<222> (4)...(4)

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<400> 123
Glu Arg Phe Tyr
1

<210> 124
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> N-terminus modified with nicotinic acid

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (4)...(4)

<400> 124
Glu Arg Phe Tyr
1

<210> 125
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> 2-naphthylic acid capped

<221> MOD_RES
<222> (2)...(2)
<223> Phe-biphenylalanine

<221> AMIDATION
<222> (3)...(3)

<400> 125
Glu Phe Arg
1

<210> 126
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> N-terminus modified with nicotinic acid

<221> SITE
<222> (1)...(3)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (3)...(3)

<400> 126
Glu Phe Arg
1

<210> 127
<211> 1
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<400> 127
Phe
1

<210> 128
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> Glu=di-tert-butyl-Glu

<221> MOD_RES
<222> (2)...(2)
<223> Phe=biphenylalanine

<221> AMIDATION
<222> (3)...(3)

<400> 128
Glu Phe Arg
1

<210> 129
<211> 1
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> 3-(1-naphthyl)-L-alanine

<400> 129
Ala

<210> 130
<211> 1
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> 3-(1-naphthyl)-D-alanine

<400> 130
Ala
1

<210> 131
<211> 1
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> 3-(2-naphthyl)-L-alanine

<400> 131
Ala
1

<210> 132
<211> 1
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> 3-(2-naphthyl)-D-alanine

<400> 132
Ala
1

<210> 133
<211> 2
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> Phe=4,4'-biphenylalanine

<221> AMIDATION
<222> (2)...(0)

<400> 133
Phe Ala
1

<210> 134
<211> 2
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> Phe=4,4'-biphenylalanine

<221> SITE
<222> (2)...(0)
<223> D-amino acid

<221> AMIDATION
<222> (2)...(0)

<400> 134
Phe Ala
1

<210> 135
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> N-terminus modified with nicotinic acid

<221> SITE
<222> (1)...(3)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (3)...(0)

<400> 135
Phe Arg Glu
1

<210> 136
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> 1-naphthalic acid capped

<221> SITE
<222> (1)...(4)

<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (4)...(0)

<400> 136
Glu Arg Phe Tyr
1

<210> 137
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> 1-naphthylic acid capped

<221> MOD_RES
<222> (2)...(0)
<223> Phe=biphenylalanine

<221> AMIDATION
<222> (3)...(0)

<400> 137
Glu Phe Arg
1

<210> 138
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> N-terminus modified with nicotinic acid

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (4)...(0)

<400> 138
Tyr Phe Arg Glu
1

<210> 139
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(0)

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (4)...(0)

<400> 139
Tyr Phe Arg Glu
1

<210> 140
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> N-terminus modified with nicotinic acid

<221> SITE
<222> (1)...(3)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (3)...(0)

<400> 140
Glu Arg Phe
1

<210> 141
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> 2-naphthylic acid capped

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<400> 141
Glu Phe Arg Tyr
1

<210> 142
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)

<223> phe=3,5-di-tert-butyl-phenylalanine

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (0)...(0)

<400> 142
Phe Arg Glu Tyr
1

<210> 143
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> N-terminus modified with nicotinic acid

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (4)...(0)

<400> 143
Phe Arg Glu Tyr
1

<210> 144
<211> 2
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> N-terminus modified with nicotinic acid

<221> SITE
<222> (1)...(2)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (2)...(0)

<400> 144
Phe Arg
1

<210> 145
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(0)

<221> MOD_RES
<222> (2)...(0)
<223> Phe-biphenylalanine

<221> AMIDATION
<222> (3)...(0)

<221> SITE
<222> (1)...(1)
<223> D-amino acid

<221> SITE
<222> (3)...(3)
<223> D-amino acid

<400> 145
Glu Phe Arg
1

<210> 146
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(0)

<221> MOD_RES
<222> (2)...(0)
<223> phe-biphenylalanine

<221> AMIDATION
<222> (3)...(0)

<221> SITE
<222> (1)...(3)
<223> D-amino acids

<400> 146
Glu Phe Arg
1

<210> 147
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> Isoxazole-glutaminc acid

<221> MOD_RES
<222> (2)...(0)
<223> Phe-biphenylalanine

<221> AMIDATION
<222> (3)...(0)

<221> SITE
<222> (1)...(3)
<223> D-amino acids

<400> 147
Glu Phe Arg
1

<210> 148
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> 1-naphthylic acid capped

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (4)...(0)

<400> 148
Arg Phe Glu Tyr
1

<210> 149
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> 1-naphthylic acid capped

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (4)...(0)

<400> 149
Phe Arg Glu Tyr
1

<210> 150
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(0)

<221> MOD_RES
<222> (2)...(0)
<223> Phe-biphenylalanine

<400> 150
Glu Phe Arg
1

<210> 151
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> 3,5-di-tert-butyl-glutamic acid

<221> AMIDATION
<222> (3)...(0)

<221> SITE
<222> (1)...(3)
<223> D-amino acids

<400> 151
Glu Arg Phe
1

<210> 152
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(0)

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (4)...(0)

<400> 152
Phe Arg Glu Tyr
1

<210> 153
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION

<222> (1)...(0)

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (4)...(0)

<400> 153
Arg Phe Glu Tyr
1

<210> 154
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> 3,5-di-tert-butyl-phenylalanine

<221> SITE
<222> (1)...(3)
<223> D-amino acid

<221> AMIDATION
<222> (3)...(0)

<400> 154
Phe Glu Arg
1

<210> 155
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> Isoxazole-Arg

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (4)...(0)

<400> 155
Arg Glu Phe Tyr
1

<210> 156
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(0)

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (4)...(0)

<400> 156
Arg Glu Phe Tyr
1

<210> 157
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> N-terminus modified with nicotinic acid

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (4)...(0)

<400> 157
Arg Glu Phe Tyr
1

<210> 158
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> 3,5-di-tert-butyl-arginine

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (4)...(0)

<400> 158
Arg Glu Phe Tyr
1

<210> 159
<211> 3
<212> PRT

178

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> Isoxazole-phenylalanine

<221> SITE
<222> (1)...(3)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (3)...(0)

<400> 159
Phe Glu Arg
1

<210> 160
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> Isoxazole-tyrosine

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (4)...(0)

<400> 160
Tyr Arg Glu Phe
1

<210> 161
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> N-terminus modified with nicotinic acid

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (0)...(0)

<400> 161
Tyr Arg Glu Phe
1

<210> 162
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> 3,5-di-tert-butyl-phenylalanine

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (4)...(0)

<400> 162
Phe Glu Arg Tyr
1

<210> 163
<211> 2
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> 3,5-di-tert-butyl-phenylalanine

<221> SITE
<222> (1)...(2)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (2)...(0)

<400> 163
Phe Arg
1

<210> 164
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> Isoxazole-phenylalanine

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (4)...(0)

<400> 164
Phe Glu Arg Tyr
1

<210> 165
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> 3,5-di-tert-butyl-arginine

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (4)...(0)

<400> 165
Arg Phe Glu Tyr
1

<210> 166
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(0)

<221> AMIDATION
<222> (4)...(0)

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<400> 166
Phe Glu Arg Tyr
1

<210> 167
<211> 2
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> 3,5-di-tert-butyl-arginine

<221> AMIDATION
<222> (2)...(0)

<221> SITE

<222> (1)...(2)
<223> D-amino acids

<400> 167
Arg Phe
1

<210> 168
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> N-terminus modified with nicotinic acid

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (4)...(0)

<400> 168
Tyr Phe Glu Arg
1

<210> 169
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> Isoxazole-tyrosine

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (4)...(0)

<400> 169
Tyr Phe Glu Arg
1

<210> 170
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> N-terminus modified with nicotinic acid

<221> SITE
<222> (1)...(3)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (3)...(0)

<400> 170
Phe Glu Arg
1

<210> 171
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> 3,5-di-tert-butyl-tyrosine

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (4)...(0)

<400> 171
Tyr Phe Glu Arg
1

<210> 172
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> Isoxazole-arginine

<221> SITE
<222> (1)...(3)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (3)...(0)

<400> 172
Arg Phe Glu
1

<210> 173
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> 1-naphthylic acid capped

<221> SITE
<222> (1)...(4)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (4)...(0)

<400> 173
Tyr Phe Glu Arg
1

<210> 174
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> 1-naphthylic acid capped

<221> SITE
<222> (1)...(3)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (3)...(0)

<400> 174
Arg Phe Glu
1

<210> 175
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> MOD_RES
<222> (1)...(0)
<223> N-terminus modified with nicotinic acid

<221> SITE
<222> (1)...(3)
<223> D-amino acids

<221> AMIDATION
<222> (3)...(0)

<400> 175
Arg Phe Glu
1

<210> 176
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized peptide

<221> ACETYLATION
<222> (1)...(0)

<221> MOD_RES
<222> (2)...(0)
<223> 4-I-phenylalanine

<221> AMIDATION
<222> (0)...(0)

<400> 176
Glu Phe Arg
1

AS: 99 C/G

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

(43) Fecha de Publicación Internacional
4 de Noviembre de 2004 (04.11.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2004/094471 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes[7]: C07K 14/775 5/065,5/087, 5/09, 5/093, 5/11, 5/107, 5/113, 7/04, A61K 38/17, 38/05, 38/06, 38/07,38/08, G01N 33/92

(21) No. Solicitud Internacional: PCT/US2004/012445

(22) Fecha de Presentación Internacional: 22 de abril de 2004 (22.04.2004)

(25) Idioma de Presentación: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Datos relativos a la Prioridad:
60/464,667 22 de abril de 2003 (22.04.2003) US

(71) Solicitante *(para todos los países destinatarios con excepción de US)*: AVANIR PHARMACEUTICALS [US/US]; 11388 Sorrento Valley Road, Suite 200, San Diego, California 92121 (US).

(72) Inventores, e
(75) Inventores/Solicitantes *(para US únicamente)*: SIRCAR, Jagadish, C. [US/US]; 4832 Riding Ridge Road, San Diego, California 92130 (US). ALISALA, Kashinatham [IN/US]; 11848 Scripps Creek Drive, #C, San Diego, California 92131 (US). NIKOULIN, Igor [RU/US]; 3845 Elijah Court, #635, San Diego, California 92130 (US).

(74) Agente: ALTMAN, Daniel, E.; 2040 Main Street, Fourteenth Floor, Irvine, California 92614 (US).

(81) Países designados *(a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Países designados *(a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible)* ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:
— *con informe internacional de búsqueda y para volverse a publicar al recibo de ese informe*

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, remítase a las "Notas Guía sobre Códigos y Abreviaturas" que aparece al comienzo de cada edición regular del Boletín Oficial PCT.

(54) Título: MEDIADORES DE TRANSPORTE REVERSO DE COLESTEROL PARA EL TRATAMIENTO DE HIPERCOLESTEROLEMIA

(57) Extracto: La presente invención ofrece composiciones adaptadas para mejorar el transporte reverso de colesterol en mamíferos. Las composiciones son adecuadas para administración oral y son útiles en el tratamiento y/o prevención de hipercolesterolemia, arteriosclerosis y enfermedades cardiovasculares asociadas.

WO 2004/094471 A2

MEDIADORES DE TRANSPORTE REVERSO DE COLESTEROL PARA EL TRATAMIENTO DE HIPERCOLESTEROLEMIA

Antecedentes de la Invención

Campo de la Invención

[0001] La invención se refiere mediadores de péptido y molécula pequeña de transporte reverso de colesterol (RCT) para tratar hipercolesterolemia y enfermedades cardiovasculares asociadas.

Descripción del Arte Relacionado

[0002] Actualmente está bien establecido que un colesterol elevado en el suero ("hipercolesterolemia") es un factor causante en el desarrollo de arterioesclerosis, una acumulación progresiva de colesterol en las paredes arteriales. La hipercolesterolemia y la arterioesclerosis son las principales causas de enfermedades cardiovasculares, incluidas la hipertensión, la arteriopatía coronaria, infarto del miocardio y apoplejía. Alrededor de 1.1 millón de individuos sufren de infarto del miocardio cada año en los Estados Unidos únicamente, cuyos costos se estima que superan los US$117.000 millones. Aunque existen numerosas estrategias farmacéuticas para bajar los niveles de colesterol en la sangre, muchas de éstas tienen efectos secundarios indeseables y han suscitado inquietudes en cuanto a la seguridad. Más aún, ninguna de las terapias con medicamentos disponibles en el comercio estimula adecuadamente el transporte reverso de colesterol, una ruta metabólica importante que elimina colesterol del cuerpo.

[0003] El colesterol en circulación es transportado por lipoproteínas del plasma – partículas de complejo lípido y composición de proteína que transportan lípidos en la sangre. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL), y las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son los principales transportadores de colesterol. Se cree que LDL son responsables de la entrega de colesterol del hígado (donde éste se sintetiza

u obtiene de fuentes alimenticias) a los tejidos extrahepáticos en el cuerpo. El término "transporte reverso de colesterol" describe el transporte de colesterol de los tejidos extrahepáticos al hígado donde aquel se cataboliza y se elimina. Se cree que las partículas de HDL en el plasma juegan un papel principal en el proceso de transporte reverso, actuando como barredores de colesterol en los tejidos.

[0004] Una evidencia convincente fundamenta el concepto de que los lípidos depositados en las lesiones arterioescleróticas se derivan principalmente de LDL en el plasma; por consiguiente, LDLs se han vuelto popularmente conocidas como el colesterol "malo". En contraste, los niveles de HDL en el plasma se correlacionan inversamente con cardiopatía coronaria – ciertamente, niveles elevados en el plasma de HDL se consideran como un factor de riesgo negativo. Se ha propuesto la hipótesis de que altos niveles de HDL en el plasma no sólo protegen contra la arteriopatía coronaria, sino que efectivamente pueden inducir la regresión de las placas arterioescleróticas (por ejemplo, véase Badimon *y colaboradores*, 1992, *Circulation* 86 (Suppl. III):86-94). Por lo tanto, HDLs se han vuelto popularmente conocidas como el colesterol "bueno".

[0005] La cantidad de colesterol intracelular liberado de las LDLs controla el metabolismo del colesterol celular. La acumulación de colesterol celular derivado de LDLs controla tres procesos: (1) reduce la síntesis del colesterol celular desactivando (***"by turning off"***) la síntesis de HMGCoA reductasa, una enzima clave en la ruta biosintética del colesterol; (2) el colesterol entrante derivado de promueve el almacenamiento de colesterol activando LCAT, la enzima celular que convierte el colesterol en colesteril ésteres que se depositan en gotículas de almacenamiento; y (3) la acumulación de colesterol en la células activa un mecanismo de retroalimentación que inhibe la síntesis celular de nuevos receptores de LDL. Por lo tanto, las células, ajustan su complemento de receptores de LDL, de manera que se admite suficiente colesterol para satisfacer sus necesidades metabólicas, sin sobrecargarse. (Para una reseña, véase Brown & Goldstein, In: The Pharmacological Basis Of

Therapeutics, 8th Ed., Goodman & Gilman, Pergamon Press, NY, 1990, Ch. 36, páginas 874-896).

[0006] Transporte reverso de colesterol (RCT) es la ruta por la cual el colesterol celular periférico puede devolverse al hígado para reciclarlo a los tejidos extrahepáticos, o excretarlo en el intestino en forma de bilis. La ruta de RCT representa el único medio de eliminar colesterol de la mayoría de los tejidos extrahepáticos. El RCT consta principalmente de tres pasos: (1) salida de colesterol, la eliminación inicial de colesterol de las células periféricas; (2) esterificación de colesterol por la acción de lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT), que impide una re-entrada del colesterol descargado a las células periféricas; y (3) absorción/entrega del colesteril éster de HDL a las células hepáticas. LCAT es la enzima clave en la ruta de RCT y se produce principalmente en el hígado y circula en el plasma asociado con la fracción de HDL. LCAT convierte el colesterol derivado en colesteril ésteres, que se secuestran en HDL destinadas para eliminación. La ruta de RCT está mediada por HDLs.

[0007] HDL es un término genérico para partículas de lipoproteína, que se caracterizan por su alta densidad. Los principales constituyentes lipídicos de los complejos de HDL son varios fosfolípidos, colesterol (éster) y triglicéridos. Los componentes de alipoproteína más prominentes son A-I y A-II que determinan las características funcionales de HDL.

[0008] Cada partícula de HDL contiene por lo menos una copia (y usualmente dos a cuatro copias) de apolipoproteína A-1 (ApoA-I). ApoA-I se sintetiza por el hígado y el intestino delgado como preproapolipoproteína, que se segrega como una proproteína que se segmenta rápidamente para generar un polipéptido maduro con 243 residuos de aminoácidos. ApoA-I consiste principalmente de 6 a 8 diferentes repeticiones de 22 aminoácidos espaciadas por una fracción enlazante, que es a menudo prolina y, en algunos casos, consiste de un tramo compuesto de varios residuos. ApoA-I forma tres tipos de complejos estables con lípidos: complejos pobres en lípidos, pequeños, denominados

pre-beta-1 HDL; partículas discoides aplanadas que contienen lípidos polares (fosfolípido y colesterol), denominadas pre-beta-2 HDL; y partículas esféricas que contienen lípidos polares y no polares, denominadas HDL maduras o esféricas HDL (HDL_3 y HDL_2). Aunque la mayoría de HDL en circulación contiene ApoA-I y ApoA-II, la fracción de HDL que contiene únicamente ApoA-I (AI-HDL) parece ser más efectiva en RCT. Estudios epidemiológicos apoyan la hipótesis de que AI-HDL es anti-aterogénico. (Parra *y colaboradores,* 1992, *Arterioscler. Thromb.* 12:701-707; Decossin *y colaboradores,* 1997, *Eur. J. Clin. Invest.* 27:299-307).

[0009] Varias líneas de evidencia basadas en datos obtenidos ***in vivo*** implican la HDL y su principal componente de proteína, ApoA-I, en la prevención de lesiones ateroscleróticas y, potencialmente, la regresión de placas – haciendo de éstas dianas atractivas para intervención terapéutica. En primer lugar, existe una correlación inversa entre concentración de ApoA-1 (HDL) sérica y aterogénesis en el hombre (Gordon & Rifkind, 1989, *N. Eng. J. Med.* 321:1311-1316; Gordon *y colaboradores,* 1989, *Circulation* 79:8-15). Ciertamente, subpoblaciones específicas de HDL se han asociado con un riesgo reducido de arterioesclerosis en humanos (Miller, 1987, *Amer. Heart* 113:589-597; Cheung *y colaboradores,* 1991, *Lipid Res.* 32:383-394); Fruchart & Ailhaud, 1992, *Clin. Chem.* 38:79).

[0010] En segundo, estudios animales fundamentan el papel protector de ApoA-I (HDL). El tratamiento de ratones, alimentados con colesterol, con ApoA-I ó HDL redujo el desarrollo y evolución de placa (estrías adiposas) en conejos alimentados con colesterol (Koizumi *y colaboradores,* 1988, *J. Lipid Res.* 29:1405-1415; Badimon *y colaboradores,* 1989, *Lab. Invest.* 60:455-461; Badimon *y colaboradores,* 1990, *J. Clin. Invest.* 85:1234-1241). No obstante, la eficacia variaba dependiendo de la fuente de HDL (Beitz *y colaboradores,* 1992, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 47:149-152; Mezdour *y colaboradores,* 1995, *Atherosclerosis* 113:237-246).

[0011] Tercero, evidencia directa el papel de ApoA-I se obtuvo de

experimentos que incluían animales transgénicos. La expresión del gen humano para ApoA-I, transferido a ratones genéticamente predispuestos a arterioesclerosis inducida por la dieta, protegió contra el desarrollo de lesiones aórticas (Rubin *y colaboradores,* 1991, *Nature* 353:265-267). También se demostró que el transgen ApoA-I suprime arterioesclerosis en ratones con deficiencia de ApoE y en ratones transgénicos Apo(a) (Paszty *y colaboradores,* 1994, *J. Clin. Invest.* 94:899-903; Plump *y colaboradores,* 1994, *PNAS.* USA 91:9607-9611; Liu *y colaboradores,* 1994, *J. Lipid Res.* 35:2263-2266). Resultados similares se observaron en conejos transgénicos que expresan ApoA-I humana (Duverger, 1996, *Circulation* 94:713-717; Duverger *y colaboradores,* 1996, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 16:1424-1429), y en ratas transgénicas donde niveles elevados de ApoA-I humana protegieron contra arterioesclerosis e inhibieron la restenosis a raíz de la angioplastia con globo (Burkey *y colaboradores,* 1992, *Circulation,* Supplement I, 86:1-472, Abstract No. 1876; Burkey *y colaboradores,* 1995, *J. Lipid Res.* 36:1463-1473).

Tratamientos Corrientes para Hipercolesterolemia y otras Dislipidemias

[0012] En las últimas dos décadas aproximadamente, la separación de compuestos colesterolémicos en reguladores de HDL y LDL y el reconocimiento de la deseabilidad de disminuir los niveles de LDL en la sangre ha llevado al desarrollo de un número de medicamentos. No obstante, muchos de estos medicamentos poseen efectos secundarios indeseados y/o son contraindicados en ciertos pacientes, particularmente cuando se administran en combinación con otros fármacos. Estos medicamentos y estrategias terapéuticas incluyen:

(1) resinas fijadoras de ácido biliar, que interrumpen el reciclaje de ácidos biliares del intestino al hígado [por ejemplo, colestiramina (QUESTRAN LIGHT, Bristol-Myers Squibb), y clorhidrato de colestipol (COLESTID, Pharmacia & Upjohn Company)];

191

(2) estatinas, que inhiben la síntesis del colesterol bloqueando HMGCoA – la enzima clave implicada en la biosíntesis del colesterol [por ejemplo, lovastatina (MEVACOR, Merck & Co., Inc.), un producto natural derivado de una cepa de Aspergillus, pravastatina (PRAVACHOL, Bristol-Myers Squibb Co.), y atorvastatina (LIPITOR, Warner Lambert)];

(3) niacina es un complejo de vitamina B soluble en agua, que disminuye la producción de VLDL y es efectiva en reducir la LDL;

(4) fibratos se usan para disminuir los triglicéridos en el suero reduciendo la fracción de VLDL y pueden, en algunas poblaciones de pacientes, dar lugar a reducciones modestas del colesterol en el plasma mediante el mismo mecanismo [por ejemplo, clofibrato (ATROMID-S, Wyeth-Ayerst Laboratories), y gemfibrozil (LOPID, Parke-Davis)];

(5) terapia de sustitución de estrógeno puede reducir los niveles de colesterol en mujeres pos-menopáusicas;

(6) ácidos omega-dicarboxílicos, de cadena larga alfa han sido reportados por reducir los triglicéridos y el colesterol en el suero (véase, por ejemplo, Bisgaier *y colaboradores*, 1998, *J. Lipid Res.* 39:17-30; WO 98/30530; Patente de los Estados Unidos No. 4,689,344; WO 99/00116; Patente de los Estados Unidos No. 5,756,344; Patente de los Estados Unidos No. 3,773,946; Patente de los Estados Unidos No. 4,689,344; Patente de los Estados Unidos No. 4,689,344; Patente de los Estados Unidos No. 4,689,344; y Patente de los Estados Unidos No. 3,930,024);

(7) otros compuestos incluidos éteres (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 4,711,896; Patente de los

192

Estados Unidos No. 5,756,544; Patente de los Estados Unidos No. 6;506,799), fosfatos de dolicol (Patente de los Estados Unidos No. 4,613,593), y derivados de azolidinadiona (Patente de los Estados Unidos No. 4,287,200) se divulgan como reductores de los niveles de triglicéridos y colesterol en el suero.

[0013] Ninguno de estos medicamentos disponibles en la actualidad para reducir el colesterol elevan en forma segura los niveles de HDL y estimulan el RCT. Ciertamente, la mayoría de estas estrategias actuales de tratamiento parecen operar sobre la ruta de transporte del colesterol, modulando la absorción alimenticia, reciclaje, síntesis de colesterol, y la población de VLDL.

Agonistas de ApoA-I para Tratamiento de Hipercolesterolemia

[0014] En vista del papel potencial de HDL, es decir, tanto ApoA-I como su fosfolípido asociado, en la protección contra enfermedad aterosclerótica, se empezaron estudios clínicos humanos utilizando ApoA-I producida en forma recombinante, se descontinuaron y, aparentemente, se re-iniciaron por UCB Bélgica (Pharmaprojects, Oct. 27, 1995; IMS R&D Focus, Jun. 30, 1997; Drug Status Update, 1997, *Atherosclerosis* 2(6):261-265); véase además M. Eriksson at Congress, "The Role of HDL in Disease Prevention," Nov. 7-9, 1996, Fort Worth; Lacko & Miller, 1997, *J. Lip. Res.* 38:1267-1273; y WO 94/13819) y se comenzaron y se descontinuaron por Bio-Tech (Pharmaprojects, Apr. 7, 1989). Se han intentado asimismo estudios usando ApoA-I para tratar choque septicémico (Opal, "Reconstituted HDL as a Treatment Strategy for Sepsis," IBC's 7th International Conference on Sepsis, Apr. 28-30, 1997, Washington, D.C.; Gouni *y colaboradores,* 1993, *J. Lipid Res.* 94:139-146; Levine, WO 96/04916). No obstante, existen muchas trampas asociadas con la producción y uso de ApoA-L, haciéndola menos ideal como medicamento; por ejemplo, ApoA-I es una proteína grande que es difícil y costosa de producir; se tienen que superar problemas de

193

fabricación y reproducibilidad con respecto a la estabilidad durante el almacenamiento, entrega de un producto activo y vida media ***in vivo***.

[0015] En vista de estas desventajas, se han hecho intentos para preparar péptidos que imitan la ApoA-I. Puesto que las actividades claves de ApoA-I se han atribuido a la presencia de repeticiones múltiples de una característica estructural secundaria única en la proteína – una α-hélice anfipática de clase A (Segrest, 1974, *FEBS Lett.* **38**:247-253; Segrest *y colaboradores*, 1990, *PROTEINS: Structure, Function and Genetics* **8**:103-117), la mayoría de los esfuerzos para diseñar péptidos que imitan la actividad de ApoA-I se han centrado en diseñar péptidos que forman α-hélices anfipáticas tipo clase A (véase por ejemplo, Discusiones de los Antecedentes en las Patentes de los Estados Unidos No. 6,376,464 y 6,506,799; incorporadas aquí en su totalidad por referencia).

[0016] En un estudio, Fukushima *y colaboradores* sintetizaron un péptido de 22 residuos compuestos enteramente de residuos Glu, Lys y Leu dispuestos periódicamente de modo que formen una α-hélice anfipática con *caras* igualmente hidrófilas e hifrófobas ("péptido ELK") (Fukushima *y colaboradores*, 1979, *J. Amer. Chem. Soc.* **101**(13):3703-3704; Fukushima *y colaboradores*, 1980, *J. Biol. Chem.* **255**:10651-10657). El péptido ELK comparte 41% de la homología de secuencia con el fragmento 198-219 de ApoA-I. Se demostró que el péptido ELK se asocia efectivamente con fosfolípidos e imitan algunas de las propiedades físicas y químicas de ApoA-I (Kaiser *y colaboradores*, 1983, *PNAS* USA **80**:1137-1140; Kaiser *y colaboradores*, 1984, *Science* **223**:249-255; Fukushima *y colaboradores*, 1980, más arriba; Nakagawa *y colaboradores*, 1985, *J. Am. Chem. Soc.* **107**:7087-7092). Más tarde se descubrió que un dímero de este péptido de 22 residuos imitaba más íntimamente la ApoA-I que el monómero; basándose en estos resultados, se sugirió que el 44-mero, que se interrumpe en la mitad por un disruptor de hélice ("***α helix breaker***") (Gly o Pro), representaba el dominio funcional mínimo

en ApoA-I (Nakagawa *y colaboradores,* 1985, más arriba).

[0017] Otro estudio incluía péptidos anfipáticos de modelo denominados "peptidos LAP" (Pownall *y colaboradores,* 1980, *PNAS* USA 77(6):3154-3158; Sparrow *y colaboradores,* 1981, In: Peptides: Synthesis-Structure-Function, Roch and Gross, Eds., Pierce Chem. Co., Rockford, IL, 253-256). Basados en estudios de fijación de lípidos con fragmentos de apolipoproteínas nativas, se diseñaron varios péptidos LAP, denominados LAP-16, LAP-20 y LAP-24 (que contienen 16, 20 y 24 residuos de aminoácido, respectivamente). Estos péptidos anfipáticos de modelo no comparten homología de secuencia con las apolipoproteínas y se diseñaron para tener las caras hidrófilas organizadas en una forma distinta a los dominios helicoidales anfipáticos tipo clase A, asociados con apolipoproteínas (Segrest *y colaboradores,* 1992, *J. Lipid Res.* 33:141-166). De estos estudios, los autores concluyeron que una longitud mínima de 20 residuos es necesaria para conferir propiedades de fijación de lípidos a péptidos anfipáticos de modelo.

[0018] Estudios con mutantes de LAP20, que contienen un residuo de prolina en diferentes posiciones en la secuencia, indicaron que existe una relación directa entre la fijación de lípidos y la activación de LCAT, pero que el potencial helicoidal de un péptido solo no conduce a la activación de LCAT (Ponsin *y colaboradores,* 1986, *J. Biol. Chem.* 261(20):9202-9205). Más aún, la presencia de este disruptor de hélice (Pro) cerca de la mitad del péptido redujo su afinidad para las superficies fosfolípidas, así como por su capacidad de activar LCAT. Aunque se demostró que algunos de los péptidos LAP fijan fosfolípidos (Sparrow *y colaboradores,* más arriba), existe controversia en cuanto a la medida en la que los péptidos LAP son helicodales en la presencia de lípidos (Buchko *y colaboradores,* 1996, *J. Biol. Chem.* 271(6):3039-3045; Zhong *y colaboradores,* 1994, *Peptide Research* 7(2):99-106).

[0019] Segrest *y colaboradores* han sintetizado péptidos

compuestos de 18 a 24 residuos de aminoácido que no comparten homología de secuencia con las hélices de ApoA-I (Kannelis *y colaboradores,* 1980, *J. Biol. Chem.* **255**(3):11464-11472; Segrest *y colaboradores,* 1983, *J. Biol. Chem.* **258**:2290-2295). Las secuencias se diseñaron específicamente para imitar los dominios helicoidales anfipáticos de apolipoproteínas intercambiables de clase A en términos de momento hidrófobo (Eisenberg *y colaboradores,* 1982, *Nature* 299:371-374) y distribución de carga (Segrest *y colaboradores,* 1990, *Proteins* **8**:103-117; Patente de los Estados Unidos No. 4,643,988). Un péptido de 18 residuos, el péptido "18A", se diseñó para ser un modelo de α-hélice de clase A de modelo (Segrest *y colaboradores,* 1990, supra). Estudios con estos péptidos y otros péptidos que tienen una distribución de carga reversa, como el péptido "18R", han demostrado en forma consistente que la distribución de carga es crítica para la actividad; péptidos con distribución de carga reversa exhiben una afinidad de lípido disminuida en relación con los imitadores clase A 18 y un menor contenido helicoidal en la presencia de lípidos (Kanellis *y colaboradores,* 1980, *J. Biol. Chem.* **255**:11464-11472; Anantharamaiah *y colaboradores,* 1985, *J. Biol. Chem.* **260**:10248-10255; Chung *y colaboradores,* 1985, *J. Biol. Chem.* **260**:10256-10262; Epand *y colaboradores,* 1987, *J. Biol. Chem.* **262**:9389-9396; Anantharamaiah *y colaboradores,* 1991, *Adv. Exp. Med. Biol.* **285**:131-140).

[0020] Se ha diseñado igualmente un péptido de "consenso" que contiene 22 residuos de aminoácido, basado en las secuencias de las hélices de la ApoA-I humana (Anantharamaiah *y colaboradores,* 1990, *Atherosclerosis* **10**(1):95-105; Venkatachalapathi *y colaboradores,* 1991, *Mol. Conformation and Biol. Interactions, Indian Acad. Sci.* B:585-596). La secuencia se construyó identificando el residuo más prevalente en cada posición de las hélices supuestas de la ApoA-I humana. Al igual que los péptidos ya descritos, la hélice formada por este péptido tiene residuos positivamente cargados de aminoácido

196

agrupados en la interface hidrófila –hidrófoba, residuos de aminoácido negativamente cargados, agrupados en el centro de la cara hidrófila y un ángulo hidrófobo de menos de 180°. Aunque un dímero de este péptido es en cierta medida efectivo en activar la LCAT, el monómero exhibió propiedades bajas de fijación de lípido (Venkatachalapathi *y colaboradores,* 1991, más arriba).

[0021] Basándose principalmente en estudios *in vitro* con los péptidos ya descritos, ha surgido un conjunto de "reglas" para diseñar péptidos que imitan la función de ApoA-I. Significativamente, se cree que una α-hélice anfipática, con residuos positivamente cargados agrupados en la interface hidrófila-hidrófoba y residuos de aminoácido negativamente cargados, agrupados en el centro de la cara hidrófila, se requiere para afinidad de lípido y actividad de LCAT (Venkatachalapathi *y colaboradores,* 1991, más arriba). Anantharamaiah *y colaboradores* han indicado asimismo que el residuo Glu negativamente cargado en la posición 13 del péptido 22-mero de consenso, que se ubica dentro de la cara hidrófoba de la α-hélice, juega un papel importante en la activación de la LCAT (Anantharamaiah *y colaboradores,* 1991, más arriba). Más aún, Brasseur ha indicado que se requiere un ángulo hidrófobo (ángulo pho) de menos de 180° para una óptima estabilidad del complejo lípido-apolipoproteína, y es además responsable de la formación de partículas discoideas que tienen los péptidos alrededor del borde de la bicapa del lípido (Brasseur, 1991, *J. Biol. Chem.* **66**(24): 16120-16127). Rosseneu *y colaboradores* han insistido asimismo en que se requiere un ángulo hidrófobo de menos de 180° para la activación de la LCAT (WO 93/25581).

[0022] No obstante, a pesar del avance en elucidar "reglas" para diseñar agonistas ApoA-I, hasta la fecha se informa que los mejores agonistas ApoA-I tienen menos de 40% de la actividad de ApoA-I intacta. Ninguno de los agonistas de péptido descritos en la literatura ha demostrado ser útil como medicamento. Por consiguiente, existe una necesidad de desarrollar una molécula estable que imite la

actividad de ApoA-I y que es relativamente simple y rentable de producir. Preferiblemente, moléculas candidatas mediarían el RCT tanto directo como indirecto. Tales moléculas serían más pequeñas que los agonistas de péptido existentes, y tienen espectros funcionales más amplios. No obstante, las "reglas" para diseñar mediadores más eficaces de RCT no se han elucidado completamente y los principios para diseñar moléculas orgánicas con la función de ApoA-I son desconocidos.

Sumario de la Invención

[0023] De acuerdo con una incorporación preferida de la presente invención, se divulga un mediador de transporte reverso de colesterol que comprende una molécula con una región ácida, una región lipofílica o aromática y una región básica (el "Modelo Molecular"). El Modelo Molecular en su forma más simple podría ser una molécula que contiene una región ácida y una región básica con una línea de sostén o andamiaje lipófilo. La molécula tiene una estructura adaptada para acomplejarse con colesterol HDL y/o LDL y, así, intensificar el transporte reverso de colesterol.

[0024] El mediador de transporte reverso de colesterol tiene preferiblemente entre 3 y 10 residuos de aminoácido o análogos o cualquier compuesto no peptídico que contiene un grupo básico y un grupo ácido con un andamiaje lipófilo, del mismo, y comprende la secuencia: X1-X2-X3, en donde: X1 es un aminoácido ácido; X2 es un aminoácido lipófilo o aromático; X3 es un aminoácido básico; y en donde el terminal amino comprende además un primer grupo protector, y el terminal carboxi comprende además un segundo grupo protector. Los grupos protectores primero y segundo se seleccionan independientemente del grupo conformado por un acetili, fenilacetilo, pivolilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo, ácido 2-naftílico, ácido nicotínico, un CH_3—$(CH_2)_n$—CO— en donde n varía desde 3 a 20, y una amida de acetilo, fenilacetilo, di-terc-butil-4-hidroxi-fenilo, naftilo, naftilo sustituido, f-MOC, bifenilo, fenilo sustituido, heterociclos sustituidos, alquilo, arilo,

198

arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo fusionado, heteroarilo saturado, heteroarilo saturado sustituido y similares. El C-terminal está taponado ("*is capped*") con una amina tal como RNH_2 donde R = di-terc-butil-4-hidroxi-fenilo, naftilo, naftilo sustituido, f-MOC, bifenilo, fenilo sustituido, heterociclos sustituidos, alquilo, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo fusionado, heteroarilo saturado, heteroarilo saturado sustituido y similares. La secuencia: X1-X2-X3 podría mezclarse en una cualquiera de todas las modalidades posibles para proporcionar compuestos que conservan las características básicas del Modelo Molecular y podría estar conformada por 3 a 10 residuos de aminoácido.

[0025] En una incorporación del mediador derivado de aminoácido de transporte reverso de colesterol, uno o más de X1, X2 ó X3 son D u otros residuos de aminoácido sintéticos modificados para proporcionar moléculas metabólicamente estables. Esto podría obtenerse también mediante un enfoque peptidomimético, es decir, reversar los enlaces peptídicos en la línea de sostén o grupos similares. En algunas incorporaciones preferidas, X2 es bifenilalanina. En incorporaciones particularmente preferidas, los mediadores de transporte reverso de colesterol de la presente invención son cualquiera de SEQ ID No.S 1-176 ó pueden seleccionarse de los compuestos mostrados en Tabla 5. En algunas incorporaciones preferidas, el mediador de transporte reverso de colesterol incluye la secuencia EFR ó RFE.

[0026] Un método para intensificar RCT en un animal se divulga de acuerdo con otro aspecto preferido de la presente invención. El método comprende administrar al animal una cantidad efectiva de una composición derivada de aminoácido, que comprende la secuencia: X1-X2-X3, en donde: X1 es un aminoácido ácido; X2 es un aminoácido lipófilo o aromático; X3 es un aminoácido básico; y en donde el terminal amino comprende además un primer grupo protector, y el terminal carboxi comprende además un segundo grupo protector, en donde los grupos protectores primero y segundo se seleccionan independientemente del grupo conformado por un acetilo, fenilacetilo, pivolilo, 9-

fluorenilmetiloxicarbonilo, ácido 2-naftílico, ácido nicotínico, un CH_3—$(CH_2)_n$—CO— donde n varía de 3 a 20, y di-terc-butil-4-hidroxi-fenilo, naftilo, naftilo sustituido, f-MOC, bifenilo, fenilo sustituido, heterociclos sustituidos, alquilo, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo fusionado, heteroarilo saturado, heteroarilo saturado sustituido y similares. El C-terminal está taponado con una amina tal como RNH_2 donde R = di-terc-butil-4-hidroxi-fenilo, naftilo, naftilo sustituido, f-MOC, bifenilo, fenilo sustituido, heterociclos sustituidos, alquilo, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo fusionado, heteroarilo saturado, heteroarilo saturado sustituido y similares. La secuencia: X1-X2-X3 podría mezclarse en cualquiera de todas las modalidades posibles para proporcionar compuestos que conservan las características básicas del Modelo Molecular y podría constar de 3 a 10 residuos de aminoácido.

[0027] De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se divulga una sustancia derivada de aminoácido sustancialmente pura para tratar y/o prevenir hipercolesterolemia y/o arterioesclerosis en un mamífero. La sustancia tiene un terminal amino y un terminal carboxi y comprende un enantiómero L ó D de un residuo de aminoácido ácido o aminoácido sintético modificado o derivado del mismo, un enantiómero L ó D de un residuo de aminoácido lipófilo o derivado o aminoácido sintético modificado del mismo, y un enantiómero L ó D de un residuo de aminoácido básico o derivado o aminoácido sintético modificado del mismo. El terminal amino comprende además un primer grupo protector, y el terminal carboxi comprende además un segundo grupo protector, en donde dichos grupos protectores primero y segundo se seleccionan independientemente del grupo conformado por un acetilo, fenilacetilo, pivolilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo, ácido 2-naftílico, ácido nicotínico, y di-terc-butil-4-hidroxi-fenilo, naftilo, naftilo sustituido, f-MOC, bifenilo, fenilo sustituido, heterociclos sustituidos, alquilo, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo fusionado, heteroarilo saturado, heteroarilo saturado sustituido y similares. El C-terminal está taponado con una amina tal como RNH_2 donde R = di-terc-butil-4-hidroxi-fenil, naftilo,

naftilo sustituido, f-MOC, bifenilo, fenilo sustituido, heterociclos sustituidos, alquilo, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo fusionado, heteroarilo saturado, heteroarilo saturado sustituido y similares. La secuencia: X1-X2-X3 podría mezclarse en cualquiera de todas las modalidades posibles para proporcionar compuestos que conservan las características básicas del Modelo Molecular y podría constar de 3 a 10 residuos de aminoácido.

[0028] La sustancia tiene por lo menos una de las siguientes propiedades: (1) se fija a LDL y HDL que imitan ApoA-I que se fija a LDL y HDL, (2) se fija preferencialmente al hígado, (3) intensifica la absorción de LDL por los receptores LDL del hígado, (4) reduce los niveles de colesterol LDL, IDL y VLDL, (5) aumenta los niveles de colesterol HDL, y (6) mejora los perfiles de lipoproteína en el plasma.

[0029] De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se divulga una composición apropiada para administración oral para aliviar o prevenir un síntoma de hipercolesterolemia. La composición comprende una molécula derivada de aminoácido que tiene una región ácida, una región lipófila y una región básica. La molécula derivada de aminoácido posee asimismo un primer grupo protector unido a un terminal amino y un segundo grupo protector unido a un terminal carboxilo. La molécula derivada de aminoácido puede comprender opcionalmente por lo menos un residuo de aminoácido D.

[0030] De acuerdo con otra modalidad de la presente invención, se divulga un mediador de péptido de RCT. El mediador comprende la secuencia: Xa-Xb-X1-X2-X3-Xc-Xd, en donde Xa es un residuo de aminoácido acilado; Xb es cualquiera de 0-10 residuos de aminoácido; X1-X2-X3 se seleccionan independientemente de un residuo de aminoácido ácido o derivado del mismo, un residuo de aminoácido lipófilo o derivado del mismo, y un residuo de aminoácido básico o derivado del mismo; Xc es cualquiera de 0-10 residuos de aminoácido; y Xd es un residuo de aminoácido amidado. El mediador de péptido tiene preferiblemente 15 ó menos residuos de aminoácido y opcionalmente puede constar de por lo

menos un residuo de aminoácido D o aminoácido sintético modificado.

[0031] De acuerdo con otra incorporación preferida de la presente invención, se divulga la administración de una composición apropiada para administración oral, que incluye una molécula derivada de aminoácido que tiene una región ácida, una región lipófila y una región básica para tratamiento y/o prevención de hipercolesterolemia o arterioesclerosis. La molécula derivada de aminoácido tiene un primer grupo protector unido a un terminal amino y un segundo grupo protector unido a un terminal carboxilo. La molécula derivada de aminoácido puede comprender opcionalmente por lo menos un residuo de aminoácido D.

[0032] De acuerdo con otra incorporación de la presente invención, se divulga un mediador de RCT, que comprende un compuesto seleccionado del grupo conformado por los compuestos sintéticos 1-96 de Tabla 5.

[0033] De acuerdo con otra incorporación de la presente invención, se divulga un mediador de RCT, que comprende un compuesto seleccionado del grupo conformado por SEQ ID Nos. 1 y 107-117.

[0034] De acuerdo con otra incorporación de la presente invención, se divulga un mediador de RCT, que comprende un compuesto seleccionado del grupo conformado por SEQ ID Nos. 1, 26-36, 42,45-47, 56-58, 68-70,72-74, 76, 80, 81, 83-90 y 92-95.

[0035] De acuerdo con otra incorporación de la presente invención, se divulga un mediador de RCT, que comprende un compuesto seleccionado del grupo conformado por SEQ ID No. 1.

[0036] De acuerdo con otra incorporación de la presente invención, se divulga un mediador de RCT, que comprende un compuesto seleccionado del grupo conformado por SEQ ID No. 113.

[0037] De acuerdo con otra incorporación de la presente invención, se divulga un mediador de RCT, que comprende un compuesto seleccionado del grupo conformado por SEQ ID No. 34.

[0038] De acuerdo con otra incorporación de la presente invención, se divulga un mediador de RCT, que comprende un compuesto

seleccionado del grupo conformado por SEQ ID No. 86.

[0039] De acuerdo con otra incorporación de la presente invención, se divulga un mediador de RCT, que comprende un compuesto seleccionado del grupo conformado por SEQ ID No. 91.

[0040] De acuerdo con otra incorporación de la presente invención, se divulga un mediador de RCT, que comprende un compuesto seleccionado del grupo conformado por SEQ ID No. 96.

[0041] De acuerdo con otra incorporación de la presente invención, se divulga un mediador de RCT, que comprende un compuesto seleccionado del grupo conformado por SEQ ID No. 145.

[0042] De acuerdo con otra incorporación de la presente invención, se divulga un mediador de RCT, que comprende un compuesto seleccionado del grupo conformado por SEQ ID No. 146.

[0043] De acuerdo con otra incorporación de la presente invención, se divulga un mediador de RCT, que comprende un compuesto seleccionado del grupo conformado por SEQ ID No. 118.

[0044] De acuerdo con otra incorporación preferida de la presente invención, se divulga un método para tratar o prevenir hipercolesterolemia y/o arterioesclerosis. El método comprende administrar a un mamífero necesitado de ello una cantidad de una composición seleccionada de SEQ ID Nos. 1-176 (Tabla 3) y compuestos sintéticos 1-96 (Tabla 5), en donde la cantidad es suficiente para aumentar RCT y/o causar regresión de lesiones ateroscleróticas existentes o reducir la formación de las lesiones. Más preferiblemente, la composición usada para tratar o prevenir hipercolesterolemia y/o arterioesclerosis se selecciona del grupo conformado por SEQ ID Nos. 1, 113, 34, 86, 91, 96, 145, 146, y 118, en donde la cantidad es suficiente para aumentar RCT y/o causar regresión de lesiones ateroscleróticas existentes o reducir la formación de las lesiones. En una variación al método, el paso de administrar se lleva a cabo por una vía oral. En otra variación al método, el paso de administrar se combina con la administración de una resina fijadora de ácido biliar, niacina, una estatina, o una combinación de las

203
2004

mismas.

[0045] De acuerdo con otra incorporación preferida de la presente invención, se divulga un método de cribado *in vitro* para identificar compuestos de prueba que tienden a intensificar el transporte reverso de colesterol *in vivo*. El método comprende: medir la acumulación de colesterol en hepatocitos *in vitro* en la presencia y ausencia de los compuestos de prueba; medir la acumulación de colesterol y/o descarga en macrófagos cargados con AcLDL *in vitro* en la presencia y ausencia de compuestos de prueba; e identificar compuestos de prueba que intensifican la acumulación de colesterol en hepatocitos y reducen los niveles de colesterol en macrófagos.

[0046] En una variación al método de cribado, se miden igualmente los niveles de colesterol en células de músculo liso vascular cargadas con LDL oxidada *in vitro* en la presencia y ausencia de compuestos de prueba. Por consiguiente, el paso de identificar compuestos de prueba comprende además identificar compuestos que intensifican la acumulación de colesterol en hepatocitos y reducen niveles de colesterol en macrófagos y/o reducen los niveles de colesterol en células de músculo liso vascular.

[0047] En una incorporación del método de cribado, los hepatocitos son células de hepatoma HepG2 humano. En otra incorporación, los macrófagos con células THP-1 humanas. En otra incorporación, las células de músculo liso vascular son principalmente células de músculo liso aórtico.

[0048] En otra variación, el método de cribado *in vitro* comprende los pasos de: medir la acumulación de colesterol en hepatocitos *in vitro* en la presencia y ausencia de los compuestos de prueba; medir los niveles de colesterol en células de músculo liso vascular cargadas con AcLDL *in vitro* en la presencia y ausencia de compuestos de prueba; e identificar compuestos de prueba que intensifican la acumulación de colesterol en hepatocitos y reducen los niveles de colesterol en células de músculo liso vascular.

Breve Descripción de los Dibujos

[0049] ***Figura 1*** muestra una representación esquemática de la síntesis de péptido de fase sólida.

[0050] ***Figura 2*** ilustra la asociación de las composiciones derivadas de aminoácido de la presente invención con lipoproteínas y albúmina. Compuestos radiomarcados se incubaron con plasma de ratón LDLR-/- a la temperatura de la sala durante 2 horas. Luego de la incubación, la mezcla se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Se cuantificó la radioactividad en las bandas que representaban LDL, HDL y albúmina. La radioactividad ligada a lipoproteínas y albúmina se expresa como porcentaje de la radioactividad aplicada.

[0051] ***Figura 3*** muestra las composiciones derivadas de aminoácido de la presente invención se fijan al hígado en ratones macho ApoA1-/-. Ratones macho ApoA1-/- se inyectaron con 12 ug/ratón de compuestos radiomarcados. 36 minutos más tarde se recogieron los hígados, se cuantificó la radioactividad y se ajustó por gramo de tejido húmedo. La radioactividad ligada al hígado se expresa como % de cpm total. Cada barra representa la media ± SEM (error estándar de la media) de 4 ratones.

[0052] ***Figura 4*** muestra la distribución en los órganos de SEQ ID No. 1 y la absorción preferencial por el hígado. Ratones macho ApoA1-/- se inyectaron con 12 ug de SEQ ID No. 1 radiomarcada. 36 minutos más tarde se recogieron los órganos, se cuantificó la radioactividad y se ajustó por gramo de tejido húmedo. Cada barra representa la media ± SEM de 4 ratones.

[0053] ***Figure 5*** muestra que el acomplejamiento de 125I-LDL Humana con SEQ ID No. 1 mejoró su fijación al hígado. La entrega de LDL al hígado se intensifica por SEQ ID No. 1. ^{125}I-LDL sola o ^{125}I-LDL acomplejada con SEQ ID No. 1 se inyectaron en ratones machos de los genotipos deficientes tal como se indica. 36 minutos más tarde se recogieron los hígados y se cuantificó la radioactividad. La radioactividad

fijada al hígado se expresa como % de la radioactividad inyectada. Cada barra representa la media ± SEM de 4 ratones.

[0054] ***Figura 6*** muestra que los complejos SEQ ID No. 1-LDL se fijan al receptor de LDL en el hígado. La fijación de ^{125}I-LDLsola o ^{125}I-LDL acomplejada con SEQ ID No. 1 al hígado de ratones LDLR-/- se restó de su respectiva fijación al hígado de ratones A-I-/-. El resultado de la sustracción indica el dramático aumento en la fijación del complejo a los receptores de LDL. Cada barra representa la media ± SEM de 4 ratones.

[0055] ***Figura 7*** muestra los efectos de SEQ ID No. 1 sobre la eliminación de LDL humana de la sangre de ratones con deficiencia de ApoA-I. ^{125}I-LDL sola o ^{125}I-LDL acomplejada con SEQ ID No. 1 se inyectaron en ratones ApoA1-/-. En los puntos de tiempo indicados se obtuvo plasma, y se midió radioactividad precipitable con 10%TCA. 100 % es igual a radioactividad de la sangre determinada 10 minutos después de la inyección. Cada valor representa la media ± 1 SEM de 4 animales.

[0056] ***Figura 8*** muestra el efecto de SEQ ID No. 1 en la distribución en los órganos de LDL en ratones con deficiencia de ApoA-I y ratones con deficiencia de receptor de LDL. Radioactividad, % = (radioactividad fijada a los órganos / reactividad de la sangre) x100%. Aproximadamente 90% de la radioactividad detectada total (en el punto de tiempo 36 minutos) es la radioactividad de la sangre.

[0057] ***Figura 9*** muestra el efecto de SEQ ID No. 1 sobre los niveles de colesterol VLDL en el plasma. Los ratones se dividieron en dos grupos (4 ratones en cada grupo). SEQ ID No. 1 ó PBS se inyectaron por vía intravenosa en ratones experimentales o de control, respectivamente. En los puntos de tiempo indicados se obtuvo plasma, combinado en cada grupo, y se aplicó en una columna Superose 6. Cada punto de tiempo en la curva representa la Media ± SEM obtenida de > ó = 3 perfiles cromatográficos.

[0058] ***Figura 10*** muestra el efecto de SEQ ID No. 1 sobre los niveles de colesterol IDL/LDL en el plasma. Los ratones se dividieron en dos grupos (4 ratones en cada grupo). SEQ ID No. 1 ó PBS se inyectaron

por vía intravenosa en ratones experimentales o de control, respectivamente. En los puntos de tiempo indicados se obtuvo plasma, combinado en cada grupo, y se aplicó en una columna Superose 6. Cada punto de tiempo en la curva representa la Media ± SEM obtenida de > ó = 3 perfiles cromatográficos.

[0059] ***Figura 11*** muestra el efecto de SEQ ID No. 1 sobre los niveles de HDL en el plasma. Los ratones se dividieron en dos grupos (4 ratones en cada grupo). SEQ ID No. 1 ó PBS se inyectaron por vía intravenosa en ratones experimentales o de control, respectivamente. En los puntos de tiempo indicados se obtuvo plasma, combinado en cada grupo, y se aplicó en una columna Superose 6. Cada punto de tiempo en la curva representa la Media ± SEM obtenida de > ó = 3 perfiles cromatográficos.

[0060] ***Figura 12*** muestra el análisis de regresión lineal de los efectos de SEQ ID No. 1 sobre los niveles de colesterol VLDL en el plasma.

[0061] ***Figura 13*** muestra el análisis de regresión lineal de los efectos de SEQ ID No. 1 sobre los niveles de colesterol HDL/LDL en el plasma.

[0062] ***Figura 14*** muestra el análisis de regresión lineal de los efectos de SEQ ID No. 1 sobre los niveles de HDL en el plasma.

[0063] ***Figura 15*** muestra el efecto de SEQ ID No. 1 liberada – tiempo sobre el perfil de lipoproteína en el plasma. Bombas que contenían SEQ ID No. 1 ó PBS se insertaron quirúrgicamente en ratones alimentados con comida usual por medio de cánula. El caudal de las bombas era de 8ul/hr, que suministró la cantidad indicada en el cuadro de SEQ ID No. 1 por hora. Los animales se cambiaron a una dieta alta en grasa/colesterol (HFC) inmediatamente después de la cirugía. 20 horas después se obtuvo el plasma, se combinó en cada grupo (4 - 6 ratones), y se sometió a FPLC y electroforesis en gel de agarosa para monitorear el colesterol y la distribución de fosfolípidos entre diferentes clases de lipoproteína (por cuestiones de claridad, no se muestran los datos para los fosfolípidos). El

efecto se expresa com % de la variación comparada con el control PBS.

[0064] ***Figura 16*** muestra los efectos a largo plazo (20 horas) de la infusión de varias composiciones derivadas de aminoácido de la presente invención sobre los perfiles de lipoproteína en el plasma. Bombas que contenían SEQ ID No. 1 ó PBS se insertaron quirúrgicamente en ratones alimentados con comida usual por medio de cánula. El caudal de las bombas era de 8ul/hr, que suministró 30-40ug de péptido por hora. Los animales se cambiaron a una dieta alta en grasa/colesterol (HFC) inmediatamente después de la cirugía. 20 horas después se obtuvo el plasma, se combinó en cada grupo (4 - 6 ratones), y se sometió a FPLC y electroforesis en gel de agarosa para monitorear el colesterol y la distribución de fosfolípidos entre diferentes clases de lipoproteína. El efecto se expresa como % de la variación comparada con el control PBS.

[0065] ***Figura 17*** muestra los efectos a largo plazo (160 horas) de la infusión de varias composiciones derivadas de aminoácido de la presente invención sobre los perfiles de lipoproteína en el plasma. Bombas que contenían SEQ ID No. 1 ó PBS se insertaron quirúrgicamente en ratones alimentados con comida usual por medio de cánula. El caudal de las bombas era de 1ul/hr, que suministró la cantidad indicada en el gráfico de péptido por hora. Los animales se cambiaron a una dieta alta en grasa/colesterol (HFC) inmediatamente después de la cirugía. 160 horas después se obtuvo el plasma, se combinó en cada grupo (4 - 6 ratones), y se sometió a FPLC y electroforesis en gel de agarosa para monitorear el colesterol y la distribución de fosfolípidos entre diferentes clases de lipoproteína (por cuestiones de claridad, no se muestran los datos para los fosfolípidos). El efecto se expresa como % de la variación comparada con el control PBS.

[0066] ***Figura 18*** muestra los efectos de varios péptidos (SEQ ID Nos: 34, 86, 91, 96, 35 y 36) de la presente invención sobre la actividad de la enzima PLTP. SEQ ID Nos: 34, 86, 91 y 96 resultaron en activación de PLTP.

[0067] ***Figura 19*** muestra los efectos agudos de la

administración oral de SEQ ID No. 91 sobre los perfiles de lipoproteína en el plasma y la excreción de colesterol en ácido biliar.

[0068] ***Figura 20*** muestra el efecto de la administración ***ad libitum*** (mediante el agua potable) de AVP-26249 (SEQ ID No. 91) sobre los perfiles de lipoproteína en el plasma de ratones ApoE-/- alimentados con comida normal.

[0069] ***Figura 21*** muestra los efectos de la administración ***ad libitum*** (mediante el agua potable) de AVP-26249 (SEQ ID No. 91), AVP-26451 (SEQ ID No. 145), AVP-26452 (SEQ ID No. 146) y AVP-26355 (SEQ ID No. 118) sobre los perfiles de lipoproteína en el plasma de ratones ApoE-/- alimentados con dietas altas en grasa.

[0070] ***Figura 22*** muestra los efectos de la administración ***ad libitum*** (mediante el agua potable) de AVP-26249 (SEQ ID No. 91), AVP-26451 (SEQ ID No. 145), AVP-26452 (SEQ ID No. 146) y AVP-26355 (SEQ ID No. 118) sobre la cantidad de colesterol excretado por ratones ApoE-/- alimentados con dietas altas en grasa.

[0071] ***Figura 23*** es un diagrama esquemático que muestra un método de cribado en triángulo de cultivo celular *in vitro* para compuestos de prueba con probabilidad de intensificar el RCT *in vivo*.

[0072] ***Figura 24*** muestra el efecto de AVP-26249 (SEQ ID No. 91) y AVP-26452 (SEQ ID No. 146) sobre la acumulación, mediada por LDL, de colesterol en células HepG2.

[0073] ***Figura 25*** muestra el efecto de AVP-26249 (SEQ ID No. 91) sobre la acumulación, mediada por Ac-LDL, de colesterol (TC) y colesteril éster (CE) en macrófagos humanos.

[0074] ***Figura 26*** muestra el efecto de AVP-26249 (SEQ ED NO 91) y AVP-26452 (SEQ ID No. 146) sobre la acumulación, mediada por LDL Oxidada (Ox-LDL), de colesterol (TC) y colesteril éster (CE) en células de músculo liso vascular humano.

[0075] ***Figura 27*** muestra el efecto de AVP-26249 (SEQ ID No. 91) y AVP-26452 (SEQ ID No. 146) sobre la descarga de colesterol de macrófagos humanos pre-cargados con Ac-LDL.

[0076] ***Figura 28*** muestra el efecto de AVP-26249 (SEQ ID No. 91) sobre el desarrollo de lesiones ateroscleróticas en la aorta de ratones ApoE-/-. Ratones macho ApoE-/- se mantuvieron en dieta de comida común durante 4 semanas y en HFD (1.25% de colesterol) durante 9.3 semanas. Los ratones recibieron AVP-26249 "***ad libitum***" mediante el agua potable en concentraciones de 0, 1.4 y 2.8 mpk durante 13.3 semanas. Al final del experimento se aislaron las aortas y se evaluaron en cuanto a la evolución de lesiones ateroscleróticas.

[0077] ***Figura 29*** muestra el efecto de AVP-26452 (SEQ ID No. 146) sobre el desarrollo de lesiones ateroscleróticas en la aorta de ratones ApoE-/-. Ratones macho ApoE-/- se mantuvieron en dieta de comida normal durante 4 semanas y en HFD (1.25% de colesterol) durante 9.3 semanas. Los ratones recibieron AVP-26452 "***ad libitum***" mediante el agua potable en concentraciones de 0, 1.4 y 2.8 mpk durante 13.3 semanas. Al final del experimento se aislaron las aortas y se evaluaron en cuanto a la evolución de lesiones ateroscleróticas.

[0078] ***Figura 30*** es un diagrama esquemático que muestra las rutas en el transporte y metabolismo del colesterol. Las abreviaturas incluyen CE, éster de colesterol; PLTP, proteína de transporte de fosfolípidos; TG, triglicérido; LDL, lipoproteína de baja densidad; HDL, lipoproteína de alta densidad; IDL, lipoproteína de densidad intermedia; LCAT, Lecitina:colesterol aciltransferasa.

Descripción Detallada de la Incorporación Preferida

[0079] Los mediadores de RCT in incorporaciones preferidas de la invención imitan la función y la actividad de ApoA-I. En un aspecto amplio, estos mediadores son moléculas que comprenden tres regiones, una región ácida, una región lipófila (por ejemplo, aromática), y una región básica. Las moléculas contienen preferiblemente una región con carga positiva, una región con carga negativa, y una región lipófila, sin carga. Las ubicaciones de las regiones con respecto una con otra pueden variar entre moléculas; por consiguiente, en una incorporación preferida, las

moléculas median el RCT independientemente de las posiciones relativas de las tres regiones en cada molécula. Aunque en algunas incorporaciones preferidas, la plantilla molecular o modelo comprende un residuo derivado de aminoácido ácido, un residuo derivado de aminoácido lipófilo, y un residuo derivado de aminoácido básico, enlazado en cualquier orden para formar un mediador de RCT, en otras incorporaciones preferidas, el modelo molecular puede incorporarse por un solo residuo con regiones ácidas, lipófilas y básicas, tales como por ejemplo, el aminoácido fenilalanina (SEQ ID No. 127).

[0080] En algunas incorporaciones preferidas, los mediadores moleculares de RCT comprenden trímeros de aminoácidos D- o L-naturales, análogos de aminoácido (sintéticos o semisintéticos), y derivados de aminoácido. Por ejemplo, un trímero puede incluir un residuo de aminoácido ácido o análogo del mismo, un residuo de aminoácido aromático o lipófilo o análogo del mismo, y un residuo de aminoácido básico o análogo del mismo, uniéndose los residuos por enlaces de péptido o amida. Por ejemplo, la secuencia de trímero EFR comprende un residuo ácido (ácido glutámico), un residuo aromático (fenilalanina) y un residuo de aminoácido básico (arginina). En otros aspectos preferidos de la invención, los mediadores moleculares pueden ser compuestos más grandes a base de aminoácido, que comprenden uno o más de trímeros de aminoácido. Por ejemplo, el decapéptido, YEFRDRMRTH, comprende la secuencia de trímero ácida-aromática-básica, EFR, ya discutida o efr o rfe, es decir, que contienen aminoácido D, residuos o E-(4-Fenil)-FR o residuos de aminoácido modificados o sintéticos o semisintéticos.

[0081] Aunque los mediadores moleculares de RCT comparten el aspecto común de reducir el colesterol en el suero mejorando las rutas de RCT directas y/o indirectas (es decir, aumentando la descarga de colesterol), los mediadores preferidos pueden exhibir *inter alia* uno o más de los siguientes atributos funcionales específicos: capacidad de formar estructuras helicoidales anfipáticas o sub-estructuras de las mismas en la presencia o ausencia de lípido, capacidad de fijar lípidos, capacidad de

formar complejos seudo-pre-ß o seudo-HDL ("***pre-ß-like or HDL-like complexes***"), capacidad de activar LCAT, y capacidad de aumentar la concentración de HDL en el suero.

[0082] A la fecha, los esfuerzos en diseñar agonistas ApoA-I se han centrado en las estructuras unitarias de 22-meros, por ejemplo, el "22-mero de consenso" de Anantharamaiah *y colaboradores,* 1990, *Arteriosclerosis* 10(l):95-105; Venkatachalapathi *y colaboradores,* 1991, *Mol. Conformation and Biol. Interactions, Indian Acad. Sci.* B:585-596, que son capaces de formar α-hélices anfipáticas en la presencia de lípidos. (Véase por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 6,376,464 dirigida a imitadores de péptido derivados de modificaciones del 22-mero de consenso). De acuerdo con un aspecto preferido de la presente invención, sub-estructuras α-helicoidales anfipáticas relativamente cortas (menos de alrededor de 10 residuos de aminoácido), que se derivan de cualquiera de los múltiples dominios α-helicoidales de la ApoA-I intacta se sintetizaron y probaron como mediadores de RCT. Hay varias ventajas de usar tales péptidos relativamente cortos, comparados con 22-meros más largos. Por ejemplo, los mediadores más cortos de RCT son más fáciles y menos costosos de producir, son química y adaptablemente más estables, las conformaciones preferidas permanecen relativamente rígidas, hay pocas o ningunas interacciones intra-moleculares en la cadena péptida, y los péptidos más cortos exhiben un mayor grado de disponibilidad oral. Múltiples copias de estos péptidos más cortos podrían fijarse a la HDL o LDL produciendo el mismo efecto de un péptido grande más restringido. Aunque la multifuncionalidad de ApoA-I puede basarse en las contribuciones de sus múltiples dominios α-helicoidales, es también posible que incluso una función única de ApoA-I, por ejemplo, activación de LCAT, pueda estar mediada en una forma redundante por más de uno de los dominios α-helicoidales. Por lo tanto, en un aspecto preferido de la presente invención, múltiples funciones de ApoA-I pueden imitarse por los mediadores divulgados de RCT, que se dirigen a un sub-dominio único.

[0083] Tres características funcionales de ApoA-I son

ampliamente aceptadas como criterios principales para el diseño de agonista ApoA-I: (1) capacidad de asociarse con fosfolípidos; (2) capacidad de activar LCAT; y (3) capacidad de promover la descarga de colesterol de las células. Algunas de las rutas de metabolismo y transporte de colesterol se ilustran en ***Figura 30***. Los mediadores moleculares de RCT, de acuerdo con algunas modalidades de la presente invención, pueden exhibir únicamente la última característica funcional – capacidad de aumentar RCT. No obstante, muy pocas otras propiedades de ApoA-I, que a menudo se pasan por alto, hacen de la ApoA-I una diana particularmente atractiva para intervención terapéutica. Por ejemplo, ApoA-I dirige el flujo de colesterol al hígado mediante un proceso mediado por receptor y modula la producción de pre-β-HDL (aceptor primario de colesterol de tejidos periféricos) mediante una reacción inducida por PLTP. No obstante, estas características permiten la ampliación de la potencial utilidad de moléculas miméticas de ApoA-I. Este enfoque, enteramente novedoso, de apreciar la función imitadora de ApoA-I, permitirá el uso de los péptidos o moléculas pequeñas derivadas de aminoácido, que se divulgan aquí, para facilitar el RCT directo (mediante la ruta HDL), así como RCT indirecto (es decir, interceptar y depurar las LDLs de la circulación, re-dirigiendo su flujo al hígado); véase por ejemplo ***Figura 30***. Para estar en capacidad de intensificar el RCT indirecto, los mediadores moleculares de la presente invención serán preferiblemente capaces de asociarse con fosfolípidos y fijarse al hígado (es decir, servir como ligando para sitios de fijación de lipoproteína hepática).

[0084] Por consiguiente, una meta de los esfuerzos investigativos que condujeron a la presente invención era identificar, diseñar y sintetizar los mediadores de de péptido estable, corto (menos de alrededor de 10 residuos de aminoácido), de RCT que exhiben conformación de fijación de lípido preferencial, aumentan el flujo de colesterol al hígado facilitando el transporte reverso de colesterol, directo y/o indirecto, mejoran el perfil de lipoproteína en el plasma y, posteriormente, previenen la evolución y/o promueven incluso la regresión de lesiones ateroscleróticas.

213 244

[0085] Nuestra estrategia de diseño de péptido fue: (1) determinar regiones interactivas relativamente cortas (3-15 residuos de aminoácido) en los dominios α-helicoidales anfipáticos de ApoA-I; (2) basar nuestra primera generación de péptidos en una secuencia ApoA-I exacta; (3) diseñar péptidos de acuerdo con las reglas generales surgidas de la investigación de dominios α-helicoidales anfipáticos de ApoA-I; (4) definir los límites inferiores de la longitud de secuencia de péptido, los residuos críticos de aminoácido, y la topografía exacta en el péptido más corto posible, que todavía exhibe tanto estructura secundaria α-helicoidal anfipática como actividad ApoA-I *in vitro* e *in vivo*; y (5) incorporar propiedades físico-químicas definidas en el diseño de péptidos de pseudo-pequeña-molécula ("***small-molecule-like peptides***") incluso más cortos y/o otras moléculas pequeñas que evolucionaron en el Modelo Molecular ya descrito.

[0086] Los mediadores de RCT de la invención pueden prepararse en formulaciones farmacéuticas estables en masa o unitarias, por ejemplo, productos lofilizados, que pueden reconstituirse antes del uso *in vivo* o reformularse. La invención incluye las formulaciones farmacéuticas y el uso de tales preparaciones en el tratamiento de hiperlipidemia, hipercolesterolemia, cardiopatía coronaria, arterioesclerosis, y otras afecciones tales como endotoxemia causante de choque septicémico.

[0087] La invención se ilustra mediante ejemplos prácticos que demuestran que los mediadores de RCT de la invención se asocian con el componente HDL y LDL del plasma, y pueden aumentar la concentración de partículas HDL y pre-β-HDL, y reducir los niveles en el plasma de LDL. En consecuencia, promueven el RCT directo e indirecto. Los mediadores de RCT de la invención aumentan la acumulación de colesterol mediado por LDL humana en hepatocitos humanos (células HepG2) (como se indica en ***Figura 24***). Los mediadores de RCT son también eficientes en activar PLTPy, por lo tanto, promueven la formación de partículas pre-β-HDL. El aumento del colesterol HDL sirvió como evidencia indirecta de la implicación de LCAT (activación de LCAT no se mostró directamente (*in*

vitro)) en el RCT. El uso de los mediadores de RCT de la invención *in vivo* en modelos animales resulta en un aumento de la concentración de HDL en el suero.

[0088] La invención se expone con más detalle en las sub-secciones siguientes, que describen la composición y estructura de los mediadores de RCT; la caracterización funcional y estructural; los métodos de preparación de formulaciones farmacéuticas unitarias y en masa; y los métodos de uso.

Estructura del Péptido y Función

[0089] Los mediadores de RCT de la invención son generalmente péptidos, o sus análogos, que imitan la actividad de ApoA-I. Los mediadores de RCT se componen de menos de alrededor de 10 residuos de aminoácido, o un análogo de los mismos. En algunas incorporaciones, por lo menos un enlace amida en el péptido se reemplaza con una amida sustituida, un isóstero de una amida o un imitador de amida. Adicionalmente, uno o más enlaces amida pueden reemplazarse con fracciones peptidomiméticas o miméticas de amida, que no interfieren significativamente la estructura o actividad de los péptidos. Fracciones miméticas apropiadas de amida se describen, por ejemplo, en Olson *y colaboradores*, 1993, *J. Med. Chem.* **36**:3039-3049.

[0090] Una característica preferida de los péptidos es su capacidad de formar α-hélices anfipáticas o sub-estructuras. Por anfipático se da a entender que la α-hélice tiene caras hidrófilas e hidrofóbicas opuestas orientadas a lo largo de su eje longitudinal, es decir, una cara de la hélice proyecta principalmente cadenas laterales hidrófilas, mientras que la cara opuesta proyecta principalmente cadenas laterales hidrófobas.

[0091] Como se discutirá seguidamente más a fondo en conjunción con formas mutadas o alteradas de los péptidos, ciertos residuos de aminoácido pueden reemplazarse con otros residuos de aminoácido, de manera que las caras hidrófilas e hidrófobas de la hélice formadas por los péptidos puedan no componerse enteramente de aminoácidos hidrófilos e

hidrófobos, respectivamente. Por lo tanto, hay que entender que cuando menciona la α-hélice anfipática formada por los péptidos de la invención, la expresión "cara hidrófila" se refiere a una cara de la hélice que tiene carácter hidrófilo neto general. La expresión "cara hidrófoba" se refiere a una cara del péptido que tiene carácter hidrófobo neto general. Sin pretender entrar en limitaciones teóricas particulares, se cree que ciertas propiedades físicas y/o estructurales de las estructuras helicoidales anfipáticas formadas por los péptidos pueden contribuir a su actividad. Las propiedades incluyen el grado de anfipaticidad, hidrofobicidad general, hidrofobicidad media, ángulos hidrófilos e hidrófobos, momento hidrófobo, momento hidrófobo medio, y carga neta de la α-hélice. El grado de anfipaticidad (grado de asimetría de hidrofobicidad) puede cuantificarse convenientemente calculando el momento hidrófobo (μ_H) de la hélice. Métodos para calcular μ_H para una secuencia péptida particular son bien conocidos en el arte, y se describen, por ejemplo en Eisenberg, 1984, *Ann. Rev. Biochem.* 53:595-623. El μ_H efectivo obtenido para un péptido particular dependerá del número total de residuos de aminoácido que componen el péptido. Por consiguiente, por lo general no es informativo comparar directamente μ_H para péptidos de longitudes diferentes.

[0092] Las anfipaticidades de péptidos de diferentes longitudes pueden compararse directamente mediante el momento hidrófobo medio ($<\mu_H>$). EL momento hidrófobo medio puede obtenerse dividiendo μ_H por el número de residuos en la hélice (es decir, $<\mu_H>=\mu_H/N$). Generalmente, los péptidos preferidos, que exhiben un $<\mu_H>$ en el margen de 0.45 a 0.65, determinado usando la escala de hidrofobicidad de consenso normalizada de Eisenberg (Eisenberg, 1984, *J. Mol. Biol.* 179:125-142), se consideran estar dentro del ámbito de la presente invención, prefiriéndose un $<\mu_H>$ en el margen de 0.50 a 0.60.

[0093] La hidrofobicidad general o total (H_o) de un péptido puede calcularse convenientemente tomando la suma algebraica de las hidrofobicidad de cada residuo de aminoácido en el péptido:

$$\left(es\ \ decir, H_o = \sum_{i=1}^{N} H_i\right),$$

donde N es el número de residuos de aminoácido en el péptido y H_i es la hidrofobicidad del residuo de aminoácido $_i$). La hidrofobicidad media (<H_o>) es la hidrofobicidad dividida por el número de residuos de aminoácido (es decir, <H_o>=H_o/N). Generalmente, péptidos que exhiben una hidrofobicidad media en el margen de -0.050 a -0.070, determinada usando la escala de hidrofobicidad de consenso normalizada de Eisenberg (Eisenberg, 1984, J. Mol. Biol. 179:125-142) se consideran estar dentro del ámbito de la presente invención, prefiriéndose una hidrofobicidad media en el margen de -0.030 a -0.055.

[0094] La hidrofobicidad total de la cara hidrófoba (H_o^{pho}) de una hélice anfipática puede obtenerse tomando la suma de las hidrofobicidades de los residuos hidrófobos de aminoácido que caen dentro del ángulo hidrófobo como se define a continuación:

$$H_o^{pho} = \sum_{i=1}^{N} H_i,$$

donde H_i es como se define anteriormente y N_H es el número total de aminoácidos hidrófobos en la cara hidrófoba). La hidrofobicidad media de la cara hidrófoba (<H_o^{pho}>) es H_o^{pho}/N_H, donde N_H es como ya se definió. Generalmente, péptidos que exhiben una <H_o^{pho}> en el margen de 0.90 a 1.20, determinada usando la escala de hidrofobicidad de consenso de Eisenberg (Eisenberg, 1984, más arriba; Eisenberg *y colaboradores*, 1982, más arriba) se consideran estar dentro del ámbito de la presente invención, prefiriéndose una <H_o^{pho}> en el margen de 0.94 a 1.10.

[0095] El ángulo hidrófobo (ángulo pho) se define generalmente como el ángulo o arco cubierto por el tramo continuo más largo de residuos hidrófobos de aminoácido cuando el péptido se dispone en la representación de la rueda helicoidal de Schiffer-Edmundson (es decir, el número de

24/217

residuos hidrófobos contiguos en la rueda multiplicado por 20°). El ángulo hidrófilo (ángulo phi) es la diferencia entre 360° y el ángulo pho (es decir, 360°- ángulo pho). Aquellas personas expertas en el arte reconocerán que los ángulos pho y phi dependerán, en parte, del número de residuos de aminoácido en el péptido.

[0096] Se espera que péptidos anfipáticos y mediadores moleculares, que poseen regiones ácidas, aromáticas y básicas, de acuerdo con aspectos preferidos de la presente invención, fijan fosfolípidos apuntando sus caras hidrófobas hacia las cadenas alquílicas de las fracciones del lípido. Se cree que el grupo hidrófobo generará afinidades de fijación de lípido suficientemente fuertes para los péptidos de la invención. Puesto que la fijación de lípido es pre-requisito para la activación de LCAT, se cree asimismo que el grupo hidrófobo puede intensificar la activación de LCAT. Adicionalmente, se ha descubierto a menudo que los residuos aromáticos son importantes en anclar péptidos y proteínas a lípidos (De Kruijff, 1990, *Biosci. Rep.* **10**:127-130; O'Neil and De Grado, 1990, *Science* **250**:645-651; Blondelle *y colaboradores*, 1993, *Biochim. Biaphys. Acta* **1202**:331-336).

[0097] Las interacciones ente los péptidos de la invención y los lípidos conducen en incorporaciones preferidas a la formación de complejos péptido-lípido. El tipo de complejo obtenido (co-micelas, discos, vesículas o multi-capas) dependerá de la relación molar lípido:peptido, formándose generalmente co-micelas con relaciones molares bajas lípido:péptido y complejos discoides y vesiculares o multi-capa con relaciones molares crecientes lípido:péptido. Esta característica se ha descrito para péptidos anfipáticos (Epand, The Amphipathic Helix, 1993) y para ApoA-I (Jones, 1992, Structure and Function of Apolipoproteins, Chapter 8, páginas 217-250). La relación molar lípido:péptido determina también el tamaño y composición de los complejos.

[0098] En el modelo estructural generalmente aceptado de ApoA-I, las α-hélices anfipáticas se empaquetan alrededor del borde de la HDL discoide. En este modelo, se asume que las hélices están alineadas

con sus caras hidrófobas apuntando hacia las cadenas acilo lipídicas (Brasseur *y colaboradores*, 1990, *Biochim. Biophys. Acta* **1043**:245-252). Las hélices se organizan en forma antiparalela, y se cree que un efecto cooperativo entre las hélices contribuye a la estabilidad del complejo de HDL discoide (Brasseur *y colaboradores*, más arriba). Aunque se ha propuesto que un factor que contribuye a la estabilidad del complejo de HDL discoide es la existencia de interacciones iónicas entre residuos ácidos y básicos en ApoA-I que resultan en la formación de puentes de sal intermoleculares o enlaces de hidrógeno entre residuos en hélices anti-paralelas adyacentes, tales interacciones intermoleculares no son necesarias para la actividad de los mediadores moleculares. Por consiguiente, características adicionales de algunos de los mediadores de RCT son su capacidad de formar enlaces de hidrógeno intermoleculares unos con otros cuando se alinean en una forma anti-paralela con sus caras hidrófobas apuntando en la misma dirección, como sería el caso cuando los mediadores están unidos a lípidos.

[0099] Se sostiene ampliamente que la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular o puente de sal entre residuos ácidos y básicos, respectivamente, en las posiciones i e i+3 de la hélice estabilizan la estructura helicoidal (Marqusee *y colaboradores*, 1985, *PNAS. USA* **84**(24):8898-8902). No obstante, tales interacciones intramoleculares son mínimas en los mediadores moleculares relativamente pequeños de la presente invención.

[0100] Tal como se emplea aquí, las abreviaturas de los aminoácidos L-enantioméricos genéticamente codificados son convencionales y son como sigue: Los D-aminoácidos se designan con minúscula, por ejemplo D-alanina = a, etc.

Tabla 1

Aminoácidos	Símbolo de Una Letra	Abreviatura Común
Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg

Asparagina	N	Asn
Ácido Aspártico	D	Asp
Cisteína	C	Cys
Glutamina	Q	Gln
Ácido Glutámico	E	Glu
Glicina	G	Gly
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Fenilalanina	F	Phe
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Treonina	T	Thr
Triptófano	W	Trp
Tirosina	Y	Tyr
Valina	V	Val

Aminoácidos	Símbolo de Una Letra	Abreviatura Común

[0101] Ciertos residuos de aminoácido en los mediadores de péptido de RCT pueden reemplazarse con otros residuos de aminoácido sin afectar significativamente en forma perjudicial, y en muchos casos incluso intensificando, la actividad de los péptidos. Por consiguiente, también contempladas por la presente invención se encuentran formas alteradas o mutadas de los mediadores de péptido de RCT en donde por lo menos un residuo de aminoácido definido en la estructura se sustituye con otro residuo de aminoácido o derivado y/o análogo del mismo. Como una de las características que afectan la actividad de los péptidos de la invención puede ser su capacidad de formar α-hélices en la presencia de lípidos que exhiben las propiedades anfipáticas y demás propiedades descritas anteriormente, se reconocerá que en incorporaciones preferidas de la invención, las sustituciones de aminoácido son conservadoras, es decir, el residuo de aminoácido reemplazante posee propiedades físicas y químicas que son similares al residuo de aminoácido que se está sustituyendo.

[0102] Para efectos de determinar sustituciones conservadoras de aminoácido, los aminoácidos pueden clasificarse convenientemente en

dos categorías principales – hidrófilos e hidrófobos – dependiendo principalmente de las características físico-químicas de la cadena lateral de aminoácido. Estas dos categorías principales pueden clasificarse a su vez en sub-categorías que definan más claramente las características de las cadenas laterales de aminoácido. Por ejemplo, la clase de aminoácidos hidrófilos puede subdividirse aún más en aminoácidos ácidos, básicos y polares. La clase de aminoácidos hidrófobos puede subdividirse aún más en aminoácidos aromáticos y no polares. Las definiciones de las distintas categorías de aminoácidos que definen ApoA-I son las siguientes:

[0103] El término "aminoácido hidrófilo" se refiere a un aminoácido que exhibe una hidrofobicidad de menos de cero de acuerdo con la escala de hidrofobicidad de consenso normalizado de Eisenberg *y colaboradores*, 1984, J. Mol. Biol. 179:125-142. Aminoácidos hidrófilos genéticamente codificados incluyen Thr (T), Ser (S), His (H), Glu (E), Asn (N), Gin (Q), Asp (D), Lys (K) y Arg (R).

[0104] El término "aminoácido hidrófobo" se refiere a un aminoácido que exhibe una hidrofobicidad de más de cero de acuerdo con la escala de hidrofobicidad de consenso normalizado de Eisenberg *y colaboradores*, 1984, J. Mol. Biol. 179:125-142. Aminoácidos hidrófobos genéticamente codificados incluyen Pro (P), Ile (I), Phe (F), Val (V), Leu (L), Trp (W), Met (M), Ala (A), Gly (G) y Tyr (Y).

[0105] El término "aminoácido ácido" se refiere a un aminoácido hidrófilo con un valor de cadena lateral pK de menos de 7. Los aminoácidos ácidos típicamente tienen cadenas laterales negativamente cargadas con pH fisiológico debido a la pérdida de un ión de hidrógeno ion. Aminoácidos ácidos genéticamente codificados incluyen Glu (E) y Asp (D).

[0106] El término "aminoácido básico" se refiere a un aminoácido hidrófilo con un valor de cadena lateral pK de más de 7. Los aminoácidos básicos típicamente tienen cadenas laterales positivamente cargadas con pH fisiológico debido a la asociación con un ión de hidronio. Aminoácidos básicos genéticamente codificados incluyen His (H), Arg (R).

y Lys (K).

[0107] El término "aminoácido polar" se refiere a un aminoácido hidrófilo con una cadena lateral que no está cargada con pH fisiológico, pero que tiene por lo menos un enlace en el cual el par de electrones compartidos en común por dos átomos se mantiene más estrechamente por uno de los átomos. Aminoácidos polares genéticamente codificados incluyen Asn (N), Gin (Q) Ser (S) y Thr (T).

[0108] El término "aminoácido no polar" se refiere a un aminoácido hidrófobo con una cadena lateral que no está cargada con pH fisiológico y que tiene enlaces en los cuales el par de electrones compartidos en común por dos átomos se mantiene por lo general en forma igual por cada uno de los dos átomos (es decir, la cadena lateral no es polar). Aminoácidos no polares genéticamente codificados incluyen Leu (L), Val (V), lie (I), Met (M), Gly (G) y Ala (A).

[0109] El término "aminoácido aromático" se refiere a un aminoácido hidrófobo con una cadena lateral que tiene por lo menos un anillo aromático o heteroaromático. El anillo aromático o heteroaromático puede contener uno o más sustituyentes tales como —OH, —SH, —CN, —F, —Cl, —Br, —I, —NO_2, —NO, —NH_2, —NHR, —NRR, —C(O)R, —C(O)OH, —C(O)OR, —$C(O)NH_2$, —C(O)NHR, —C(O)NRR y similares, donde cada R es independientemente (C_1 - C_6)alquilo, (C_1 - C_6) alquilo sustituido, (C_1 - C_6) alquenilo, (C_1 - C_6) alquenilo sustituido, (C_1 - C_6) alquinilo, (C_1 - C_6) alquinilo sustituido, (C_5 - C_{20}) arilo, (C_6 - C_{20}) arilo sustituido, (C_6 - C_{26}) alquilarilo, (C_6 - C_{26}) alquilarilo sustituido, heteroarilo de 5-20 miembros, heteroarilo de 5-20 miembros sustituido, alquilheteroarilo de 6-26 miembros o alquilheteroarilo de 6-26 miembros sustituido. Aminoácidos aromáticos genéticamente codificados incluyen Phe (F), Tyr (Y) y Trp (W).

[0110] El término "aminoácido alifático" se refiere a un aminoácido hidrófobo que tiene una cadena hidrocarburo alifático. Aminoácidos alifáticos genéticamente codificados incluyen Ala (A), Val (V), Leu (L) y Ile (I).

[0111] El residuo de aminoácido Cys (C) es inusual en el sentido de que puede formar puentes disulfuro con otros residuos Cys (C) u otros aminoácidos que contienen sulfanilo. La capacidad de los residuos Cys (C) (y demás aminoácidos con cadenas laterales que contienen —SH) de existir en un péptido, ya sea en la forma de —SH libre reducido o ya sea en la forma oxidada punteada con disulfuro, afecta en cuanto a si los residuos Cys (C) aportan carácter hidrófobo o hidrófilo neto a un péptido. Aunque Cys (C) exhibe una hidrofobicidad de 0.29 de acuerdo con la escala de consenso normalizado de Eisenberg (Eisenberg, 1984, más arriba), hay que entender que para efectos de la presente invención Cys (C) se categoriza como un aminoácido hidrófilo polar, a pesar de las clasificaciones generales ya definidas.

[0112] Como se observará por las personas expertas en el arte, las categorías ya definidas no son mutuamente excluyentes. Por lo tanto, amino ácidos con cadenas laterales que exhiben dos o más propiedades físico-químicas pueden incluirse en múltiples categorías. Por ejemplo, cadenas laterales de aminoácido con fracciones aromáticas que se sustituyen aún más con sustituyentes polares, tales como Tyr (Y), pueden exhibir propiedades tanto hidrófobas aromáticas como propiedades polares o hidrófilas y, por lo tanto, pueden incluirse en las categorías aromáticas y polares. La categorización apropiada de cualquier aminoácido será evidente a las personas expertas en el arte, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada aquí.

[0113] Ciertos residuos de aminoácido, llamados aminoácidos "disruptores de hélice" tienen una propensión a desestabilizar la estructura de las α-hélices cuando están contenidos en posiciones internas dentro de la hélice. Residuos de aminoácido que exhiben tales propiedades disruptoras de hélice son bien conocidos en el arte (véase, por ejemplo, Chou and Fasman, *Ann. Rev. Biochem*, 47:251-276) e incluyen Pro (P), Gly (G) y potencialmente todos los D-aminoácidos (cuando se encuentran contenidos en un L-péptido; inversamente, los L-aminoácidos desestabilizan la estructura helicoidal cuando se encuentran contenidos en

un D-péptido). Aunque estos residuos de aminoácido disruptor de hélice caen dentro de las categorías ya definidas, con la excepción de Gly (G), estos residuos generalmente no se usan para sustituir residuos de aminoácido en posiciones internas dentro de la hélice — por lo general se utilizan para sustituir 1-3 residuos de aminoácido en el N-término y/o C-término del péptido.

[0114] Aunque las categorías ya definidas se han ejemplificado en términos de los aminoácidos genéticamente codificados, las sustituciones de aminoácido no necesitan estar y, en ciertas incorporaciones preferiblemente no están, restringidas a los aminoácidos genéticamente codificados. Ciertamente, muchos de los mediadores de péptido preferidos de RCT contienen aminoácidos genéticamente no codificados. Por consiguiente, aparte de los aminoácidos genéticamente codificados, de ocurrencia natural, los residuos de aminoácido en los mediadores de péptido de RCT pueden sustituirse con aminoácidos no codificados de ocurrencia natural y aminoácidos sintéticos.

[0115] Ciertos aminoácidos comúnmente encontrados que proporcionan sustituciones útiles para los mediadores de péptido de RCT incluyen, pero no se limitan a, β-alanina (β-Ala) y otros omega-aminoácidos tales como ácido 3-aminopropiónico, ácido 2,3-diaminopropiónico (Dpr), ácido 4-aminobutírico, etc.; ácido α-aminoisobutírico (Aib); ácido ε-aminohexanoico (Aha); ácido δ-aminovalérico (Ava); N-metilglicina o sarcosina (MeGly); ornitina (Orn); citrulina (Cit); t-butilalanina (t-BuA); t-butilglicina (t-BuG); N-metilisoleucina (Melle); fenilglicina (Phg); ciclohexilalanina (Cha); norleucina (Nle); naftilalanina (Nal); 4-fenilfenilalanina, 4-clorofenilalanina (Phe(4-Cl)); 2-fluorofenilalanina (Phe(2-F)); 3-fluorofenilalanina (Phe(3-F)); 4-fluorofenilalanina (Phe(4-F)); penicilamina (Pen); ácido 1,2,3,4-tetrahdroisoquinolina-3-carboxílico (Tic); β-2-tienilalanina (Thi); sulfóxido de metionina (MSO); homoarginina (hArg); N-acetil lisina (AcLys); ácido 2,4-diaminobutírico (Dbu); ácido 2,3-diaminobutírico (Dab); p-aminofenilalanina (Phe

(pNH$_2$)); N-metil valina (MeVal); homocisteína (hCys), homofenilalanina (hPhe) y homoserina (hSer); hidroxiprolina (Hyp), homoprolina (hPro), aminoácidos N-metilados y peptoides (glicinas N-sustituidas).

[0116] Otros residuos de aminoácido no específicamente mencionados aquí pueden categorizarse fácilmente, con base en sus propiedades físicas y químicas observadas a la luz de las definiciones provistas aquí.

[0117] Las clasificaciones de los aminoácidos genéticamente codificados y comunes no codificados, de acuerdo con las categorías ya definidas se resumen en Tabla 2, más adelante. Hay que entender que Tabla 2 es para fines de ilustración únicamente y que no pretende ser un listado exhaustivo de residuos de aminoácido y derivados que pueden usarse para sustituir los mediadores de péptido de RCT descritos aquí.

Tabla 2. CLASIFICACIONES DE AMINOÁCIDOS COMÚNMENTE ENCONTRADOS

Clasificación	Genéticamente Codificado	No Genéticamente Codificado
Hidrófobo		
Aromático	F, Y, W	Phg, Nal, Thi, Tic, Phe (4-Cl), Phe (2-F), Phe (3-F), Phe (4-F), hPhe
No polar	L, V, I, M, G, A, P	t-BuA, t-BuG, Melle, Nle, MeVal, Cha, McGly, Aib
Alifático	A, V, L, I	b-Ala, Dpr, Aib, Aha, McGly, t-BuA, t-BuG, Melle, Cha, Nle, MeVal
Hidrófilo		
Ácido	D, E	
Básico	H, K, R	Dpr, Orn, hArg, Phe(p-NH$_2$), Dbu, Dab
Polar	C, Q, N, S, T	Cit, AcLys, MSO, bAla, hSer
Disruptor de Hélice	P, G	D-Pro y otros D-aminoacidos (en L-péptidos)

[0118] Otros residuos de aminoácido no específicamente

mencionados aquí puede categorizarse fácilmente, con base en sus propiedades físicas y químicas observadas a la luz de las definiciones provistas aquí.

[0119] Aunque en la mayoría de los casos, los aminoácidos de los mediadores de péptido de RCT se sustituirán con aminoácidos L-enantioméricos, las sustituciones no se limitan a aminoácidos L-enantioméricos. Por lo tanto, también incluidas en la definición de formas "mutadas" o "alteradas" se encuentran aquellas situaciones en que un L-aminoácido se reemplaza con un D-aminoácido idéntico (por ejemplo, L-Arg→D-Arg) o con un D-aminoácido de la misma categoría o subcategoría (por ejemplo, L-Arg D-Lys), y viceversa. Ciertamente, en ciertas incorporaciones preferidas que son apropiadas para administración oral a sujetos animales, los péptidos pueden componerse ventajosamente de por lo menos un aminoácido D-enantiomérico. Se cree que péptidos que contienen tales D-aminoácidos son más estables a la degradación en la cavidad oral, intestino o suero, que los péptidos compuestos exclusivamente de L-aminoácidos.

[0120] Como ya se anotó, los D-aminoácidos tienden a desestabilizar la estructura de las α-hélices cuando se encuentran contenidos en posiciones internas con un L-péptido α-helicoidal. Más aún, se ha observado que ciertas formas mutadas de los mediadores de péptido de RCT, que se componen enteramente de D-aminoácidos, exhiben una activación de LCAT significativamente inferior, en el análisis descrito aquí, que péptidos idénticos compuestos enteramente de L-aminoácidos. Como consecuencia, los D-aminoácidos no se usan por lo general para sustituir L-aminoácidos internos; las sustituciones de D-aminoácido se limitan generalmente a 1-3 residuos de aminoácido en el N-término y/o C-término del péptido. En el caso de péptidos de d-aminoácido pequeños, esta regla puede no aplicarse ya que múltiples copias del péptido podrían estar asociadas a HDL o LDL para adquirir la conformación necesaria para el RCT.

[0121] Como se discutió previamente, el aminoácido Gly (G)

actúa generalmente como un residuo disruptor de hélice cuando se encuentra contenido en posiciones internas de un péptido. Por lo tanto, aunque se considera generalmente que Gly (G) es un residuo disruptor de hélice, Gly (G) puede usarse para sustituir aminoácidos en posiciones internas de los mediadores de péptido de RCT. Preferiblemente, sólo residuos internos posicionados dentro de alrededor de ±1 vuelta helicoidal del centro del péptido (particularmente para péptidos compuestos de un número par de aminoácidos) se sustituyen con Gly (G). Adicionalmente, se prefiere que únicamente un residuo de aminoácido interno en el péptido se sustituya con Gly (G).

[0122] La estructura nativa de ApoA-I contiene ocho unidades helicodales que se cree que actúan en concierto para fijar lípidos (Nakagawa *y colaboradores*, 1985, *J. Am. Chem. Soc.* **107**:7087-7092; Anantharamaiah *y colaboradores*, 1985, *J. Biol. Chem.* **260**:10248-10262; Vanloo *y colaboradores*, 1991, *J. Lipid Res.* **32**:1253-1264; Méndez *y colaboradores*, 1994, *J. Clin. Invest.* **94**:1698-1705; Palgunari *y colaboradores*, 1996, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**:328-338; Demoor *y colaboradores*, 1996, *Eur. J. Biochem.* **239**:74-84). Por consiguiente, también incluidos en la presente invención se encuentran mediadores de RCT compuestos por dímers, trímeros, tetrámeros e inclusive polímeros de orden más elevado ("multímeros") de los dominios helicoidales descritos aquí. Tales multímeros pueden estar en la forma e. repeticiones en tándem, redes ramificadas o combinaciones de las mismas. Los mediadores de péptido de RCT pueden estar directamente unidos unos a otros, separados por uno o más enlazantes, o usarse independientemente para asociarse en estequiometría multimérica con lípido (por ejemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 de mediador:lípido y, posiblemente, relaciones estequiométricas más altas).

[0123] Los mediadores de péptido de RCT que comprenden los multímeros pueden incluir regiones de la secuencia peptídica de ApoA-I, análogos de la secuencia ApoA-I, formas mutadas de ApoA-I, formas truncadas o ínternamente eliminadas de ApoA-I, formas ampliadas de

ApoA-I y/o combinaciones de las mismas. Formas truncadas de los mediadores de péptido de RCT se obtienen eliminando uno o más aminoácidos del N- y/o C-término de mediadores de RCT. Formas eliminadas internamente se obtienen eliminando uno o más aminoácidos de las posiciones internas dentro de los mediadores de péptido de RCT. Los residuos de aminoácido interno eliminados pueden ser o no residuos consecutivos. Las personas expertas en el arte reconocerán que eliminar un residuo de aminoácido interno de mediadores de péptido de RCT puede hacer que el plano de la interface hidrófila-hidrófoba de la hélice rote en el punto de eliminación. Como tales rotaciones pueden alterar significativamente las propiedades anfipáticas de la hélice resultante, en una incorporación preferida de la invención los residuos de aminoácido se eliminan de tal modo que sustancialmente conserven la alineación del plano de la interface hidrófila-hidrófoba a lo largo de todo el eje longitudinal de la hélice.

Enlazantes

[0124] Los mediadores de péptido de RCT pueden conectarse o enlazarse en una forma cabeza-a-cola (es decir, N-término a C-término), una forma cabeza-a-cabeza, (es decir, N-término a N-término), una forma cola-a-cola (es decir, C-término a C-término), o combinaciones de las mismas. El enlazante LL puede ser cualquier molécula bifuncional capaz de enlazar covalentemente dos péptidos uno con otro. Por consiguiente, enlazantes apropiados son moléculas bifuncional en las cuales los grupos funcionales son capaces de unirse covalentemente al N- y/o C-término de un péptido. Grupos funcionales adecuados para unión al N-, o C-término de péptidos son bien conocidos en el arte, como químicas apropiadas para efectuar tal formación de enlace covalente.

[0125] El enlazante puede ser flexible, rígido o semi-rígido, dependiendo de las propiedades deseadas del multímero. Enlazantes adecuados incluyen, por ejemplo, residuos de aminoácido tales como Pro o Gly o segmentos de péptido que contienen desde alrededor de 2 hasta

alrededor de 5, 10, 15 ó 20 ó incluso más aminoácidos, compuestos orgánicos bifuncionales tales como $H_2N(CH_2)_nCOOH$ donde n es un entero de 1 a 12, y similares. Ejemplos de tales enlazantes, así como métodos de fabricar tales enlazantes y péptidos que incorporan tales enlazantes son bien conocidos en el arte (véase, por ejemplo, Hunig *y colaboradores*, 1974, *Chem. Ber.* **100**:3039-3044; Basak *y colaboradores*, 1994, *Bioconjug. Chem.* **5**(4):301-305).

[0126] Enlazantes de péptido y oligonucleótido que pueden segmentarse selectivamente, así como medios para segmentar los enlazantes son bien conocidos y serán fácilmente evidentes a las personas expertas en el arte. Enlazantes apropiados de compuestos orgánicos que pueden segmentarse selectivamente serán evidentes a las personas expertas en el arte, e incluyen los descritos, por ejemplo, en WO 94/08051, así como las referencias citadas allí.

[0127] Enlazantes de longitud y flexibilidad suficientes incluyen, pero no se limitan a, Pro (P), Gly (G), Cys-Cys, $H_2N—(CH_2)_n—COOH$ donde n es 1 a 12, preferiblemente 4 a 6; H_2N-aril-COOH y carbohidratos.

[0128] Alternativamente, como las apolipoproteínas permiten una fijación cooperativa entre segmentos helicoidales antiparalelos, los enlazantes de péptido que corresponden en secuencia primaria a los segmentos de péptido que conectan hélices adyacentes de las apolipoproteínas nativas, incluidas, por ejemplo, ApoA-I ApoA-II, ApoA-IV, ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III, ApoD, ApoE y ApoJ pueden usarse convenientemente para enlazar los péptidos. Estas secuencias son bien conocidas en el arte (véase, por ejemplo, Rosseneu *y colaboradores*, "Analysis of the Primary and of the Secondary Structure of the Apolipoproteins," En: Structure and Function of Lipoproteins, Ch. 6, 159-183, CRC Press, Inc., 1992).

[0129] Otros enlazantes que permiten la formación de enlaces hidrógeno intermoleculares o puentes de sal entre repeticiones tándem de segmentos helicoidales antiparalelos incluyen giros inversos de péptido

tales como giros β y giros γ, así como moléculas orgánicas que imitan las estructuras de giros β y/o giros γde péptido. Generalmente, los giros inversos son segmentos de péptido que invierten la dirección de la cadena polipeptídica, con el fin de permitir que una sola cadena polipeptídica adopte regiones de hoja β antiparalela o estructura α-helicoidal antiparalela. Por lo general, los giros β están compuestos de cuatro residuos de aminoácido y los giros γ se componen generalmente de tres residuos de aminoácido.

[0130] Alternativamente, el enlazante (LL) puede comprender una molécula orgánica o fracción que imite la estructura de un giro β o γ de un péptido. Tales fracciones miméticas de un giro β y/o γ, así como métodos para sintetizar péptidos que contienen tales fracciones, son bien conocidos en el arte, e incluyen, entre otros, los descritos en Giannis y Kolter, 1993 *Angew. Chem. Intl. Ed. Eng.* **32**:1244-1267; Kahn *y colaboradores*, 1988, *J. Molecular Recognition* 1:75-79; y Kahn *y colaboradores*, 1987, *Tetrahedron Lett.* **28**:1623-1626.

[0131] Los segmentos helicoidales unidos a una sola fracción enlazante no necesitan unirse mediante términos similares. En efecto, en algunas incorporaciones los segmentos helicoidales se unen a una sola fracción enlazante, de modo que se dispongan en una manera antiparalela, es decir, algunas de las hélices se unen mediante sus términos N, otras mediante sus términos C.

[0132] Los segmentos helicoidales pueden unirse directamente a la fracción enlazante, o pueden distanciarse de la fracción enlazante mediante uno o más enlazantes bifuncionales (LL), como se describió previamente.

[0133] El número de nodos en la red dependerá generalmente del número total deseado de segmentos helicoidales y, típicamente, será desde alrededor de 1 a 2. Naturalmente, se observará que para un número dado de segmentos helicoidales deseados, las redes que tengan fracciones enlazantes de orden más elevado poseerán menos nodos.

[0134] Las redes pueden ser de orden uniforme, es decir, redes

230

en las cuales todos los nodos son, por ejemplo, fracciones enlazantes trifuncionales o tetrafuncional, o pueden ser de orden mixto, p. ej., redes en las cuales los nodos son mezclas de, por ejemplo, fracciones enlazantes trifuncionales y tetrafuncionales. Lógicamente, hay que entender que, incluso en redes de orden uniforme, las fracciones enlazantes no necesitan ser idénticas. Una red de orden terciario puede emplear, por ejemplo, dos, tres, cuatro o incluso más fracciones enlazantes trifuncionales diferentes.

[0135] Al igual que los multímeros lineales, los segmentos helicoidales que comprenden la red ramificada pueden ser, pero no necesitan ser, idénticos.

Análisis de Estructura y Función

[0136] La estructura y/o funcionamiento de los mediadores de RCT de la invención, incluidas las formas multiméricas ya descritas, pueden analizarse con el fin de seleccionar compuestos activos. Por ejemplo, los péptidos o análogos de péptido pueden analizarse con respecto a su capacidad de formar α-hélices, fijar lípidos, formar complejos con lípidos, activar LCAT, y promover descarga de colesterol, etc.

[0137] Métodos y análisis para analizar la estructura y/o funcionamiento de los péptidos son bien conocidos en el arte. Métodos preferidos se proveen en los ejemplos prácticos, más abajo. Por ejemplo, análisis de dicroísmo circular (CD) y resonancia magnética nuclear (NMR) descritos más abajo, pueden empelarse para analizar la estructura de los péptidos o análogos de péptido – particularmente el grado de felicidad en la presencia de lípidos. La capacidad de fijar lípidos puede determinarse usando el análisis de espectrocopia de fluorescencia descrito más abajo. La capacidad de los péptidos y/o análogos de péptido para activar LCAT puede determinarse fácilmente usando la activación de LCAT descrita más abajo. Los análisis *in vitro* e *in vivo*, descritos más abajo, pueden usarse para evaluar la vida media, distribución, descarga de colesterol y efectos sobre RCT.

231

Incorporación Preferida

[0138] Los mediadores de RCT de la invención pueden definirse adicionalmente mediante incorporaciones preferidas.

[0139] En una incorporación preferida, hay una molécula que comprende una composición a base de aminoácidos con tres regiones independientes: una región ácida, una región aromática o lipófila, y una región básica. Por consiguiente, un péptido trimérico de acuerdo con esta incorporación preferida, tal como EFR, o erf o fre, contiene un residuo de aminoácidos ácido, un residuo aromático o lipófilo y un residuo básico. Las localizaciones relativas de las regiones con respecto unas a otras pueden variar entre mediadores moleculares; las moléculas median RCT independientemente de la posición de las tres regiones dentro de cada molécula. En mediadores que comprenden un péptido trimérico, tal como EFR o efr, los trímeros pueden consistir de D- o L-aminoácidos naturales, análogos de aminoácidos, y derivados de aminoácidos.

[0140] En otra incorporación preferida, la región aromática del trímero puede consistir de ácido nicotínico con una cadena(s) lateral ácida o básica.

[0141] En otra incorporación preferida, la región aromática del trímero puede consistir de 4-fenil fenilalanina.

[0142] En otra variación preferida, los mediadores moleculares que comprenden una estructura trimérica a base de aminoácidos pueden taponarse opcionalmente por un grupo(s) lipófilo en el terminal amino o carboxilo en cualquiera de los dos extremos o a ambos extremos para mejorar las propiedades físico-químicas de los mediadores moleculares de RCT y sacar ventaja del sistema de transporte (absorción) activo o natural de materiales grasosos o lipófilos en el cuerpo. Los grupos taponantes pueden ser enantiómeros D o L o moléculas no enantioméricas o grupos. En incorporaciones preferidas, los grupos taponantes N-terminales se seleccionan del grupo conformado por acetilo, fenilacetilo, di-terc-butil-4-hidroxi-fenilo, naftilo, naftilo sustituido, f-MOC, bifenilo, fenilo

sustituido, heterociclos sustituidos, alquilo, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo fusionado, heteroarilo saturado, heteroarilo saturado sustituido y similares. El C-terminal se tapona preferiblemente con una amina tal como RNH_2 en donde R = di-terc-butil-4-hidroxi-fenilo, naftilo, naftilo sustituido, f-MOC, bifenilo, fenilo sustituido, heterociclos sustituidos, alquilo, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo fusionado, heteroarilo saturado, heteroarilo saturado sustituido, y similares.

[0143] En una incorporación preferida, los mediadores de RCT de la invención se seleccionan del grupo de péptidos y derivados de péptido divulgados en la siguiente Tabla 3, en donde la totalidad de los péptidos se taponan con un grupo acetilo en el N-término y un grupo amida en el C-término (a menos que se especifique lo contrario):

Tabla 3

SEQ ID No.	Secuencia
1	YEFRDRMRTH
2	PVAEEFRDRMRTHVDSLRTQLAP
3	EEFRDRMRTHVDSLRTQLAP
4	FRDRMRTHVDSLRTQLAP
5	RDRMRTHVDSLRTQLAP
6	RTHVDSLRTQLAP
7	THVDSLRTQLAP
8	DSLRTQLAP
9	PVAEEFRDRMRTHV
10	PVAEEFRDRMR
11	PVAEEFRDRM
12	PVAEEFRDR
13	PVAEEF
14	PVAEE
15	MRTHVDSLRTQLAP
16	PVAEEFRDRMRTHVDSLR
17	WDKVKDF
18	SGRDYVSQFES
19	YLDEFQKKWKE
20	TRDFWDNLEKETDW

233

21	WDKVKDFANVYVDAVKD
22	PhCH2CO-YEFRDRMRTH
23	YEFRDRMRTH
24	Piv-YEFRDRMRTH
25	EFRDRMRTH
26	EFRDRMR
27	FRDRMRTH
28	yFRDRMRTh
29	eEFRDRMR
30	FrDRFRDr
31	EFRDRm
32	EFRDR
33	EFRD
34	EFR
35	rDRMRTh
36	dRMRTH
37	FrDRMRT
38	FRDRMR
39	FfRDRMr
40	FRDRM
41	YFRDRM
42	YFRDr
43	FRDRf
44	EFRDRMRTF
45	EFRDRf
46	FrDrFF
47	FrDrFY
48	FfDRFRDRf
49	mrDRFRDRm
50	FRDRFRDRF
51	FRDRMRDRM
52	MRDRFRDRM
53	RMRDRmr
54	FRDRMRDRF
55	EFRDRMRDRFE
56	FRdR
57	FRD
58	YFRD
59	frDRMRDRm
60	MRDRM

61	mRDRM
62	FRDRF
63	FRDRf
64	RMRDRMR
65	DRMRD
66	dRMRd
67	frDRMRDrF
68	RFEEFR
69	FRTRf
70	FRMRf
71	efRDRMRDRf
72	DRMRDF
73	yyyp-EFRDRMRTH
74	Yyp-EFRDRMRt
75	YyYpEFRDRMRt
76	EFRDRMRy
77	yyypEFRDRMR
78	YEFRDRm
79	yYYpEFRDRm
80	EFRDRy
81	EFRDy
82	yYYp-EFRD
83	efry
84	yYP-EFR
85	yYYp-EFRDr
86	erf
87	EEFRDR
88	EYR
89	E-(L-2-b-Naftilalanina)-R
90	E-(L-1-b-Naftilalanina)-R
91	E-BIP-R
92	H-EFR-OH
93	EFR-OH
94	H-EFR
95	RFE
96	Efr
97	2-Nap-EFR
98	yefr
99	2-Nap-efiy
100	Piv-efry

235

101	Fmoc-efry
102	2-Nap-erf
103	2-Nap-yefr
104	Piv-EFR
105	NA-EFR
106	3,5-diterciario-butil-4-hidroxi-PhCO-E-(E-BIP-R-NH_2)
107	YWHVWQQDE
108	YQWDKVKDF
109	ENWDTLGSY
110	SGRDYVSQFES
111	VRQEMNKDLEEVKQKVY
112	YQMRESLAQRLY
113	TRDFWDNLEKETDWY
114	DEFQKKWKEY
115	WKEDVELYRQKV
116	YSLAQRLAELKSY
117	QESARQKLQELQY
118	yerf
119	rfe
120	Fmoc-EFR-OH
121	NA-yerf
122	NA-E-BIP-R
123	erfy
124	NA-erfy
125	2-Nap-E-BIP-R
126	NA-efr
127	H-F-OH(L o D)
128	3,5-diterciario-butil-4-hidroxi-PhCO-E-BIP-R
129	(1-Naftil)-L-alanina
130	(1-Naftil)-D-alanina
131	(2-Naftil)-L-alanina
132	(2-Naftil)-D-alanina
133	BIP-A
134	BIP-a
135	NA-fre
136	1-Nap-erfy
137	1-Nap-E-BIP-R
138	NA-yfre
139	yfre
140	NA-erf

236

141	2-Nap-efry-OH
142	3,5-diterciario-butil-4-hidroxi-PhCO-frey
143	NA-frey
144	NA-fr
145	e-BIP-r
146	e-bip-r
147	Isox-e-bip-r
148	1-Nap-rfey
149	1-Nap-frey
150	E-BIP-R-OH
151	3,5-diterciario-butil-4-hidroxi-PhCO-erf
152	frey
153	rfey
154	3,5-diterciario-butil-4-hidroxi-PhCO-fer
155	Isoxazol-refy
156	refy
157	NA-refy
158	3,5-diterciario-butil-4-hidroxi-PhCO-refy
159	Isoxazol-fer
160	Isoxazol-yref
161	NA-yref
162	3,5-diterciario-butil-4-hidroxi-PhCO-fery
163	3,5-diterciario-butil-4-hidroxi-PhCO-fr
164	Isoxazol-fery
165	3,5-diterciario-butil-4-hidroxi-PhCO-rfey
166	fery
167	3,5-diterciario-butil-4-hidroxi-PhCO-rf
168	NA-yfer
169	Isoxazol-yfer
170	NA-fer
171	3,5-diterciario-butil-4-hidroxi-PhCO-yfer
172	Isoxazol-rfe
173	1-Nap-yfer
174	1-Nap-rfe
175	NA-rfe
176	E-F(4-I)-R

[0144] Las abreviaturas usadas para los D-enantiómeros de los aminoácidos genéticamente codificados son equivalentes en minúscula de los símbolos de una letra mostrados en Tabla 1. Por ejemplo, "R" designa

L-arginina y "r" designa D-arginina. A menos que se indique lo contrario (p. ej., "OH"), el N-término se acetila y el C-término se amida.

[0145] **PhAc** denota fenilacetilado.

[0146] **Piv** denota pivolilado.

[0147] **1-Nap & 2-Nap** indican taponado con ácido naftílico.

[0148] **Fmoc** denota un N-término modificado con 9-fluorenilmetiloxicarbonilo.

[0149] **NA** denota ácido nicotínico.

[0150] **BIP** denota bifenilalanina.

[0151] **Isoxazlol** denota derivado de ácido 5-metil-isoxazol-3-carboxílico.

[0152] Sustituciones de aminoácidos no necesitan restringirse y, en ciertas incorporaciones preferiblemente no están restringidas a los aminoácidos genéticamente codificados. Por consiguiente, aparte de los aminoácidos codificados genéticamente, de ocurrencia natural, residuos de aminoácido en los mediadores de péptido de RCT pueden sustituirse con aminoácidos no codificados, de ocurrencia natural, y aminoácidos sintéticos.

Métodos Sintéticos

[0153] Los péptidos de la invención pueden prepararse usando virtualmente cualquier técnica conocida en el arte para la preparación de péptidos. Por ejemplo, los péptidos pueden prepararse usando síntesis de péptidos convencionales de solución gradual o síntesis de fase sólida, o técnicas de DNA recombinante.

[0154] Los mediadores de péptido de RCT pueden prepararse usando síntesis convencionales de solución gradual o fase sólida (véase, por ejemplo, Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, Williams *y colaboradores*, Eds., 1997, CRC Press, Boca Raton Fla., y las referencias citadas allí; Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, Atherton & Sheppard, Eds., 1989, IRL Press, Oxford, England, y las referencias citadas allí). Véase ***Figura 1***.

238

[0155] En la síntesis convencional de fase sólida, la unión del primer aminoácido comprende hacer reaccionar químicamente su extremo de terminal carboxilo (C-terminal) con una resina derivada para formar el extremo del terminal carboxilo del oligopéptido. El extremo α-amino del aminoácido se bloquea típicamente con un grupo t-butoxi-carbonilo (t-Boc) o con un grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (F-Moc) para prevenir que el grupo amino, que podría reaccionar en otra forma, participe en la reacción de acoplamiento. Los grupos de cadena lateral de los aminoácidos, si son reactivos, se bloquean también (o protegen) por varios grupos protectores derivados de bencilo en la forma de éteres, tioéteres, ésteres y carbamatos.

[0156] El siguiente paso y ciclos repetitivos subsiguientes involucran desbloquear el aminoácido (o residuo terminal de la cadena páptídica), ligado a la resina amino-terminal (N-terminal), para eliminar el grupo bloqueador α-amino, seguido por adición química (acoplamiento) del siguiente aminoácido bloqueado. Este proceso se repite sin embargo, ya que son necesarios muchos ciclos para sintetizar toda la cadena peptídica de interés. Luego de cada uno de los pasos de acoplamiento y desbloqueo, el péptido ligado a la resina se lava concienzudamente para eliminar cualesquiera reactivos residuales antes de pasar al siguiente. Las partículas de soporte sólido facilitan el retiro de los reactivos en cualquier paso dado, ya que la resina y el péptido ligado a la resina pueden filtrarse y lavarse fácilmente mientras se mantienen en una columna o dispositivo con orificios porosos.

[0157] Péptidos sintetizados pueden liberarse de la resina por catálisis de ácido (típicamente con ácido fluorhídrico o ácido trifluoroacético), que escinde el péptido de la resina dejando un grupo carboxilo o amida en su aminoácido C-terminal. La descomposición acidolítica sirve también para retirar los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos en el péptido sintetizado. Los péptidos acabados pueden entonces purificarse por cualquiera de una variedad de métodos de cromatografía.

[0158] De acuerdo con una incorporación preferida, los péptidos

y mediadores derivados de péptido de RCT se sintetizaron mediante métodos de síntesis de fase sólida con química N^{α}-Fmoc. Aminoácidos protegidos con N^{α}-Fmoc y resina MBHA de amida de Rink y resina de Wang se adquirieron de Novabiochem (San Diego, CA) o Chem-Impex Intl (Wood Dale, IL). Otros productos químicos y disolventes se adquirieron de las siguientes fuentes: ácido trifluoroacético (TFA), anisol, 1,2-etanoditiol, thioanisol, piperidina, anhídrido acético, ácido 2-naftoico y ácido pivaloico (Aldrich, Milwaukee, WI), HOBt y NMP (Chem-Impex Intl, Wood Dale, IL), diclorometano, metanol y disolventes grado HPLC de Fischer Scientific, Pittsburgh, PA. La pureza de los péptidos se verificó por LC/MS. La purificación de los péptidos se logró usando un sistema de HPLC Preparativa (Agilent technologies, 1100 Series) en una columna de sílices C_{18}-enlazada (columna preparativa Tosoh Biospec, ODS-80TM, Dim: 21.5 mm x 30cm). Los péptidos se eluyeron con un sistema de gradiente [50% a 90% de disolvente B (acetonitrilo:agua 60:40 con 0.1%.TFA)].

[0159] Todos los péptidos se sintetizaron en una forma gradual mediante el método de fase sólida, utilizando resina MBHA de amida de Rink (0.5-0.66 mmol/g) o resina de Wang (1.2 mmol/g). Los grupos protectores de cadena lateral fueron Arg (Pbf), Glu (OtBu) y Tyr (tBu). Cada aminoácido protegido Fmocse acopló a esta resina usando un exceso de 1.5 a 3 veces de los aminoácidos protegidos. Los reactivos de acoplamiento fueron N-hidroxibenzotriazol (HOBt) y diisopropil carbodiimida (DIC), y el acoplamiento de monitoreó mediante la prueba de ninhidrina. El grupo Fmoc se retiró con 20% piperidina en tratamiento NMP de 30-60 minutos y, seguidamente, lavados sucesivos con CH_2Cl_2, 10%TEA en CH_2Cl_2, metanol y CH_2Cl_2. Los pasos de acoplamiento fueron seguidos por acetilación u otros grupos taponantes, según fuera necesario.

[0160] Una mezcla de TFA, tioanisol, etanoditiol y anisol (90:5:3:2, v/v) se utilizó (4-5 horas a temperatura de la sala) para escindir el péptido de la resina-péptido y retirar todos los grupos protectores péptido-

240

resina. La mezcla de péptido crudo se filtró del embudo sinterizado, que se lavó con TFA (2-3 veces). El filtrado se concentró en un jarabe espeso y se agregó en éter frío. El péptido se precipitó como un sólido blanco luego de mantenerlo de un día para otro en el refrigerador y de centrifugarlo. La solución se decantó y el sólido se lavó concienzudamente con éter. El péptido crudo resultante se disolvió en tampón (acetonitrilo:agua 60:40 con 0.1% TFA) y se secó. El péptido crudo se purificó por HPLC usando columna C-18 preparativa (fase reversa) con un sistema de gradiente 50 - 90% B en 40 minutos [Tampón A: agua que contenía 0.1% (v/v) TFA, Tampón B: acetonitrilo:agua (60:40) que contenía 0.1% (v/v) TFA. Las fracciones puras se concentraron sobre. Los rendimientos estuvieron entre el 5% y el 20%.

[0161] Péptidos taponados sintetizados como se describe más arriba se muestran en Tabla 4.

Tabla 4

SEQ ID No.	Secuencia
34	Ac-E-F-R-NH2
83	Ac-e-f-r-y-NH_2
86	Ac-e-r-f-NH2
91	Ac-E-BIP-R-NH2
97	2-Nap-E-F-R-NH2
98	Ac-y-e-f-r-NH2
99	2-Nap-e-f-r-yNH2
100	Piv-e-f-r-y-NH2
101	Fmoc-e-f-r-y-NH2
102	2-Nap-e-r-f-NH2
103	2-Nap-y-e-f-r-NH2
104	Piv-E-F-R-NH2
105	NA-E-F-R-NH2
106	3,5-diterciario-butil-4-hidroxi-PhCO-E-(E-BIP-R-NH2)
118	Ac-y-e-r-f-NH2
119	Ac-r-f-e-NH2
120	Fmoc-E-F-R-OH
121	NA-y-e-r-f-NH2
122	NA-E-BIP-R-NH2

241

123	Ac-e-r-f-y-NH2
124	NA-e-r-f-y-NH2
126	NA-e-f-r-NH2
125	2-Nap-E-BIP-R-NH_2

[0162] **Ac** denota acetilado.

[0163] **Piv** denota pivolilado.

[0164] **1-Nap & 2-Nap** indica taponado con ácido naftílico.

[0165] **Fmoc** denota un N-término modificado con 9-fluorenilmetiloxicarbonilo.

[0166] **NA** denota ácido nicotínico.

[0167] **BBP** denota bifenilalanina.

[0168] **Isoxazol** denota derivado de ácido 5-metil-isoxazol-3-carboxílico.

[0169] Alternativamente, los péptidos de la invención pueden prepararse mediante condensación de segmento, es decir, la unión conjunta de pequeñas cadenas constitutivas de péptido para formar una cadena de péptido más grande, como se describe, por ejemplo, en Liu *y colaboradores*, 1996, *Tetrahedron Lett.*, **37**(7):933-936; Baca, *y colaboradores*, 1995, *J. Am. Chem. Soc.* **117**:1881-1887; Tam *y colaboradores*, 1995, *Int. J. Peptide Protein Res.* 45:209-216; Schnolzer y Kent, 1992, *Science* **256**:221-225; Liu y Tam, 1994, *J. Am. Chem. Soc.* **116**(10):4149-4153; Liu y Tam, 1994, *PNAS. USA* **91**:6584-6588; Yamashiro y Li, 1988, *Int. J. Peptide Protein Res.* **31**:322-334; Nakagawa *y colaboradores*, 1985, *J. Am Chem. Soc.* **107**:7087-7083; Nokihara *y colaboradores*, 1989, *Peptides* **1988**:166-168; Kneib-Cordonnier *y colaboradores*, 1990, *Int. J. Pept Protein Res.* 35:527-538; cuyas divulgaciones se incorporan aquí en su integridad por referencia a ellas). Otros métodos útiles para sintetizar los péptidos de la invención se describen en Nakagawa *y colaboradores*, 1985, *J. Am. Chem. Soc.* **107**:7087-7092.

[0170] Para péptidos producidos por condensación de segmento, la eficiencia de acoplamiento del paso de condensación se puede aumentar

242

significativamente incrementando el tiempo de acoplamiento. Típicamente, aumentar el tiempo de acoplamiento resulta en una racemización incrementada del producto (Sieber *y colaboradores*, 1970, *Helv. Chim. Acta* 53:2135-2150). No obstante, puesto que la glicina carece de un centro quiral, no sufre racemización (los residuos de prolina, debido a inhibición estérica, también experimentan poca o ninguna racemización en tiempos prolongados de acoplamiento). Por lo tanto, incorporaciones que contienen residuos internos de glicina pueden sintetizarse en masa con alto rendimiento mediante condensación de segmento sintetizando segmentos constituyentes, que sacan ventaja del hecho de que los residuos de glicina no sufren racemización. Por consiguiente, incorporaciones que contienen residuos internos de glicina brindan ventajas sintéticas significativas para preparación en masa a gran escala.

[0171] Mediadores de RCT que contienen grupos bloqueadores N- y/o C-terminales pueden prepararse usando técnicas estándar de química orgánica. Por ejemplo, métodos para acilar el N-término de un péptido o amidar o esterificar el C-término de un péptido son bien conocidos en el arte. Modos de realizar otras modificaciones en el N- y/o C-término serán evidentes a las personas expertas en el arte, como los serán modos de proteger cualesquiera funcionalidades de cadena lateral que pueda ser necesario para unir grupos de bloqueo terminales.

[0172] Sales farmacéuticamente aceptables (iones contrarios) que pueden prepararse convenientemente mediante cromatografía de intercambio iónico u otros métodos son bien conocidas en el arte.

[0173] Compuestos de la invención que están en la forma de multímeros en tándem pueden sintetizarse convenientemente agregando el enlazante (s) a la cadena peptídica en el paso apropiado en la síntesis. Alternativamente, los segmentos helicoidales pueden sintetizarse y cada segmento puede hacerse reaccionar con el enlazante. Naturalmente, el método actual de síntesis dependerá de la composición del enlazante. Esquemas protectores apropiados y químicas son bien conocidos, y serán evidentes a las personas expertas en el arte.

243

[0174] Compuestos de la invención que están en la forma de redes ramificadas pueden sintetizarse convenientemente usando las resinas triméricas y tetraméricas y las químicas descritas en, 1988, *PNAS* USA 85:5409-5413 y Demoor *y colaboradores*, 1996, *Eur. J. Biochem.* 239:74-84. La modificación de las resinas sintéticas y las estrategias de sintetizar redes ramificadas de nivel más alto o más bajo, o que contienen combinaciones de diferentes segmentos helicoidales de péptido, se encuentran bien dentro de las capacidades de aquellas personas expertas en el arte de la química de péptidos y/o química orgánica.

[0175] La formación de enlaces disulfuro, si se desea, se lleva a cabo generalmente en la presencia de de agentes oxidantes suaves. Pueden utilizarse agentes oxidantes químicos, o los compuestos pueden simplemente exponerse a oxígeno atmosférico para efectuar estos enlaces. En el arte se conocen varios métodos, incluidos los descritos, por ejemplo, por Tam *y colaboradores*, 1979, *Synthesis* 955-957; Stewart *y colaboradores*, 1984, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2d Ed., Pierce Chemical Company Rockford, IL; Ahmed *y colaboradores*, 1975, *J. Biol. Chem.* 250:8477-8482; y Pennington *y colaboradores*, 1991 *Peptides* 1990:164-166, Giralt and Andreu, Eds., ESCOM Leiden, The Netherlands. Una alternativa adicional se describe por Kamber *y colaboradores*, 1980, *Helv. Chim. Ada* 63:899-915. Un método conducido en soportes sólidos se describe por Albericio, 1985, *Int. J. Peptide Protein Res.* 26:92-97. Cualquiera de estos métodos puede emplearse para formar enlaces disulfuro en los péptidos de la invención. Compuestos adicionales derivados de aminoácidos químicamente sintetizados se muestra en la siguiente Tabla 5.

TABLA 5

COMPUESTO #	SECUENCIA	FÓRMULA MOLECULAR	PESO MOLECULAR
1	Ac-E-F-R-NH_2	$C_{22}H_{33}N_7O_6$	491.55
2	Ac-e-r-f-NH_2	$C_{22}H_{33}N_7O_6$	491.55
3	Ac-E-BIP-R-NH_2	$C_{28}H_{37}N_7O_6$	567.64
4	Ac-e-f-r-y-NH_2	$C_{31}H_{42}N_8O_8$	654.72
5	2-Naph-E-F-R-NH_2	$C_{31}H_{37}N_7O_6$	603.68

6	Ac-y-e-f-r- NH_2	$C_{31}H_{42}N_8O_8$	654.72
7	2-Nap-e-f-r-y-NH_2	$C_{40}H_{46}N_8O_8$	766.85
8	Piv-e-f-r-y-NH_2	$C_{34}H_{48}N_8O_8$	696.80
9	Fmoc-e-f-r-y-NH_2	$C_{44}H_{50}NgO_9$	834.93
10	2-Nap-e-r-f-NH_2	$C_{31}H_{37}N_7O_6$	603.68
11	2-Nap-y-e-f-r-NH_2	$C_{40}H_{46}N_8O_8$	766.85
12	Piv-E-F-R-NH_2	$C_{25}H_{39}N_7O_6$	533.63
13	NA-E-F-R-NH_2	$C_{26}H_{34}N_8O_6$	554.61
14	Ac-y-e-r-f-NH_2	$C_{31}H_{42}N_8O_8$	654.72
15	Ac-r-f-e-NH_2	$C_{22}H_{33}N_7O_6$	491.55
16	Fmoc-E-F-R-OH	$C_{35}H_{40}N_6O_8$	672.74
17	NA-y-e-r-f-NH_2	$C_{35}H_{43}N_9O_8$	717.78
18	NA-E-BIP-R-NH_2	$C_{32}H_{38}N_8O_6$	630.70
19	NA-e-r-f-y-NH_2	$C_{35}H_{43}N_9O_8$	717.78
20	2-Nap-E-BIP-R-NH_2	$C_{37}H_{41}N_7O_6$	679.77
21	NA-e-f-r-NH_2	$C_{26}H_{34}N_8O_6$	554.61
22	3,5-diterciario-butil-4-hidroxi-PhCO-E-BIP-R-NH_2	$C_{41}H_{55}N_7O_7$	757.93
23	1-Nap-L-Alanina	$C_{13}H_{13}NO_2$	215.25
24	1 -Nap-D-Alanina	$C_{13}H_{13}NO_2$	215.25
25	2-Nap-L-Alanina	$C_{13}H_{13}NO_2$	215.25
26	2-Nap-D-Alanina	$C_{13}H_{13}NO_2$	215.25
27	L-Bifenilalanina	$C_{15}H_{15}NO_2$	241.3
28	D-Bifenilalanina	$C_{15}H_{15}NO_2$	241.3
29	NA-f-r-e-NH_2	$C_{26}H_{34}N_8O_6$	554.61
30	1-Nap-e-r-f-y-NH_2	$C_{40}H_{46}N_8O_8$	766.84
31	1-Nap-E-BIP-R-NH_2	$C_{37}H_{41}N_7O_6$	679.77
32	NA-y-f-r-e-NH_2	$C_{35}H_{43}N_9O_8$	717.78
33	Ac-y-f-r-e-NH_2	$C_{31}H_{42}N_8O_8$	654.72
34	NA-e-r-f-NH_2	$C_{26}H_{34}N_8O_6$	554.61
35	2-Nap-e-f-r-y-OH	$C_{40}H_{45}N_70_9$	767.84
36	3,5-diterciario-butil-4-hidroxi-PhCO-f-r-e-y-NH_2	$C_{44}H_{60}N_8O_9$	845.01
37	NA-f-r-e-y-NH_2	$C_{35}H_{43}N_{98}O_8$	717.78
38	NA-f-r-NH_2	$C_{21}H_{27}N_7O_3$	425.49
39	Ac-e-BIP-r-NKb	$C_{28}H_{37}N_7O_6$	567.64
40	Ac-e-bip-r-NH_2	$C_{28}H_{37}N_7O_6$	567.64
41	Isoxazole-e-bip-r-NH_2	$C_{31}H_{38}N_8O_7$	634.69
42	1-Nap-r-f-e-y-NH_2	$C_{40}H_{46}N_8O_8$	766.84
43	1-Nap-f-r-e-Y-NH_2	$C_{40}H_{46}N_8O_8$	766.84
44	Ac-E-BIP-R-OH	$C_{32}H_{38}N_8O_6$	568.63
45	3,5-diterciario-butil-4-hidroxi-PhCO-e-r-f-NH_2	$C_{35}H_{51}N_7O_7$	681.82
46	Ac-f-r-e-y-NH_2	$C_{31}H_{42}N_8O_8$	654.72
47	Ac-r-f-e-y-NH_2	$C_{31}H_{42}N_8O_8$	654.72
48	3,5-diterciario-butil-4-hidroxi-PhCO-f-e-r-NH_2	$C_{35}H_{51}N_7O_7$	681.82

245

49	Isoxazol-r-e-f-y-NH_2	$C_{34}H_{43}N_9O_9$	721.77
50	Ac-r-e-f-y-NH_2	$C_{31}H_{42}N_8O_8$	654.72
51	NA-r-e-f-y-NH_2	$C_{35}H_{43}N_9O_8$	717.78
52	3,5-diterciario-butil-4-hidroxi-PhCO-r-e-f-y-NH_2	$C_{44}H_{60}N_8O_9$	845.01
53	Isaxazol-f-e-r-NH_2	$C_{35}H_{51}N_7O_7$	558.59
54	Isoxazol-y-r-e-f-NH_2	$C_{34}H_{43}N_9O_9$	721.77
55	NA-y-r-e-f-NH_2	$C_{35}H_{43}N_9O_8$	717.78
56	3,5-diterciario-butil-4-hidroxi-PhCO-f-r-e-y-NH_2	$C_{44}H_{60}N_8O_9$	845.01
57	3,5-diterciario-butil-4-hidroxi-PhCO-f-r-NH_2	$C_{30}H_{44}N_6O_4$	552.72
58	Isoxazol-f-e-r-y-NH_2	$C_{34}H_{43}N_9O_9$	721.77
59	3,5-diterciario-butil-4-hidroxi-PhCO-r-f-e-y-NH_2	$C_{44}H_{60}N_8O_9$	845.01
60	Ac-f-e-r-y-NH_2	$C_{31}H_{42}N_8O_8$	654.72
61	3,5-diterciario-butil-4-hidroxi-PhCO-f-r-NH_2	$C_{30}H_{44}N_6O_4$	552.72
62	NA-y-f-e-r-NH_2	$C_{35}H_{43}N_9O_8$	717.78
63	Isaxazol-y-f-e-r-NH_2	$C_{34}H_{43}N_9O_9$	721.77
64	NA-f-e-r-NH_2	$C_{26}H_{34}N_8O_6$	554.61
65	3,5-diterciario-butil-4-hidroxi-PhCO-y-f-e-r-NH_2	$C_{44}H_{60}N_8O_9$	845.01
66	Isoxazol-r-f-e-NH_2	$C_{35}H_{51}N_7O_7$	558.59
67	1-Nap-y-f-e-r-NH_2	$C_{40}H_{46}N_8O_8$	766.84.
68	1-Nap-r-f-e-NH_2	$C_{31}H_{37}N_7O_6$	603.68
69	. NA-r-f-e-NH_2	$C_{26}H_{34}N_8O_6$	554.61
70	Ac-E-F(4-I)-R-NH_2	$C_{22}H_{32}IN_7O_6$	617.44
71	NA-R-BIP-E-NH_2	$C_{32}H_{38}N_8O_6$	630.70
72	1-Nap-R-BIP-E-NH_2	$C_{37}H_{41}N_7O_6$	679.77
73	Ac-R-BIP-E-NH_2	$C_{28}H_{37}N_7O_6$	567.64
74	Ac-E-BIP-K-NH_2	$C_{28}H_{37}N_5O_6$	539.63
75	Ac-D-BIP-K-NH_2	$C_{27}H_{35}N_5O_6$	525.60
76	. Ac-d-BIP-r-NH_2	$C_{27}H_{37}N_5O_6$	553.62
77	Ac-e-bip-k-NH_2	$C_{28}H_{37}N_5O_6$	539.63
78	Ac-d-bip-k-NH_2	$C_{27}H_{35}N_5O_6$	525.60
79	Ac-d-bip-r-NH_2	$C_{27}H_{37}N_5O_6$	553.62
80	Ac-E-R-BIP-NH_2	$C_{28}H_{37}N_7O_6$	567.64
81	2-Pirazin-CO-E-R-BIP-NH_2	$C_{31}H_{37}N_9O_6$	631.60
82	Piperonil-CO-E-R-BIP-NH_2	$C_{34}H_{39}N_7O_8$	673.72
83	Ac-E-bip-R-NH_2	$C_{28}H_{37}N_7O_6$	567.64
84	Ac-e-f(4-I)-r-NH_2	$C_{22}H_{32}IN_7O_6$	617.44
85	Glutárico-BIP-R-NH_2	$C_{26}H_{34}N_6O_5$	510.59

86	Glutárico-bip-r-NH_2	$C_{26}H_{34}N_6O_5$	510.59
87	Ac-E-BIP-Agmatina	$C_{27}H_{36}N_6O_5$	524.62
88	Ac-e-bip-Agmatina	$C_{27}H_{36}N_6O_5$	524.62
89	Ac-R-BIP-GABA	$C_{27}H_{36}N_6O_5$	524.62
90	Ac-r-bip-GABA	$C_{27}H_{36}N_6O_5$	524.62
91	Agmatina-BIP-E-NH_2	$C_{25}H_{32}N_6O_5$	496.56
92	Agmatina-bip-e-NH_2	$C_{25}H_{32}N_6O_5$	496.56
93	Ac-e-bip(4-tBu)-r-NH_2	$C_{32}H_{45}N_7O_6$	673.75
94	Ac-E-BIP(4-tBu)-R-NH_2	$C_{32}H_{45}N_7O_6$	673.75
95	Glutárico-BIP-K-NH_2	$C_{26}H_{34}N_4O_5$	482.58
96	Glutárico-bip-k-NH_2	$C_{26}H_{34}N_4O_5$	482.58

[0176] Las abreviaturas para los D-enantiómeros de los aminoácidos genéticamente codificados son equivalentes en minúscula de los símbolos de una letra mostrados en Tabla 1. Por ejemplo, "R" designa L-arginina y "r" designa D-arginina.

[0177] **Ac** denota acetilado.

[0178] **Piv** denota pivolilado.

[0179] **1-Nap & 2-Nap** indica ácido naftílico taponado.

[0180] **Fmoc** denota un N-término modificado con 9-fluorenilmetiloxicarbonilo.

[0181] **NA** denota ácido nicotínico.

[0182] **BIP** denota bifenilalanina.

[0183] **Isoxazol** denota un derivado de ácido 5-metil-isoxazol-3-carboxílico.

[0184] Si el péptido está compuesto enteramente de aminoácidos genéticamente codificados, o una porción de él está compuesta así, el péptido o la porción relevante puede sintetizarse igualmente usando técnicas convencionales de ingeniería genética recombinante.

[0185] Para producción recombinante, una secuencia polinucleótida, que codifica el péptido, se inserte en un vehículo de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y tranducción de la secuencia codificadora insertada o, en el caso de un vector viral de RNA, los elementos

necesarios para replicación y traducción. El vehículo de expresión se transfecta luego en una célula diana apropiada, la cual expresará el péptido. Dependiendo del sistema de expresión usado, el péptido expresado se aísla entonces por procedimientos bien establecidos en el arte. Métodos para producción recombinante de proteína y péptido son bien conocidos en el arte (véase, por ejemplo, Sambrook *y colaboradores*, 1989, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.; y Ausubel *y colaboradores*, 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., cada uno de los cuales se incorpora aquí por referencia en su integridad.)

[0186] Para aumentar la eficiencia de producción, el polinucleótido puede diseñarse para codificar múltiples unidades del péptido separado pos sitios de segmentación enzimática — homopolímeros (unidades péptidas repetitivas) o heteropolímeros (diferentes péptidos concatenados entre sí) pueden diseñarse en esta forma. El polipéptido resultante puede escindirse (p. ej., mediante tratamiento con la enzima apropiada), con el fin de recuperar la unidades péptidas. Esto puede incrementar el rendimiento de péptidos inducido por un solo promotor. En una incorporación preferida, puede diseñarse un polinucleótido policistrónico de modo que se transcriba un solo mRNA, el cual codifique múltiples péptidos (es decir, homopolímeros o heteropolímeros), enlazándose operativamente cada región codificadora a una secuencia de control de traducción independiente de caperuza; p. ej., un sitio de entrada interna del (IRES). Cuando se usan en sistemas de expresión viral apropiada, la traducción de cada péptido codificado por el mRNA se dirige internamente en el transcripto; p. ej., por el IRES. En consecuencia, la creación policistrónica dirige la transcripción de un único mRNA policistrónico grande que, a su vez, dirige la traducción de múltiples péptidos individuales. Este enfoque elimina la producción y el procesamiento enzimático de poliproteínas y puede incrementar significativamente el rendimiento de péptido inducido por un solo

promotor.

[0187] Una variedad de sistemas vectores de expresión de huésped puede utilizarse para expresar los péptidos descritos aquí. Éstos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de DNA de bacteriófago recombinante o DNA de plásmido, que contienen una secuencia codificadora apropiada; levadura u hongos filamentosos transformados con vectores de expresión de levadura u hongos recombinantes, que contienen una secuencia codificadora; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (p. ej., baculovirus) que contienen una secuencia codificadora apropiada; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (p. ej., virus mosaico del coliflor o virus mosaico del tabaco) o transformadas con vectores de expresión de plásmido recombinantes (p. ej., plásmido Ti) que contienen una secuencia codificadora apropiada; o sistemas de células animales.

[0188] Los elementos de expresión de los sistemas de expresión varían en su resistencia y especificidades. Dependiendo del sistema huésped/vector utilizado, cualquier número de elementos apropiados de transcripción y traducción, incluidos promotores constitutivos e inducibles, pueden usarse en el vector de expresión. Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos, pueden utilizarse los promotores inducibles tales como pL de bacteriófago λ, plac, ptrp, ptac (promotor híbrido de ptrp-lac) y similares; cuando se clona en sistemas de células de insecto, pueden usarse promotores tales como el promotor polihedro de baculovirus; cuando se clona en sistemas de células vegetales, pueden emplearse promotores derivados del genoma de células vegetales (p. ej., promotores de choque térmico; el promotor de la pequeña subunidad de RUBISCO; el promotor de la proteína de fijación a/b de clorofila) o de virus vegetales (p. ej., el promotor RNA 35S de CaMV; el promotor de la proteína de cubierta de TMV); cuando se clona en sistemas de células mamíferas, pueden empelarse promotores derivados del genoma de células

mamíferas (p. ej., promotor de metalotioneína) o de virus mamíferos (p. ej.,el promotor tardío de adenovirus, el promotor del virus 7.5 K del poxvirus vacuno); cuando se generan líneas celulares que contienen múltiples copias de producto de expresión, pueden usarse vectores a base de SV40, BPV y EBV con un marcador seleccionable apropiado.

[0189] En casos donde se emplean vectores de expresión vegetal, la expresión de secuencias que codifican los péptidos de la invención pueden inducirse por cualquiera de un número de promotores. Por ejemplo, pueden usarse los promotores virales tales como los promotores 35S RNA y 19S RNA de CaMV (Brisson *y colaboradores*, 1984, *Nature* **310**:511-514), o el promotor de proteína de cubierta de TMV (Takamatsu *y colaboradores*, 1987, *EMBO J.* **6**:307-311); alternativamente, pueden utilizarse promotores vegetales tales como la pequeña subunidad de RUBISCO (Coruzzi *y colaboradores*, 1984, *EMBO J.* **3**:1671-1680; Broglie *y colaboradores*, 1984, *Science* **224**:838-843) o promotores de choque térmico, p. ej., hsp17.5-E ó -hsp17.3-B de soya (Gurley *y colaboradores*, 1986, *Mol. Cell. Biol.* **6**:559-565). Estas creaciones pueden introducirse en células vegetales usando plásmidos Ti, plásmidos Ri, vectores de virus vegetales, transformación de DNA directa, microinyección, electroporación, etc. Para reseñas de tales técnicas véase, por ejemplo, Weissbach & Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Section VIII, páginas 421-463; y Grierson & Corey, 1988, *Plant Molecular Biology*, 2d Ed., Blackie, London, Ch. 7-9.

[0190] En un sistema de expresión de insecto que puede usarse para producir los péptidos de la invención, se usa el virus de polihidrosis *autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar los genes foráneos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. Una secuencia codificadora puede clonarse en regiones no esenciales (por ejemplo el gen poliedro) del virus y se ponerse bajo control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor poliedro). La exitosa inserción de una secuencia codificadora resultará en inactivación del gen

poliedro y producción de virus recombinante no ocluido (es decir, virus carente de cubierta proteinácea codificada para el gen poliedron). Estos virus recombinantes se usan entonces para infectar células de *Spodoptera frugiperda* en las cuales se expresa el gen insertado (p. ej., véase Smith *y colaboradores*, 1983, *J. Virol.* 46:584; Smith, Patente de los Estados Unidos No. 4,215,051). Otros ejemplos de este sistema de expresión pueden encontrarse en *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, Ausubel *y colaboradores*, eds., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience.

[0191] En células huésped mamíferas, puede utilizarse un número de sistemas de expresión a base de virus. En casos donde se emplea un adenovirus como factor de expresión, una secuencia codificadora puede ligarse a un complejo de control transcripción/traducción de adenovirus, p. ej., el promotor tardío y la secuencia guía tripartita. Este gen quimérico puede insertarse entonces en el genoma del adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción de una región no esencial del genoma vírico (p. ej., región E1 ó E3) resultará en un virus recombinante que es viable y capaz de expresar péptido en huéspedes infectados, (p. ej., véase Logan & Shenk, 1984, *PNAS* USA 81:3655-3659). Alternativamente, puede usarse el promotor 7.5 K del poxvirus vacuno, (véase, por ejemplo, Mackett *y colaboradores*, 1982, *PNAS* USA 79:7415-7419; Mackett *y colaboradores*, 1984, J. Virol. 49:857-864; Panicali *y colaboradores*, 1982, *PNAS* USA 79:4927-4931).

[0192] Otros sistemas de expresión para producir los péptidos de la invención serán evidentes a las personas expertas en el arte.

Purificación de Péptidos

[0193] Los péptidos de la invención pueden purificarse por técnicas conocidas en el arte tales como cromatografía líquida de alto rendimiento de fase reversa (p. ej., los péptidos crudos sintetizados por métodos de síntesis de fase sólida con química N^{α}-Fmoc, descritos más arriba, se purificaron por HPLC de fase reversa usando columna C-18

preparativa), cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad y similares. Las condiciones efectivas usadas para purificar un péptido particular dependerán, en parte, de la estrategia de síntesis y de factores tales como carga neta, hidrofobicidad, hidrofilicidad, etc., y serán evidentes a las personas expertas en el arte. Pueden purificarse péptidos ramificados multiméricos, p. ej., mediante cromatografía de intercambio iónico o exclusión de tamaño.

[0194] Para purificación por cromatografía de afinidad, puede empelarse cualquier anticuerpo que fije específicamente el péptido. Para la producción de anticuerpos, varios animales huésped, incluidos pero no limitados a conejos, ratones, ratas, etc., pueden inmunizarse por inyección con un péptido. El péptido puede unirse a un portador apropiado, tal como BSA, por medio de un grupo funcional de cadena lateral o enlazantes unidos a un grupo funcional de cadena lateral. Varios coadyuvantes pueden usarse para aumentar la respuesta inmunitaria, dependiendo de la especie huésped, incluidos pero no limitados a coadyuvantes de Freund (completos e incompletos), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa, dinitrofenol, y coadyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilos Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

[0195] Anticuerpos monoclonales a un péptido pueden prepararse usando cualquier técnica que permita la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo. Dichas técnicas incluyen, pero no se limitan a, la técnica de hibridoma, descrita originalmente por Kohler y Milstein, 1975, *Nature* **256**:495-497, o Kaprowski, Patente de los Estados Unidos No. 4,376,110, la cual se incorpora aquí por referencia; la técnica de bibridoma de células B humanas) Kosbor *y colaboradores*, 1983, *Immunology Today* 4:72; Cote *y colaboradores*, 1983, *PNAS* USA **80**:2026-2030); y la técnica EBV-hibridoma (Cole *y colaboradores*, 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., páginas 77-96). Adicionalmente,

pueden emplearse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" Morrison *y colaboradores*, 1984, *PNAS* USA **81**:6851-6855; Neuberger *y colaboradores*, 1984, *Nature* **312**:604-608; Takeda *y colaboradores*, 1985, *Nature* **314**:452-454, Boss, Patente de los Estados Unidos No. 4,816,397; Cabilly, Patente de los Estados Unidos No. 4,816,567; que se incorporan aquí por referencia) cortando y empalmando los genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. O pueden prepararse anticuerpos "humanizados" (véase, por ejemplo, Queen, Patente de los Estados Unidos No. 5,585,089 que se incorpora aquí por referencia). Alternativamente, técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena única (Patente de los Estados Unidos No. 4,946,778) pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena única específica de péptido.

[0196] Fragmentos de anticuerpo que contienen eliminaciones de sitios de fijación específica pueden generarse por técnicas conocidas. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos $F(ab')_2$, que pueden producirse por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y fragmentos Fab, que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos $F(ab')_2$. Alternativamente, pueden crearse bibliotecas de expresión Fab (Huse *y colaboradores*, 1989, *Science* **246**:1275-1281) para permitir una rápida y fácil identificación de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para el péptido de interés.

[0197] El anticuerpo o fragmento de anticuerpo para el péptido deseado puede unirse, por ejemplo, a agarosa, y el complejo anticuerpo-agarosa se usa en inmunocromatografía para purificar péptidos de la invención. Véase, Scopes, 1984, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag New York, Inc., NY, Livingstone, 1974, *Methods In Enzymology: Immunoaffinity Chromatography of Proteins* **34**:723-731.

Formulaciones Farmacéuticas y Métodos de Tratamiento

[0198] Los mediadores de RCT de la invención pueden usarse para tratar cualquier trastorno en animales, especialmente mamíferos, incluidos humanos, para los cuales es beneficioso reducir los niveles de colesterol, incluidas, sin limitación, afecciones en las cuales es benéfico aumentar la concentración de HDL en el suero, activar LCAT, y promover la descarga de colesterol y RCT. Tales afecciones incluyen, pero no se limitan a, hiperlipidemia y, especialmente, hipercolesterolemia, y enfermedad cardiovascular tal como arterioesclerosis (incluido el tratamiento y la prevención de arterioesclerosis) y arteriopatía coronaria; restenosis (p. ej., prevenir o tratar placas arterioescleróticas, que se desarrollan como consecuencia de procedimientos médicos tales como angioplastia con globo); y otros trastornos, tales como isquemia, y endotoxemia, que a menudo resultan en choque septicémico.

[0199] Los mediadores de RCT pueden usarse solos o terapia de combinación con otros medicamentos usados para tratar las afecciones anteriores. Tales terapias incluyen, pero no se limitan a, administración simultánea o secuencial de los medicamentos involucrados.

[0200] Por ejemplo, en el tratamiento de hipercolesterolemia o arterioesclerosis, las formulaciones de mediadores moleculares de RCT pueden administrarse con una cualquiera o más de las terapias reductoras de colesterol actualmente en uso; p. ej., resinas de ácido biliar, niacina, y/o estatinas. Tal régimen de tratamiento combinado pueden producir efectos terapéuticos particularmente benéficos puesto que cada medicamento actúa en una diana diferente en la síntesis y transporte de colesterol; es decir, las resinas de ácido biliar afectan el reciclaje del colesterol, el quilomicrón y la población LDL; la niacina afecta principalmente la población VLDL y LDL; las estatinas inhiben la síntesis del colesterol, disminuyendo la población LDL (y quizás aumentando la expresión de receptor de LDL); mientras que los mediadores de RCT afectan a RCT, incrementan HDL, aumenta la actividad de LCAT y promueven la descarga de colesterol.

PT 254

[0201] Los mediadores de RCT pueden usarse en conjunción con fibrados para tratar hiperlipidemia, hipercolesterolemia y/o enfermedad cardiovascular tal como arterioesclerosis.

[0202] Los mediadores de RCT de la invención pueden usarse en combinación con los anti-microbianos y agentes anti-inflamatorios usados actualmente para tratar choque septicémico inducido por endotoxina.

[0203] Los mediadores de RCT de la invención pueden formularse como composiciones a base de péptido o como complejos péptido-lípido, los cuales pueden administrarse a sujetos en una variedad de modos, preferiblemente por administración oral, para entregar los mediadores de RCT a la circulación. Formulaciones ejemplares y regímenes de tratamiento se describen a continuación.

[0204] En otra incorporación preferida de la presente invención, se ofrecen métodos para aliviar y/o prevenir uno o más síntomas de hipercolesterolemia y/o arterioesclerosis. Los métodos implican preferiblemente administrar a un organismo, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un humano, uno o más de los péptidos de esta invención (o miméticos de tales péptidos). El péptido(s) puede administrarse, como se describe, de acuerdo con cualquiera de un número de métodos estándar incluidos, mas no limitados a, inyección, supositorio, aerosol nasal, implante de liberación en el tiempo, parche transcutáneo, y similares. En una incorporación particularmente preferida, el péptido(s) se administra oralmente (p. ej., como un jarabe, cápsula, o tableta).

[0205] Los métodos incluyen la administración de un solo polipéptido de esta invención o la administración de dos o más polipéptidos diferentes. Los polipéptidos pueden suministrarse como monómeros o en formas diméricas, oligoméricas o poliméricas. En ciertas incorporaciones, las formas multiméricas pueden comprender monómeros asociados (p. ej., enlazados iónica o hidrófobamente), mientras que algunas otras formas multiméricas comprenden monómeros enlazados covalentemente (enlazados directamente o a través de un enlazante).

[0206] Aunque la invención se describe con respecto al empleo en humanos, es también apropiada para uso animal, p. ej., veterinario. Por lo tanto, organismos preferidos incluyen, pero no se limitan a, humanos, primates no humanos, caninos, equinos, felinos, porcinos, ungulados, lagomorfos, y similares.

[0207] Los métodos de esta invención no se limitan a humanos o animales no humanos que muestran uno o más síntoma(s) de hipercolesterolemia y/o arterioesclerosis (p. ej., hipertensión, formación y ruptura de placas, reducción en sucesos clínicos tales como infarto de miocardio, angina, o apoplejía, niveles elevados de lipoproteína de baja densidad, niveles elevados de lipoproteína de muy baja densidad, o proteínas inflamatorias, etc.), sino son también útiles en un contexto profiláctico. En consecuencia, los péptidos de esta invención (o miméticos de los mismos) pueden administrarse a organismos para prevenir la manifestación/evolución de uno o más síntomas de hipercolesterolemia y/o arterioesclerosis. Sujetos particularmente preferidos en este contexto son sujetos que muestran uno o más factores de riesgo de arterioesclerosis (p. ej., historia familiar, hipertensión, obesidad, alto consumo de alcohol, tabaquismo, colesterol sanguíneo elevado, triglicéridos sanguíneos elevados, LDL, VLDL, IDL sanguíneas elevadas, o HDL baja, diabetes, o una historia familiar de diabetes, lípidos sanguíneos altos, infarto de miocardio, angina o apoplejía, etc.).

[0208] En una incorporación preferida, los mediadores de péptido de RCT pueden sintetizarse o manufacturarse usando cualquier técnica descrita en secciones anteriores relativas a la síntesis y purificación de los mediadores de RCT. Preparaciones estables que tienen una larga vida útil pueden elaborarse liofilizando los péptidos — ya sea para preparar una masa para reformulación, o ya sea para preparar alícuotas individuales o unidades farmacéuticas que puedan reconstituirse por rehidratación con agua estéril o una solución tamponada estéril apropiada.

[0209] En otra incorporación preferida, los mediadores de RCT pueden formularse y administrarse en un complejo péptido-lípido. Este

enfoque tiene algunas ventajas, puesto que el complejo debe tener una vida media incrementada en la circulación, particularmente cuando el complejo tiene un tamaño similar y densidad a HDL y, especialmente, las poblaciones pre-β-1 ó pre-β-2 HDL. Los complejos péptido-lípido pueden prepararse convenientemente por cualquiera de un número de métodos descritos más adelante. Preparaciones estables con una vida útil prolongada pueden elaborarse por liofilización — siendo el enfoque preferido el procedimiento de co-liofilización descrito a continuación. Los complejos péptido-lípido liofilizados pueden usarse para preparar una masa para reformulación farmacéutica, o para preparar alícuotas individuales o unidades farmacéuticas que pueden reconstituirse por rehidratación con agua estéril o una solución tamponada apropiada antes de la administración a un sujeto.

[0210] Una variedad de métodos bien conocidos por las personas expertas en el arte pueden usarse para preparar las vesículas o complejos péptido-lípido. Para este fin pueden empelarse un número de técnicas disponibles para preparar liposomas o proteoliposomas. Por ejemplo, el péptido puede co-sonicarse (usando un sonicador de baño o de sonda) con lípidos apropiados para formar complejos. Alternativamente el péptido puede combinarse con vesículas de lípido preformadas resultantes en la formación espontánea de complejos péptido-lípido. En todavía otra alternativa, los complejos péptido-lípido pueden formarse por un método de diálisis detergente; p. ej., una mezcla del péptido, lípido y detergente se dializa para remover el detergente y reconstituir o formas complejos péptido-lípido (p. ej., véase Jonas *y colaboradores*, 1986, *Methods in Enzymol.* **128**:553-582).

[0211] Aunque los anteriores enfoques son factibles, cada método presenta sus propios problemas peculiares de producción en términos de costo, rendimiento, reproducibilidad y seguridad. De acuerdo con método preferido, el péptido y lípido se combinan en un disolvente, sistema que co-solubiliza cada ingrediente y puede retirarse por liofilización. A este propósito, parejas de disolventes deben seleccionarse

cuidadosamente para garantizar la co-solubilidad del péptido antipático y el lípido. En una incorporación, la proteína(s), péptido(s) o derivados/análogos de los mismos, a incorporarse en las partículas pueden disolverse en un disolvente acuoso u orgánico o mezcla de disolventes (disolvente 1). El componente (fosfo)lípido se disuelve en un disolvente acuoso u orgánico o mezcla de disolventes (disolvente 2), que es miscible con el disolvente 1, y las dos soluciones se mezclan. Alternativamente, el péptido y el lípido pueden incorporarse en un sistema co-disolvente; es decir, una mezcla de los disolventes miscibles. En primer lugar se determina empíricamente una proporción apropiada de péptido (proteína) a lípidos, de modo que los complejos resultantes poseen las propiedades físicas y químicas apropiadas; es decir, usual (pero no necesariamente) similar en tamaño a HDL. La mezcla resultante se congela y liofiliza a sequedad. Algunas veces tiene que agregarse un disolvente adicional a la mezcla para facilitar la liofilización. Este producto liofilizado puede almacenarse durante períodos prolongados y permanecerán estables.

[0212] El producto liofilizado puede reconstituirse con el fin de obtener una solución o suspensión del complejo péptido-lípido. A este fin, el polvo liofilizado puede rehidratarse con una solución acuosa a un volumen apropiado (a menudo 5 mgs péptido/ml que es conveniente para inyección intravenosa). En una incorporación preferida el polvo liofilizado se rehidrata con solución salina tamponada con fosfato o una solución salina fisiológica. La mezcla puede haberse agitado o centrifugado para facilitar la rehidratación y, en la mayoría de los casos, el paso de reconstitución debe llevarse a cabo a una temperatura igual a o mayor que la temperatura de transición de fase del componente lípido de los complejos. Dentro de unos minutos, resulta una preparación clara de complejos lípido-proteína reconstituidos.

[0213] Una alícuota de la preparación reconstituida resultante puede caracterizarse para confirmar que los complejos en la preparación tengan la distribución de tamaño deseada; p. ej., la distribución de tamaño de HDL. Para este fin puede usarse cromatografía de filtración en gel.

Por ejemplo, puede emplearse un sistema de cromatografía de filtración en gel Pharmacia Superose 6 FPLC. El tampón usado contiene 150 mM NaCl en 50 mM de tampón de fosfato, pH 7.4. Un volumen típico de muestra es 20 a 200 microlteros de complejos que contienen 5 mgs péptido/ml. El caudal de la columna es 0.5 mls/min. Como estándares para calibrar la columna se usa preferiblemente una serie de proteínas de peso molecular conocido y diámetro de Stokes, así como HDL humana. Las proteínas y complejos de lipoproteína se monitorean por absorbencia o dispersión de la luz de longitud de onda 254 ó 280 nm.

[0214] Los mediadores de RCT de la invención pueden acomplejarse con una variedad de lípidos, incluidos lípidos y/o fosfolípidos saturados, insaturados, naturales y sintéticos. Lípidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, fosfolípiodos de cadena alquílica pequeña, fosfatidilcolina de huevo, fosfatidilcolina de soya, dipalmitoilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina, distearoilfosfatidilcolina, 1-miristoil-2-palmitoilfosfatidilcolina, 1-palmitoil-2-miristoilfosfatidilcolina, 1-palmitoil-2-stearoilfosfatidilcolina, 1-stearoil-2-palmitoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina dioleofosfatidiletanolamina, dilauroilfosfatidilglicerol fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilethanolamina, fosfatidilinositol, esfingomielina, esfingolípidos, fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol, dimiristoilfosfatidilglicerol, dipalmitoilfosfatidilglicerol, distearoilfosfatidilglicerol, dioleoilfosfatidilglicerol, ácido dimiristoilfosfatídico, ácido dipalmitoilfosfatídico, dimiristoilfosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidiletanolamina, dimiristoilfosfatidilserina, dipalmitoilfosfatidilserina, fosfatidilserina del cerebro, esfingomielina del cerebro, dipalmitoilesfingomielina, distearoilesfingomielina, ácido fosfatídico, galactocerebrósida, gangliósidos, cerebrósidos, dilaurilfosfatidilcolina, (1,3)-D-mannosil-(1,3)diglicérido, aminofenilglucósido, glicolípidos de 3-colesteril-6'-(glicosiltio)hexil éter, y colesterol y sus derivados.

259

[0215] La formulación farmacéutica de la invención contiene los mediadores de péptido de RCT, o el complejo péptido-lípido como el ingrediente activo en un excipiente farmacéuticamente aceptable, apropiado para administración y dispensación *in vivo*. Como los péptidos pueden contener términos ácidos y/o básicos y/o cadenas laterales, los péptidos pueden incluirse en las formulaciones en cualquiera de las dos formas de ácidos o base libres, o en la forma de sales farmacéuticamente aceptables.

[0216] Preparaciones inyectables incluyen suspensiones estériles, soluciones o emulsiones del ingrediente activo en vehículos acuosos u oleosos. Asimismo, las composiciones pueden contener agentes formulantes, tales como un agente de suspensión, estabilizante y/o dispersante. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma farmacéutica unitaria, p. ej., en ampollas o en envases multi-dosis, y pueden contener preservantes agregados.

[0217] Alternativamente, la formulación inyectable puede proveerse en forma de polvo para reconstitución con un vehículo apropiado, incluidos, mas no limitados a, agua estelizada libre de pirógenos, tampón, solución de dextrosa, etc., antes del empleo. Para este fin, los mediadores de RCT pueden liofilizarse, o puede prepararse un complejo páptido-lípido co-liofilizado. Las preparaciones almacenadas pueden proveerse en formas farmacéuticas unitarias y reconstituirse antes del uso *in vivo*.

[0218] Para entrega prolongada, el ingrediente activo puede formularse como una preparación de liberación lenta, para administración por implantación; p. ej., subcutánea, intradérmica, o inyección intramuscular. Así, por ejemplo, el ingrediente activo puede formularse con materiales poliméricos o hidrófobos apropiados (p. ej., como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles; p. ej., como forma de sal moderadamente soluble de los mediadores de RCT.

[0219] Alternativamente, puede utilizarse sistemas de entrega

transdérmica manufacturados como un disco adhesivo o parche, libera lentamente el ingrediente activo para absorción percutánea. A este fin, pueden usarse intensificadores de infiltración para facilitar la penetración transdérmica del ingrediente activo. Un beneficio particular puede lograrse incorporando los mediadores de RCT de la invención, o el complejo péptido-lípido en un parche de nitroglicerina para uso en pacientes con cardiopatía isquémica e hipercolesterolemia.

[0220] Para administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar al forma de, por ejemplo, tabletas o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (p. ej., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil metilcelulosa); rellenos (p. ej., lactosa, celulosa microcristalina o fosfato hidrogenado de calcio); lubricantes (p. ej., estearato de magnesio, talco o sílice); desintegrantes (p. ej., almidón de papa o glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (p. ej., laurel sulfato de sodio). Las tabletas pueden recubrirse por métodos bien conocidos en el arte. Preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para constitución con agua u otro vehículo apropiado antes del uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (p. ej., jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (p. ej., lecitina o acacia); vehículos no acuosos (p. ej., aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y preservantes (p. ej., metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones pueden contener sales tampón, agentes saborizantes, colorantes y edulcorantes, según lo apropiado. Las preparaciones para administración oral pueden formularse convenientemente para producir una liberación controlada del compuesto activo.

[0221] Para administración sublingual, las composiciones

pueden tomar la forma de tabletas o tabletas para chupar formuladas en una manera convencional. Para vías rectales y vaginales de administración, el ingrediente activo puede formularse como soluciones (para enemas de retención) supositorios o ungüentos.

[0222] Para administración por inhalación, el ingrediente activo puede entregarse convenientemente en la forma de una presentación de pulverizador de aerosol de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor apropiado, p. ej., diclorodifluorometano, trichlorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad farmacéutica puede determinarse proveyendo una válvula para dispensar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos, p. ej., de gelatina para uso en un inhalador o insuflador que contenga una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo apropiada, tal como lactosa o almidón.

[0223] Si se desea, las composiciones pueden presentarse en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas farmacéuticas unitarias que incluyan el ingrediente activo. El envase puede comprender por ejemplo una hoja de plástico o metal, tal como un envase alveolado/empaque blíster. El envase o dispositivo dispensador puede estar acompañado de instrucciones para administración.

[0224] Los mediadores de péptido de RCT y/o complejos péptido-lípido de la invención pueden administrarse por cualquier vía apropiada que garantice la biodisponibilidad en la circulación. Esto puede lograrse por vías parenterales de administración, incluidas inyecciones intravenosa (IV), intramuscular (IM), intradérmica, subcutánea (SC) e intraperitoneal (IP). No obstante, pueden utilizarse otras vías de administración. Por ejemplo, la absorción a través del tubo digestivo puede realizarse por vías orales de administración (incluidas, pero no limitadas a, ingestión, bucales y sublinguales) a condición de que se empleen formulaciones apropiadas (p. ej., cubiertas gastro-resistentes) para evitar o minimizar la degradación del ingrediente activo, p. ej., en los

ambientes rudos de la mucosa oral, estómago y/o intestino delgado. La administración oral tiene la ventaja de la comodidad de uso y, por lo tanto, cumplimiento terapéutico mejorado por parte del paciente. Alternativamente, puede utilizarse la administración a través del tejido mucoso, tal como las modalidades vaginales y rectales de administración para evitar o minimizar la degradación en el tubo digestivo. En todavía otra alternativa, las formulaciones de la invención pueden administrarse transcutáneamente (p. ej., transdérmicamente), o por inhalación. Se observará que la vía preferida puede variar con la afección, la edad y el cumplimiento terapéutico del destinatario.

[0225] La dosis efectiva de mediadores de péptido de RCT o complejo péptido-lípido usada variará con la vía de administración, y debe ajustarse para lograr concentraciones del plasma en circulación de 1.0 mg/l a 2 g/l. Datos obtenidos en sistemas de modelos animales descritos aquí muestran que los agonistas de ApoA-I de la invención se asocian con el componente HDL, y poseen una vida media, proyectada en humanos, de alrededor de cinco días. Por consiguiente, en una incorporación, los mediadores de RCT pueden administrarse por inyección con una dosis entre 0.5 mg/kg a 100 mg/kg una vez por semana. En otra incorporación, niveles de suero deseados pueden mantenerse mediante infusión continua o fusión intermitente que provean alrededor de 0.1 mg/kg/hora a 100mg/kg/hora.

[0226] Las toxicidad y la eficacia terapéutica de los distintos mediadores de RCT pueden determinarse usando procedimientos farmacéuticos estándar en cultivo celular o animales experimentales para determinar la LD_{50} (la dosis letal al 50% de la población) y la ED_{50} (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La relación de la dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD_{50}/ED_{50}. Se prefieren los agonistas de péptido ApoA-I que exhiben índices terapéuticos elevados.

Otros Usos

[0227] Los mediadores de agonistas de RCT de la invención

263

pueden usarse en análisis *in vitro* para medir HDL en el suero, p. ej., para propósitos diagnósticos. Debido a que los mediadores de RCT se asocian con el componente HDL y LDL del suero, los agonistas pueden usarse como "marcadores" para la población HDL y LDL. Más aún, los agonistas pueden utilizarse como marcadores de la sobrepoblación de HDL, que son efectivos en RCT. A este fin, el agonista puede agregarse a, o mezclarse con, una muestra de suero del paciente; luego de un tiempo de incubación apropiado, el componente HDL puede analizarse APRA detectar los mediadores incorporados de RCT. Esto puede lograrse usando un agonista marcado (p. ej., radiomarcadores, marcas fluorescentes, marcas enzimáticas, colorantes, etc.), o por inmunoanálisis usando anticuerpos (o fragmentos de anticuerpo) específicos para el agonista.

[0228] Alternativamente, un agonista marcado puede usarse en procedimientos radiográficos (p. ej., radiografías CAT, radiografías MRI) para visualizar el sistema circulatorio, o para monitorear RCT, o para visualizar la acumulación de HDL en estrías adiposas, lesiones arterioescleróticas, etc. (donde la HDL debe ser activa en la descarga de colesterol).

Estudios para Análisis de Mediadores de Transporte Reverso de Colesterol

Análisis de Activación de LCAT

[0229] Los mediadores de RCT de acuerdo con incorporaciones preferidas de la presente invención pueden evaluarse con respecto a su eficacia clínica potencial por varios análisis *in vitro*, por ejemplo, por su capacidad de activar LCAT *in vitro*. En el análisis de LCAT, vesículas de sustrato (vesículas pequeñas uni-laminares o "SUVs") compuestas de fosfatidilcolina de huevo (EPC) o 1-palmitoil-2-oleil-fosfatidil-colina (POPC) y colesterol radiomarcado se pre-incuban con masas equivalentes de péptido o ApoA-I (aislada de plasma humano). La reacción se inicia por la adición de LCAT (purificada de plasma humano). ApoA-I nativa, que se usó como control positivo, representa una actividad de activación del 100%. La "actividad específica" (es decir, unidades de actividad

(activación de LCAT)/unidad de masa) de los mediadores moleculares puede calcularse como la concentración de mediador que logra la máxima activación de LCAT. Por ejemplo, una serie de concentraciones del péptido (p. ej., una dilución limitante) puede analizarse para determinar la "actividad específica" del péptido — la concentración que alcanza la máxima activación de LCAT (es decir, la conversión porcentual de colesterol a éster de colesterol) en un punto de tiempo específico en el análisis (p. ej., 1 hora). Cuando se grafica la conversión porcentual de colesterol en, p. ej., 1 hora, contra la concentración de péptido usado, la "actividad específica" puede identificarse como la concentración de péptido que alcanza un nivel sobre la curva graficada.

Preparación de Vesículas de Sustrato

[0230] Las vesículas usadas en el análisis de LCAT son SUVs compuestas de fosfatidilcolina de huevo (EPC) o 1-palmitoil-2-oleil-fosfatidilcolina (POPC) y colesterol con una relación molar de 20:1. Para preparar una solución patrón concentrada de vesículas suficiente para 40 análisis, se disuelven 7.7 mg EPC (ó 7.6 mg POPC; 10 μmol), 78 μg (0.2 μmol) 4-^{14} C-colesterol, 116 μg colesterol (0.3 μmol) en 5 ml de xileno y se liofilizan. Seguidamente se agregan 4 ml de tampón de análisis al polvo seco y se sonica bajo una atmósfera de nitrógeno a 4°C. Condiciones de sonicación: sonicador Branson 250, punta 10 mm, 6x5 minutos; tampón de análisis: 10 mM Tris, 0.14 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4. La mezcla sonicada se centrifuga 6 veces durante 5 minutos cada vez a 14.000 rpm (16,000xg) para retirar partículas de titanio. La solución clara resultante se usa para el análisis enzimático.

Purificación de LCAT

[0231] Para la purificación de LCAT, se emplea tratamiento con sulfato de dextrina/Mg^{2}+- de plasma humano para obtener suero deficiente en lipoproteína (LPDS), el cual se cromatografía secuencialmente en cromatografía de afinidad con fenilsefarosa, Affigelblue, ConcanavalinA sefarosa y anti-ApoA-I.

Preparación de LPDS

[0232] Para preparar LPDS, 500 ml de plasma se agregan a 50 ml de solución de sulfato de dextrina (MW=500.000). Agitar 20 minutos. Centrifugar durante 30 minutos a 3000 rpm (16.000xg) a 4°C. Usar sobrenadante (LPDS) para posterior purificación (aprox. 500 ml).

Cromatografía de Fenilsefarosa

[0233] Los siguientes materiales y condiciones se usaron para la cromatografía de fenilsefarosa. Fase sólida: columna Pharmacia, grado de sustrato alto, de flujo rápido de fenilsefarosa: XK26/40, altura del lecho de gel: 33 cm, V = ca, caudales de 175 ml: 200 ml/hora de lavado (muestra): 200 ml/hora de elución (tampón): 80 ml/hora de tampón (agua destilada): 10 mM Tris, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 7.4, 0.01% de azida de sodio.

[0234] Equilibrar la columna en tampón Tris, agregar 29 g NaCl a 500 ml LPDS y aplicar a la columna. Lavar con varios volúmenes de tampón Tris hasta que la absorción a 280 nm de longitud de onda esté aproximadamente en la línea de referencia, iniciar luego la elución con agua destilada. Se agrupan las porciones que contienen proteína (tamaño del grupo: 180 ml) y se usan para cromatografía con Affigelblue.

Cromatografía con Affigelblue

[0235] El grupo de fenilsefarosa se dializa de un día para otro a 4°C contra 20 mM Tris-HCl, pH7.4, 0.01% de azida de sodio. Se reduce el volumen del grupo por ultrafiltración (Amicon YM30) a 50-60 ml y se carga en una columna Affigelblue. Fase sólida: columna 153-7301, Biorad, Affigelblue, XK26/20, altura del lecho de gel: aprox. 13 cm; volumen de columna: aprox. 70 ml. Caudales: carga: 15 ml/hora lavado: 50 ml/h. Equilibrar columna en tampón Tris. Aplicar grupo de fenilsefarosa a la columna. Iniciar en paralelo para recoger las fracciones. Lavar con tampón Tris. Las fracciones agrupadas (170 ml) se usaron para cromatografía ConA.

Cromatografía ConA

[0236] El grupo Affigelblue se redujo por Amicon (YM30) a 30-40 ml y se dializó contra tampón de partida ConA (1 mM Tris HCl pH7.4; 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $MnCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 0.01% de azida de sodio) de un día para otro a 4°C. Fase sólida: columna (Pharmacia) sefarosa ConA: XK26/20, altura del lecho de gel: 14 cm (75 ml). Caudales: carga 40 ml/h lavado (con tampón de partida): 90 ml/h elución: 50 ml/h, 0.2M Metil-α-D-mannósido en 1 mM Tris, pH 7.4. Se recogieron las fracciones de proteína de las eluciones de mannósido (110 ml), y el volumen se redujo por ultrafiltración (YM30) a 44 ml. El grupo ConA pool se dividió en alícuotas de 2 ml aliquots, las cuales se almacenaron a -20°C.

Cromatografía de Afinidad Anti-ApoA-I

[0237] La cromatografía de afinidad Anti-ApoA-I se llevó a cabo en material Affigel-Hz (Biorad), al cual las anti-ApoA-I abs se habían acoplado covalentemente. Columna: XK16/20, V = 16 ml. La columna se equilibró con PBS pH 7.4. Dos ml del grupo ConA se dializó durante 2 horas contra PBS antes de cargarlos en la columna. Caudales: carga: 15 ml/hora de lavado (PBS) 40 ml/hora. Las fracciones de proteína agrupadas (V=14 ml) se usan para análisis de LCAT. La columna se regenera con 0.1 M. Tampón de citrato (pH 4.5) para eluir la A-I fijada (100 ml), e inmediatamente después de este procedimiento se re-equilibró con PBS.

Farmacocinética de los mediadores de RCT

[0238] Los siguientes protocolos experimentales pueden usarse para demostrar que los mediadores de RCT son estables en la circulación y se asocian con el componente HDL del plasma.

Síntesis y/o Radiomarcación de Agonistas de Péptido

[0239] Se preparó LDL ^{125}I-marcada por el procedimiento de monocloruro de yodo a una actividad específica de 500-900 cpm/ng (Goldstein y Brown 1974 *J. Biol. Chem.* **249**:5153-5162). Se determinaron la fijación y la degradación de lipoproteínas de baja

densidad por fibroblastos humanos cultivados con actividades específicas finales de 500-900 cpm/ng, como se describe (Goldstein y Brown 1974 *J. Biol. Chem.* **249**:5153-5162). En todo caso, >99% de radioactividad fue precipitable por incubación de las lipoproteínas a 4°C con 10% (p/vol) de ácido tricloroacético (TCA). El residuo Tyr se unió al N-término de cada péptido para permitir se radioyodización. Los péptidos se radioyodaron con $Na^{125}I$ (ICN), usando perlas de yodo (Pierce Chemicals) y siguiendo el protocolo del fabricante, a una actividad específica de 800-1000 cpm/ng. Luego de la diálisis, la radioactividad precipitable (10% TCA) de los péptidos fue siempre >97%.

[0240] Alternativamente, péptidos radiomarcados pudieron sintetizarse acoplando Fmoc-Pro ^{14}C-marcado como el aminoácido N-terminal. L-[U-^{14} C]X, actividad específica 9.25 GBq/mmol, puede usarse para la síntesis de agonistas marcados que contienen X. La síntesis puede llevarse a cabo de acuerdo con Lapatsanis, *Synthesis*, 1983, 671-173. Brevemente, 250 μM (29.6 mg) de L-X no marcado se disuelve en 225 μl de una solución 9% Na_2CO_3 y se agrega a una solución (9% Na_2CO_3) de 9.25 MBq (250 μM) L-X ^{14}C-marcado. El líquido se enfría a 0°C, se mezcla con 600 μM (202 mg) 9-fluorenilmetil-N-succinimidilcarbonato (Fmoc-OSu) en 0.75 ml DMF y se agitaron a temperatura de la sala durante 4 horas. A continuación, la mezcla se extrae con éter dietílico (2x5ml) y cloroformo (1x5ml), la fase acuosa restante se acidifica con 30% HCl y se extrae con cloroformo (5x8 ml). La fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4, se extrae por filtración y el volumen se reduce bajo flujo de nitrógeno a 5 ml. La pureza se estimó por TLC ($CHCl_3$:MeOH:Hac, 9:1:0.1 v/v/v, HPTLC de fase estacionaria en gel de sílice 60, Merck, Alemania) con detección de UV, p. ej., pureza radioquímica: Analizador Lineal, Berthold, Alemania; los rendimientos de la reacción pueden ser aproximadamente 90% (determinado por LSC).

[0241] La solución de cloroformo que contiene ^{14}C-péptido X se usa directamente para síntesis de péptidos. Una resina de péptido, que contiene aminoácidos 2-22, puede sintetizarse automáticamente como se

describe más arriba y se usa para la síntesis. La secuencia del péptido se determina por degradación de Edman. El acoplamiento se lleva a cabo como se describe previamente, excepto que HATU (O-(7-azabenzotriazol-1-il)1-, 1,3,3-hexafluorofosfato de tetrametiluronio) se usa preferiblemente en lugar de TBTU. Un segundo acoplamiento con Fmoc-L-X no marcado se lleva a cabo manualmente.

Farmacocinética en Ratones

[0242] En cada experimento, 300 - 500 μg/kg (0.3 - 0.5 mg/kg) [o más tal como 2.5 mg/k] de péptido radiomarcado puede inyectarse intraperitonealmente en ratones que se alimentaron con comida normal para ratones o la dieta modificada de Thomas-Harcroft aterogénica (resultante en colesterol VLDL severamente elevada e IDL). Se toman muestras de sangre en múltiples intervalos de tiempo para evaluación de la radioactividad en el plasma.

Estabilidad en el Suero Humano

[0243] 100 μg de péptido marcado pueden mezclarse con 2 ml de plasma humano fresco (a 37°C) y deslipidarse inmediatamente (muestra de control) o después de 8 días de incubación a 37°C (muestra de ensayo). La deslipidación se lleva a cabo extrayendo los lípidos con un volumen igual de 2:1 (v/v) cloroformo:metanol. Las muestras se cargan en una columna C_{18} de fase reversa y se eluye con una gradiente lineal (25-58% durante 33 minutos) de acetonitrilo (que contiene 0.1% en peso de TFA). Los perfiles de elución son seguidos por absorbencia (220 pm) y radioactividad.

Formación de De Partículas Similares Pre-ß

[0244] HDL humana puede aislarse por ultracentrifugación de densidad con KBr con una densidad d - 1.21 g/ml para obtener una fracción superior seguida por cromatografía de filtración en gel Superose 6 para separar HDL de otras lipoproteínas. La HDL aislada se ajusta a una concentración final de 1.0 mg/ml con solución salina fisiológica en

contenido de proteína determinado por análisis de proteína de Bradford. Una alícuota de 300 µl se retira de la preparación de HDL aislada y se incuba con 100 µl de péptido marcado (0.2-1.0 fig/µl) durante dos horas a 37°C. Se analizan múltiples incubaciones separadas incluido un blanco que contenía 100 µl de solución salina fisiológica y cuatro diluciones de péptido marcado. Por ejemplo: (i) 0.20 µg/µl relación péptido:HDL = 1:15; (ii) 0.30 µg/µl relación péptido:HDL = 1:10; (iii) 0.60 relación péptido:HDL = 1:5; y (iv) 1.00 µg/µl relación péptido:HDL = 1:3. Luego de una incubación de dos horas, se carga una alícuota de 200 µl de la muestra (volumen total = 400 µl) en una columna de filtración en gel Superose 6 para separación de lipoproteína y análisis, y 100 µl se utilizan para determinar la radioactividad total cargada.

Asociación de Mediadores con Lipoproteínas Humanas

[0245] La asociación de mediadores de péptido con fracciones de lipoproteína humana puede determinarse incubando péptido marcado con cada clase de lipoproteína (HDL, LDL y VLDL) y una mezcla de las distintas clases de lipoproteína. HDL, LDL y VLDL se aíslan por ultracentrifugación de gradiente de densidad con KBr a d = 1.21 g/ml y se purifican por FPLC en una columna de exclusión por tamaño Superose 6B (la cromatografía se lleva a cabo con un caudal de 0.7 ml/min y un tampón de desplazamiento (***"running buffer"***) de 1 mM Tris (pH 8), 115 mM NaCl, 2 mM EDTA y 0.0% NaN_3). El péptido marcado se incuba con HDL, LDL y VLDL con una relación de péptido:fosfolípido de 1:5 (relación de masa) durante 2 horas a 37° C. La cantidad requerida de lipoproteína (volúmenes basados en la cantidad necesaria para producir 1000 µg) se mezcla con 0.2 ml de solución patrón concentrada de péptido (***"peptide stock solution"***) (1 mg/ml) y la solución se lleva hasta 2.2 ml usando 0.9% de NaCl.

[0246] Luego de incubar durante 2 horas a 37°C, se retira una alícuota (0.1 ml) para la determinación de la radioactividad total (p. ej., por conteo de centelleo en líquido (***"liquid scintilation counting"***) o conteo gamma dependiendo del isótopo de marcado), se ajusta la densidad

de la mezcla de incubación resultante a 1.21 g/ml con KBr, y las muestras se centrifugan a 100.000 rpm (300.000 g) durante 24 horas a 4° C en un rotor TLA 100.3 usando una ultracentrífuga de mesa Beckman. El sobrenadante resultante se fracciona retirando alícuotas de 0.3 ml de la parte superior de cada muestra para un total de 5 fracciones, y se usa 0.05 ml de cada fracción para el conteo. Las dos fracciones superiores contienen las lipoproteínas flotantes, las otras fracciones (3-5) corresponden a proteínas/péptidos en solución.

Fijación Selectiva a Lípidos de HDL

[0247] Plasma humano (2 ml) se incuba con 20, 40, 60, 80, y 100 µg de péptido marcado durante 2 horas a 37°C. Se separan las lipoproteínas ajustando la densidad a 1.21 g/ml y centrifugación en un rotor TLA 100.3 a 100.000 rpm (300.000 g) durante 36 horas a 4° C. Los 900 µl superiores (en fracciones de 300 µl) se toman para el análisis. Se cuentan 50 µl de cada fracción de 300 µl para detectar radioactividad y 200 µl de cada fracción se analizan por FPLC (columna de combinación Superose 6/Superose 12).

Uso de los Mediadores de Transporte Reverso de Colesterol en Sistemas de Modelos Animales

[0248] La eficacia de los mediadores de RCT de la invención puede demostrarse en conejos u otros modelos animales apropiados.

Preparación de los Complejos Fosfolípido/Péptido

[0249] Partículas discoides pequeñas compuestas de fosfolípido (DPPC) y péptido se preparan siguiendo el método de diálisis de colato. El fosfolípido se disuelve en cloroformo y se seca bajo una corriente de nitrógeno. El péptido se disuelve en un tampón (solución salina) con una concentración de 1-2 mg/ml. La película de lípido se redisuelve en tampón que contiene colato (43°C) y la solución de péptido se agrega con una relación de peso 3:1 de fosfolípido/péptido. La mezcla se incuba de

un día para otro a 43° C y se dializa a 43°C (24 horas), temperatura de la sala (24 horas) y 4°C (24 horas), con tres cambios de tampón (volúmenes grandes) en punto de temperatura. Los complejos pueden esterilizarse por filtración (0.22 μm) para inyección y almacenamiento a 4°C.

Aislamiento y Caracterización de las Partículas de Péptido/Fosfolípido

[0250] Las partículas pueden separarse en una columna de filtración en gel (Superose 6 HR). La posición del pico que contiene las partículas se identifica midiendo la concentración de fosfolípido en cada fracción. Del volumen de elución, puede determinarse el radio de Stokes. La concentración de péptido en el complejo se determina midiendo el contenido de fenilalanina (por HPLC) luego de una hidrólisis de ácido de 16 horas.

Inyección en el Conejo

[0251] Conejos blancos de Nueva Zelandia (2.5-3 kg) se inyectan por vía intravenosa con una dosis de complejo fosfolípido /péptido (5 ó 10 mg/kg de peso corporal, expresado como péptido) en una sola inyección intravenosa rápida que no exceda los 10-15 ml. Los animales se sedan ligeramente antes de las manipulaciones. Se toman muestras de sangre (recogidas en EDTA) antes y 5, 15, 30, 60, 240 y 1440 minutos después de la inyección. El hematocrito (Hot) se determina para cada muestra. Las muestras se dividen en alícuotas y se almacenan a -20°C antes del análisis.

Análisis de los Sueros de los Conejos

[0252] El colesterol total en el plasma, los triglicéridos en el plasma y los fosfolípidos en el plasma se determina enzimáticamente usando análisis disponibles en el comercio, por ejemplo, de acuerdo con los protocolos del fabricante (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania y Biomerieux, 69280, Marcy-L'Etoile, Francia).

[0253] Los perfiles de lipoproteína en el plasma de las

fracciones obtenidas luego de la separación del plasma en sus fracciones de lipoproteína pueden determinarse centrifugando ("*by spinning*") en una gradiente de densidad de sacarosa. Por ejemplo, se recogen las fracciones y se pueden medir los niveles de fosfolípido y colesterol por análisis enzimático convencional en las fracciones correspondientes a las densidades de lipoproteína VLDL, ILDL, LDL y HDL.

Ejemplos Prácticos

[0254] La meta a corto plazo era identificar imitadores de compuestos de ApoA-I que funcionan en el transporte de colesterol mediado por HDL al hígado. La meta a largo plazo era modificar los compuestos, de modo que puedan interactuar con un subconjunto de lipoproteínas y direccionarlas al hígado y amplificar la velocidad del catabolismo de lipoproteínas ricas en colesterol (transporte reverso de colesterol). A diferencia de los tratamientos actuales (resinas, estatinas, fibratos), que regulan el transporte de colesterol a los tejidos periféricos, la estrategia adoptada aquí involucra la amplificación de la velocidad de RCT aumentando los niveles del colesterol HDL (HDL-C) y el catabolismo de las lipoproteínas de baja densidad ricas en colesterol. La justificación de esta estrategia es la relación inversa largamente reconocida entre la velocidad de RCT y el riesgo cardiovascular.

[0255] *Aislamiento de Lipoproteína* - Lipoproteínas de plasma humano se aislaron de plasma fresco en ayunas que se obtuvo por plasmaféresis de donantes normales. LDL (d=1.019-1.063 g/ml) se aisló bajo condiciones libres de endotoxinas, estrictamente estériles mediante ultracentrifugación secuencial usando KBr para ajuste de la densidad. Se dializó contra 0.15 mM NaCl que contenía 0.3 mM EDTA y probucol, pH 7.4, se esterilizó por filtración y se almacenó a 4°C.

[0256] *Radioyodización* – LDL ^{125}I-marcada se preparó por el procedimiento con monocloruro de yodo con actividades específicas finales de alrededor de 500-900 cpm/ng (Goldstein y Brown 1974 *J. Biol. Chem.* **249**:5153-5162). La fijación y degradación de lipoproteínas de

baja densidad por fibroblastos humanos cultivados se llevaron a cabo con actividades específicas finales de alrededor de 500-900 cpm/ng (Goldstein y Brown 1974 *J. Biol. Chem.* **249**:5153-5162). En cada caso, >99% de radioactividad fue precipitable por incubación de las lipoproteínas a 4°C con 10% (p/vol) de ácido tricloroacético (TCA). El residuo Tyr se unió al N-término de cada péptido para permitir su radioyodización. Los péptidos se radioyodizaron con $Na^{125}I$ (ICN), usando Iodo-Beads (Pierce Chemicals) y siguiendo los protocolos del fabricante, a una actividad específica de 800-1000 cpm/ng. Luego de la diálisis, la radioactividad precipitable (10% TCA) de los péptidos fue siempre >97%.

[0257] *Estabilidad del plasma y distribución de lipoproteínas de péptidos* – Los ratones LDLR-/- usados para estos estudios eran machos, de 2 meses de edad, y se alimentaron con comida normal para ratones. La sangre se extrajo de ratones - no expuestos a ayuno - en tubos recubiertos de heparina, y se sometió a centrifugación a baja velocidad a 4°C para obtener el plasma. Para medir la estabilidad del plasma, 5-6 µg de péptido radioyodizado se agregaron a 0.25 ml de plasma. Luego de la incubación a 37°C, se retiraron alícuotas y se sometieron a precipitación con 10% TCA. Para estudiar la asociación de péptido de ApoA-I con lipoproteínas y/o otras proteínas en el plasma, 6-8 µg de péptido radioyodizado se incubaron durante 2 horas a 37°C con 0.12 ml de plasma de ratón. Luego de la incubación, la mezcla se separó 1% de gel de agarosa (Paragon system, Beckman Coulter) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se cuantificó la radioactividad en las bandas que representaban LDL, HDL, y albúmina.

[0258] *Distribución de péptidos en los tejidos* - 12 µg de péptido radioyodizado se inyectaron por vía intravenosa en la vena de la cola de ratones con deficiencia de apo-A-1 bajo anestesia con Metofane. Los ratones se sacrificaron 40 minutos después de la inyección, y la sangre se retiró por perfusión con PBS mediante una cánula en el ventrículo izquierdo. Los ratones se sangraron 40 minutos después por sangrado retroorbital en tubos heparinizados.

[0259] *Complejos de Mediador-LDL* – Complejos péptido/lipoproteína se formaron por incubación de cantidades excesivas de péptido radiomarcado (SEQ ID No. 1) durante 2 horas a 25 °C con LDL de plasma humano, diluida en PBS con una relación molar 25:1. Los complejos se dializaron extensivamente a 4°C para retirar el péptido libre contra PBS que contenía 20 μM de hidroxitolueno butilado (BHT) hasta el conteo en dialización. La radioactividad de la solución fue menos de 400-600 cpm/ml durante un mínimo de 2 horas. Los complejos formados se usaron inmediatamente.

[0260] *Depuración del plasma y distribución de complejos SEQ ID No. 1-LDL en los tejidos* – Se incubó ^{125}I-LDL (0.2 nmol) a 37°C en PBS solo, o con 4 nmol de SEQ ID No. 1. Luego de 2 horas, la mezcla se dializó contra PBS que contenía 20 mM BHT. ^{125}I-LDL sola o complejo SEQ ID No. 1/^{125}I- LDL se inyectaron por vía intravenosa en la vena de la cola de ratones no sometidos a ayuno bajo anestesia con Metofane. Los ratones se sangraron en ciertos puntos de tiempo después de la inyección por sangrado retroorbital en tubos heparinizados. La sangre se sometió a centrifugación de baja velocidad (1800 g, 4°C) y se midio la radioactividad precipitable en 10% TCA del plasma. Los ratones se sacrificaron 40 minutos después de la inyección, y la sangre y la radioactividad no fijada específicamente se eliminaron por perfusión con PBS fría mediante una cánula en el ventrículo izquierdo. Se hizo una incisión en la vena cava interior para depurar el perfusado. En 15 minutos, el hígado, riñones, bazo y corazón se extirparon, se limpiaron, se pesaron y se contaron para detectar ^{125}I radioactividad. Los órganos enteros se contaron con excepción del hígado el cual se contó en pedazos. La radioactividad detectada por órgano o por 1 g de tejido húmedo se expresó como un porcentaje de la radioactividad inyectada total inicial que fue precipitable en TCA.

[0261] *Efecto de inyecciones i.v. rápidas únicas de péptidos sobre el perfil de lipoproteína en el plasma* – Para monitorear el efecto de péptidos sobre los niveles de colesterol en el plasma y su distribución

entre las diferentes clases de lipoproteína, los péptidos libres no radioyodizados (100 µg en 100 µl de PBS) se inyectaron por vía intravenosa en la vena de la cola de ratones tipo salvaje C57BL/6J no sometidos a ayuno, que se habían puesto a dieta alta en grasa que contenía colato, cuatro días antes del experimento. Para control del efecto de factores no específicos externos y/o internos (estrés del manejo, anestésico, extracción de sangre) sobre el perfil de lipoproteína en el plasma, un grupo similar de ratones se inyectó sólo con PBS. Diferentes grupos de ratones se sacrificaron antes en diferentes puntos después de las inyecciones, y se extrajo sangre por punción retroorbital y se sometió a centrifugación de baja velocidad a 4°C para obtener el plasma. Se obtuvieron muestras de plasma, se combinaron con cada grupo (4 ratones), y se sometieron a cromatografía de filtración en gel en una columna Superose 6 (columna HR 10/30, FPLC) para monitorear la distribución de lipoproteínas de colesterol y electroforesis en gel de agarosa (Paragon Systems) para monitorear la distribución de lipoproteínas fosfolípidas.

[0262] *Efecto de péptidos liberados en el tiempo sobre el perfil de lipoproteína en el plasma* – Para determinar relativamente el efecto a largo plazo de SEQ ID No. 1 y sus derivados sobre el perfil de lipoproteína en el plasma, las bombas mini-osmóticas Alzet (220 ul), que contenían varios péptidos o PBS, se insertaron quirúrgicamente en ratones C57BL/6J alimentados con comida normal mediante cánula. Las bombas con un caudal igual a 8 µl/hora se usaron durante 20 horas de infusión continua de péptidos. Las bombas con caudal igual a 1 µl/hora se usaron durante 160 horas de infusiones continuas de péptidos. En el punto final (20 ó 160 horas después de la inserción de las bombas) los ratones se sacrificaron, y se extrajo sangre por punción retroorbital y se sometió a centrifugación a baja velocidad a 4°C para obtener el plasma. Se retiró inmediatamente bilis de las vesículas biliares usando jeringas de insulina, y se almacenó sobre hielo hasta el momento de uso.

[0263] *Análisis de muestras* – El colesterol total en el suero y el colesterol HDL se determinaron usando el método colorimétrico-

enzimático Infinity (Sigma 401-25P) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, cambiando únicamente el tiempo sugerido de incubación a 37°C de 10 a 15 minutos. Para determinar el colesterol HDL, se precipitaron lipoproteínas de baja densidad del plasma usando un método modificado de Burstein-Samaille, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Boehringer Mannheim 543004), modificando únicamente la relación de reactivo:agua de 4:1 a 4:2. Bilis derivada de la vesícula biliar se diluyó dos veces con agua desionizada, y el colesterol se determinó usando reactivos Infinity. Ácidos 3α-hidroxibiliares se cuantificaron usando un método colorimétrico-enzimático (Sigma 450).

[0264] Para monitorear la distribución de colesterol entre las diferentes clases de lipoproteína, muestras de plasma se combinaron en cada (usualmente 4-6 ratones por grupo), y se sometieron a cromatografía de exclusión de tamaño FPLC en una columna Superose 6 (columna HR 10/30, Amersham-Pharmacia) usando un sistema de tampón 10 mM Tris/150 mM NaCl/1mM EDTA isocrático con un caudal de 0.15 ml/min. Se recogieron fracciones (0.15 ml) en placas de 96 pocillos que contenían 0.055 ml de una mezcla 1:1 de 0.5% Triton X-100 y 20 mM de colato de sodio. El colesterol libre y total en las fracciones de plasma se determinó usando el método fluorescente de W. Gamble, *y colaboradores* (Gamble *y colaboradores*, 1978, *Journal Lipid Res.*, **16**:1068-1070). Las placas de 96 pocillos se leyeron en un Espectrofluorómetro de Microplacas de Barrido Dual Gemini XS (Molecular Devices). Las áreas bajo los picos de lipoproteína se cuantificaron usando software Unicorn (versión 3.21.02). Se evaluó la cantidad de colesterol esterificado por sustracción del colesterol libre del colesterol total.

[0265] Para monitorear la distribución de fosfolípido entre las clases de lipoproteína, muestras de plasma se combinaron con cada grupo (usualmente 4-6 ratones por grupo), y se sometieron a electroforesis en gel de agarosa, la cual se llevó a cabo usando el sistema Paragon (Beckman Coulter), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con tinción subsiguiente con Colorante Paragon Lipo (Beckman Coulter 655910).

Una vez secos, los geles se exploraron en Personal Densitometer SI (Molecular Dynamics) y las bandas se cuantificaron usando software ImageQuant™ (versión 5.2).

[0266] *Efecto de péptidos sobre la actividad PLTP (Proteína Transportadora de Fosfolípidos)* – La actividad PLTP se cuantificó usando un estuche fluorescente (Cardiovascular Targets, Inc., P7700). La fuente de PLTP fue suero obtenido de ratones C57BL/6J, machos, de 2 meses de edad, los cuales se alimentaron con comida normal o se mantuvieron en una dieta alta en grasa que contenía colato, durante cuatro días. Suero de ratón IX se pre-incubó con PBS ó 0.4, 2, 5, y 10 µg de péptidos a temperatura de la sala durante 30 minutos. Luego de la pre-incubación, la mezcla se diluyó 10 veces, e inmediatamente 10 µl (0.8 vl suero ***"nest serum"***) se mezclaron en pocillos de reacción de una placa pre-enfriada de 96 pocillos, que contenía un sistema de análisis (Cardiovascular Targets, Inc., P7700). Las microplacas se leyeron a 37°C en SpectraMax 190 (Molecular Devices), durante 30 minutos.

[0267] *Acumulación de colesterol mediada por LDL en Células HepG2 humanas* – Células HepG2 se cultivaron a 37°C en DMEM suplementado con 10% FBS. Las células se esparcieron en una placa de 24 pocillos 24 horas antes del experimento con la densidad de $2.5x10^5$ por pocillo en medio libre de suero (500 µl RPMI suplementado con 1% Nutridoma-HU, Roche, 903454321) para permitir la regulación por incremento de receptores de LDL. El día del experimento, las células se lavaron dos veces con PBS, y se agregaron 25 µg de LDL humana aislada (Academy Bio-Medical Co., 20P-L101), pre-incubada con PBS o péptidos durante 1 hora a temperatura de la sala, a las células en 500 µl de SFM con incubación subsiguiente a 37°C durante 6 horas. Luego de la incubación, se retiró el medio, las células se lavaron dos veces con PBS a temperatura de la sala, y se extrajo el colesterol total por mezcla de Hexano-Isopropanol (3:2), y se secó bajo gas de nitrógeno. Las muestras secas se solubilizaron en 160 µl de tampón TE (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) que contenía 0.1% Triton X-100 y 4 mM de colato de sodio.

El colesterol libre y total en las muestras se cuantificaron usando el método fluorescente de W. Gamble, *y colaboradores* (Gamble *y colaboradores*, 1978, *Journal Lipid Res.*, 16:1068-1070). La cantidad de colesterol esterificado se evaluó por sustracción del colesterol libre del colesterol total. Los resultados se muestran en ***Figura 24.***

[0268] *Acumulación de colesterol mediado por Ac-LDL en macrófagos humanos* – Células THP-1 se cultivaron a 37° C en RPMI suplementado con 10% FBS. 48 horas antes del experimento de carga las células se esparcieron en una placa de 24 pocillos con la densidad de 1x10.6 por pocillo en medio libre de suero (500ul RPMI suplementado con 1% Nutridoma-HU, Roche, Lote #: 903454321) en presencia de 5x10-8 M PMA. El día del experimento, PBS ó 50ug de LDL acetilada humana, (Biomedical technologies Inc. BT-906), pre-incubada con PBS o péptidos durante 1 hora a temperatura de la sala, se agregaron a las células. Las células tratadas se incubaron durante 24 horas a 37°C en un incubador 5% CO_2 humidificado. Luego de la incubación, se retiró el medio, se lavaron las células 2x con PBS a 37°C, y una mezcla de hexano-isopropanol (3:2) se agregó a las células para extraer colesterol. 30 minutos después las muestras se transfirieron a tubos de vidrio y se secaron bajo nitrógeno. La miniesfera formada se solubilizó en 160ul de tampón TE (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA) que contenía 0.1% Triton X-100 & 4mM de colato de sodio. El colesterol libre y total se cuantificó usando el método fluorescente de W. Gamble, *y colaboradores* (Gamble *y colaboradores*, 1978, Journal Lipid Res., 16:1068-1070). La cantidad de colesterol esterificado se evaluó por sustracción del colesterol libre del colesterol total. Los resultados se muestran en ***Figura 25.***

[0269] *Acumulación de colesterol mediado por LDL oxidada en células de músculo liso vascular humano* — Células de músculo liso vascular se cultivaron a 37°C en SmGm-2 (Cambrex, cc-3182) suplementado con 5% FBS. 24 horas antes del experimento, las células se esparcieron en una placa de 24 pocillos con la densidad de 85.000 por

pocillo en 500ul de medio de análisis libre de suero (SmGM-2 suplementado con 1% Nutridoma-HU, Roche, Lote #: 903454321). El día del experimento, las células se lavaron dos veces con PBS, y 25ug de LDL humana oxidada (Biomedical technologies Inc. BT-906), pre-incubada con PBS o péptidos durante 1 hora a temperatura de la sala, se agregaron a las células en 500ul de medio de análisis libre de suero (SFM). Las células tratadas se incubaron durante 24 horas a 37°C en un incubador de CO_2 5% humidificado. Luego de la incubación, se retiró el medio, se lavaron las células 2x con PBS a 37°C y el colesterol se extrajo por mezcla (3:2) de hexano-isopropanol. Las muestras se secaron bajo nitrógeno. Las muestras secas se solubilizaron en 160ul de tampón de TE (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA) que contenía 0.1% Triton X-100 y 4mM de colato de sodio. El colesterol libre y total en las muestras se cuantificó usando el método fluorescente descrito en W. Gamble, *y colaboradores* (Gamble *y colaboradores*, 1978, Journal Lipid Res., 16:1068-1070). La cantidad de colesterol esterificado se evaluó por sustracción del colesterol libre del colesterol total. Los resultados se muestran en ***Figura 26***.

[0270] *Descarga de colesterol de macrófagos humanos precargados con Ac-LDL* – Células THP-1 se cultivaron a 37°C en RPMI suplementado con 10% FBS. 48 horas antes del experimento de carga, las células se esparcieron en una placa de 24 pocillos con una densidad de $1x10_6$ por pocillo en 500 ul de medio libre de suero (RPMI suplementado con 1% Nutridoma-HU, Roche, Lot e#: 903454321)) en presencia de $5x10^{-8}$ M PMA. El día del experimento, PBS ó 50ug de LDL acetilada humana, (Biomedical technologies Inc. BT-906) se agregaron a las células en medio libre de suero en presencia de 5x10-8M PMA. Las células tratadas se incubaron durante 24 hora a 37°C en un incubador de CO_2 5% humidificado. Luego de la incubación, se retiró el medio, se lavaron las células con medio libre de suero, y PBS o compuestos se agregaron a las células en 500ul de medio libre de suero (sin PMA). Las células tratadas se incubaron a 37°C en un incubador de CO_2 5% humidificado durante otras 48 horas. Lo compuestos se repusieron cada

24 horas. Luego de la incubación, se retiró el medio, se lavaron las células con medio libre de suero 2x con PBS a 37°C, y una mezcla de hexano-isopropanol (3:2) se agregó a las células para extraer colesterol. 30 minutos después las muestras se transfirieron a tubos de vidrio y se secaron bajo nitrógeno. La mini-esfera formada se solubilizó en 160ul de tampón de TE (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA) que contenía 0.1% Triton X-100 & 4mM de colato de sodio. El colesterol libre y total se cuantificó usando el método fluorescente de W. Gamble, *y colaboradores* (Gamble *y colaboradores*, 1978, Journal Lipid Res., 16:1068-1070). La cantidad de colesterol esterificado se evaluó por sustracción del colesterol libre del colesterol total. Los resultados se muestran en ***Figura 27***.

[0271] Analizamos la estructura primaria, secundaria y terciaria de ApoA-I para diseñar las series de compuestos. Los compuestos líderes potenciales, para afectar el metabolismo de lipoproteína, exhiben preferiblemente capacidad para fijarse a lipoproteínas y a sitios de fijación de lipoproteína del hígado. Por consiguiente, todos los compuestos se radiomarcaron y cribaron con respecto a su distribución en los tejidos *in vivo* (mice) y su capacidad de fijar lipoproteínas de plasma de ratón *in vitro*.

[0272] *Caracterización de los mediadores de péptido de RCT in vitro* – Doce compuestos se radioyodizaron e incubaron con plasma de ratones con deficiencia en receptor de LDL (LDLR-/-). Estos ratones tienen un perfil de lipoproteína similar al de humanos. Luego de la incubación a 37°C durante 2 horas, la mezcla se separó en geles de azarosa, y se cuantificó la radioactividad en las bandas que representaban LDL, HDL, y albúmina. Los resultados se resumen en ***Figura 2***. Con base en estos resultados, los compuestos que demostraron una asociación significativa con lipoproteínas se caracterizaron todavía más *in vivo*.

[0273] *Caracterización de los mediadores de péptido de RCT in vivo* – Los compuestos radiomarcados se inyectaron por vía intravenosa en ratones. En el punto final, los ratones se sangraron y se perfundieron

extensivamente para eliminar radioactividad en circulación (no específica). Se recogieron y se contaron sangre entera y órganos diana potenciales. La radioactividad total en los órganos recogidos y el volumen de sangre total del ratón se calcularon, y la radioactividad fijada a los órganos se expresó como un porcentaje de la radioactividad total. Los resultados de la radioactividad fijada a los órganos luego de las inyecciones de los compuestos se muestran en ***Figura 3***. Con base en estos datos, SEQ ID No. 1 se seleccionó para caracterización adicional *in vivo*.

[0274] *Caracterización adicional de SEQ ID No. 1 in vivo* - ***Figura 4*** ilustra la distribución en los órganos de SEQ ID No. 1. Debido a que este compuesto se asoció con el hígado preferencialmente en una medida dramática, comparado con otros órganos y péptidos, escogimos centrar nuestros esfuerzos en este compuesto.

[0275] Para determinar si SEQ ID No. 1 se puede asociar con LDL humana, intentamos formar el complejo de ^{125}I-SEQ ID No. 1 con LDL aislada humana. Se ha demostrado que SEQ ID No. 1 forma el complejo estable [LDL-^{125}I-SEQ ID No. 1], donde se fijaron aproximadamente 6 a 8 copias de [^{125}I-SEQ ID No. 1] por partícula de LDL. Para determinar si SEQ ID No. 1 influye en el transporte de lipoproteína al hígado, inyectamos la ^{125}I-LDL sola o en complejo con SEQ ID No. 1 en ratones LDLR-/- (sin receptor de LDL) y ratones A-I-/-, que tenían un receptor LDL hepático funcional. La radioactividad asociada con el hígado se evaluó y los resultados se presentan en ***Figura 5***. En ambos genotipos de ratón, el acomplejamiento de [^{125}I-LDL] con SEQ ID No. 1 antes de la inyección resultó en un aumento significativo en [^{125}I-LDL] fijada al hígado. Estos datos indican que la fijación hepática mejorada del complejo [^{125}I-LDL-SEQ ID No. 1] (compárese con [^{125}I-LDL]) es mediada por: (a) sitios de fijación de lipoproteína al hígado, que todavía se desconocen; (b) receptores de LDL. Para evaluar la contribución de receptores de LDL sola, la fijación de [^{125}I-LDL] y [^{125}I-LDL-SEQ ID No. 1] al hígado de ratones LDLR-A se restó de su

respectiva fijación al hígado de ratones A-I-/-, y los datos se normalizaron por gramo de tejido húmedo. El resultado de esta sustracción se presenta en ***Figura 6*** y muestra un aumento sustancial en la fijación del complejo a los receptores de LDL comparados con [^{125}I-LDL] sola. Estos datos están en perfecto acuerdo con una depuración del plasma mejorada del complejo ^{125}I-LDL-SEQ ID No. 1 comparada con ^{125}I-LDL sola, cuando se inyecto a ratones ApoA1-/- (***Figura 7***). La influencia de SEQ ID No. 1 sobre la fijación de ^{125}I-LDL al riñón, bazo, pulmón, corazón, testículos, glándulas suprarrenales y próstata se muestra en ***Figura 8***. Es digno de anotar que no se observó aumento en la fijación del complejo ^{125}I-LDL-SEQ ID No. 1 al corazón.

[0276] *Impacto de SEQ ID No. 1 sobre el metabolismo de lipoproteínas (inyecciones i.v. rápidas únicas)* – Examinamos el impacto de SEQ ID No. 1 sobre el metabolismo del colesterol en ratones C57BL/6J tipo salvaje, moderadamente hiperlipidémicos, alimentados con una dieta alta en grasa que contenía colato (HFC). Los ratones se dividieron en dos - control y experimental. Cada grupo contenía 4 ratones. Los ratones experimentales se inyectaron por vía intravenosa con SEQ ID No. 1 (100 µg en 100 µl de PBS), mientras que el grupo de control – con 100 µl de PBS. Diferentes grupos de ratones se sangraron a 0 min (sin inyecciones), 30, 60, 90, 120, y 180 minutos después de las inyecciones, se obtuvo el plasma, se combinó con cada, y se sometió a análisis de FPLC. Se evaluó la distribución del colesterol entre las diferentes clases de lipoproteína, y los datos se expresaron como contenido de colesterol (Act*ml) área bajo los picos de VLDL, IDL/LDL y HDL, respectivamente. Los resultados se presentan en ***Figuras 9***, ***10*** y ***11***. Aunque no hubo un impacto significativo de SEQ ID No. 1 sobre el nivel de VLDL durante todo el ciclo de tiempo, la cinética de la respuesta hepática fue notablemente diferente comparada con el control de PBS (***Figura 9***). Una reducción significativa de IDL/LDL (lipoproteínas pro-aterogénicas y aterogénicas) se observó a los 90, 120 y 180 minutos después de las inyecciones de SEQ ID No. 1 (***Figura 10***). El efecto de SEQ ID No. 1 dura hasta 180 minutos

y se desvaneció completamente en el punto de tiempo 240 minutos. Estos datos están en perfecto acuerdo con datos de vida media *in vivo* de ^{125}I-SEQ ID No. 1, que es aproximadamente 2 a 3 horas. Se observó una caída ligera pero significativa de los niveles de HDL-C luego de inyecciones i.v. rápidas únicas de SEQ ID No. 1 (***Figura 11***), indicando un posible aumento de la depuración de HDL. El análisis de regresión lineal de inyecciones i.v. rápidas individuales se presentan en ***Figuras 12-14*** y muestra un impacto significativo de SEQ ID No. 1 sobre los niveles de plasma de lipoproteínas pro- y aterogénicas (IDL y LDL).

[0277] *Efecto de péptidos derivados de "cambio de marco" ("frame-shift") sobre el metabolismo de lipoproteínas (inyecciones i.v. rápidas únicas)* – Realizamos el cambio de marco funcional de toda la región de apolipoproteína A1 de ratón, donde SEQ ID No. 1 derivada de (hélice 6, Pro166 – Pro188, proteína precursora). El cambio de marco se hizo en ambas direcciones (de N- a C- y de C- a N-término). Dieciseis (16) péptidos se diseñaron, sintetizaron y probaron con respecto a los posibles efectos sobre el metabolismo del colesterol de ratones C57BL/6J moderadamente hiperlipidémicos, alimentados con una dieta alta en grasa que contenía colato (HFC). Los ratones se dividieron en dos grupos - control y experimental. Cada grupo contenía 4 ratones. Los ratones experimentales se inyectaron por vía intravenosa con cada péptido (100 µg en 100 µl de PBS), mientras que el grupo de control – con 100 ul de PBS. Diferentes grupos de ratones se sangraron a 0 minutos (sin inyecciones), 90 y 180 minutos después de las inyecciones, se obtuvo el plasma, se combinó con cada grupo, y se sometió a análisis FPLC. Se evaluó la distribución de colesterol entre las diferentes clases de lipoproteína, y se cuantificó el contenido de colesterol (Act*ml) o área bajo los picos VLDL, IDL/LDL y HDL. Los datos se expresan como porcentaje de cambio del contenido de colesterol total (TC) de clases de VLDL, IDL/LDL y HDL en ratones experimentales, en relación con ratones de control (inyectados con PBS). Los resultados se presentan en ***Tablas 6*** y ***7***. Puede apreciarse en ***Tablas 6*** y ***7*** que SEQ ID No. 1, que pertenece a la parte N-terminal de

la Hélice 6, tiene el impacto más fuerte sobre los niveles de plasma de lipoproteínas de baja densidad comparada con otras secuencias, mientras que SEQ ID No. 7, que pertenece a la parte C-terminal de la Hélice 6, demostró las propiedades marcadas que elevan el HDL-C.

Efecto de Péptidos Derivados de Cambio de Marco sobre el Perfil de Lipoproteína del Plasma. 90 Minutos después de Inyecciones i.v. Rápidas únicas (SBI).

#	AVP#	Secuencias	M.W.	VLDL	IDL/LDL	HDL
1	606	YEFRDRMRTH	1451.8	-34	-28	-5.3
2	13577	PVAEEFRDRMRTHVDSLRTQLAP	2766.5	0	-12.4	-1.8
3	13578	EEFRDRMRTHVDSLRTQLAP	2499.1	38.4	12.2	-15.1
4	13579	FRDRMRTHVDSLRTQLAP	2240.8	-4	-3	19.5
5	13580	RDRMRTHVDSLRTQLAP	2093.4	-3.5	12.6	11.1
6	13590	MRTHVDSLRTQLAP	1685.9	-1.8	-2.1	-6.3
7	13581	RTHVDSLRTQLAP	1534.7	-6.5	5.2	9.1
8	13582	THVDSLRTQLAP	1376.6	26	2.3	31
9	13583	DSLRTQLAP	1041.2	9.3	10.4	8.3
10	13600	PVAEEFRDRMRTHVDSLR	2256.4	47	23.5	16.1
11	13584	PVAEEFRDRMRTHV	1783.9	0	9.7	-22.3
12	13585	PVAEEFRDRMR	1446.3	-4	6.6	5
13	13586	PVAEEFRDRM	1290.2	-21	2.1	13.5
14	13587	PVAEEFRDR	1159.3	-10	8.5	11.4
15	13588	PVAEEF	731.8	30.7	0	20
16	13589	PVAEE	584.6	4.4	4.6	16.5

Tabla 6. Los ratones de dividieron en dos grupos (4 ratones en cada grupo). Los péptidos o PBS se inyectaron por vía intravenosa en ratones experimentales o de control, respectivamente. A los 90 minutos después de las SBI se obtuvo el plasma, se combinó con cada grupo y se aplicó en una columna Superose 6. Los datos se expresaron como % de la variación del área TC (Act*ml) o área bajo los picos de VLDL, IDL/LDL y HDL comparados con el control PBS.

Efecto de Péptidos Derivados de Cambio de Marco sobre el Perfil de Lipoproteína del Plasma. 180 Minutos después de Inyecciones i.v. Rápidas únicas (SBI).

#	AVP#	Secuencia	M.W.	VLDL	IDL/LDL	HDL
1	606	YEFRDRMRTH	1451.8	-29.31	-34.11	-10
2	13577	PVAEEFRDRMRTHVDSLRTQLAP	2766.5	19.5	3.1	4.3
3	13578	EEFRDRMRTHVDSLRTQLAP	2499.1	-18.8	-6.3	-15.7
4	13579	FRDRMRTHVDSLRTQLAP	2240.8	-5	-7.1	-9.5
5	13580	RDRMRTHVDSLRTQLAP	2093.4	-21.5	-7.8	4.9
6	13590	MRTHVDSLRTQLAP	1685.9	-2.8	-15.3	0
7	13581	RTHVDSLRTQLAP	1534.7	-17.6	0	-14.8
8	13582	THVDSLRTQLAP	1376.6	25.7	-11.1	29.4
9	13583	DSLRTQLAP	1041.2	10.8	12.9	-10.1
10	13600	PVAEEFRDRMRTHVDSLR	2255.4	0	6.2	8.4
11	13584	PVAEEFRDRMRTHV	1783.9	-20.7	-4.3	-24.1
12	13585	PVAEEFRDRMR	1446.3	-17	-3.2	-4.5
13	13586	PVAEEFRDRM	1290.2	23.3	18.8	4.5
14	13587	PVAEEFRDR	1159.3	-33.7	5.1	0

15	13586	PVAEEF	731.6	51	14.8	8.8
16	13589	PVAEE	584.6	9.7	7.5	7.2

Tabla 7. Los ratones se dividieron en dos (4 ratones en cada grupo). Los péptidos o PBS se inyectaron por vía intravenosa en ratones experimentales o de control, respectivamente. A los 180 minutos después de las SBI se obtuvo el plasma, se combinó con cada grupo y se aplicó en una columna Superose 6. Los datos se expresaron como % de la variación del área TC (Act*ml) o área bajo los picos de VLDL, IDL/LDL y HDL comparados con el control PBS.

[0278] *Efecto de derivados, químicamente modificados, de SEQ ID No. 1 y péptidos derivados de otras regiones apoA1 de ratón sobre el perfil de lipoproteína de ratón (inyecciones i.v. rápidas únicas)* – Para aumentar la hidrofobicidad de SEQ ID No. 1, fenilacetilo o ácido piválico se unieron al residuo Tyr N-terminal de SEQ ID No. 1, o el residuo Tyr se retiró del N-término. Estos péptidos se ensayaron para detectar el posible efecto sobre el metabolismo del colesterol sobre ratones C57BL/6J moderadamente hiperlipidémicos alimentados con una dieta alta en grasa que contenía colato (HFC). Los ratones se dividieron en dos grupos - control y experimental. Cada grupo contenía 4 ratones. Los ratones experimentales se inyectaron por vía intravenosa con cada péptido (100 μg en 100 μl de PBS), mientras el grupo de control – con 100 μl de PBS. Diferentes grupos de ratones se sangraron a 0 minutos (sin inyecciones), 90, y 180 minutos después de las inyecciones, se obtuvo plasma, se combinó con cada grupo, y se sometió a análisis FPLC. Se evaluó la distribución del colesterol entre diferentes clases de lipoproteína, y se cuantificó el contenido de colesterol (Act*ml) o área bajo los picos de VLDL, IDL/LDL y HDL. Los datos se expresan como porcentaje de la variación de contenido de colesterol total (TC) de clases de VLDL, IDL/LDL y HDL en ratones experimentales, en relación con ratones de control (inyectados con PBS). Los resultados se presentan en ***Tabla 8***. Puede observarse en la tabla que todas las anteriores modificaciones no se tradujeron en un aumento de la potencia de SEQ ID No. 1. Los pocos péptidos pertenecientes a otras regiones de apolipoproteína A1 de ratón se ensayaron también en este modelo y no demostraron ninguna actividad digna de mención (***Tabla 8***).

Efecto de derivados, químicamente modificados, de AVP#606 y péptidos derivados de otras regiones de apoA1 de ratón sobre el perfil de lipoproteína en el plasma de ratón. Inyecciones i.v. Rápidas Únicas

#	AVP#	Secuencia	M.W.	VLDL	IDL/LDL	HDL
		90 minutos después de SBI				
1	13625	Ph YEFRDRMRTH	1527.7	31.7	3.1	-4.5
2	25740	Plv YEFRDRMRTH	1494	11	-1.3	5.7
3	25984	EFRDRMRTH	1288.3	4.4	0	-11.2
4	13608	WSKVKDF	978.1	-17.4	-16.1	-12.4
5	13609	SGRDYVSQFES	1315.4	21.4	8.2	0
6	13610	YLDEFQKKWKE	1554.8	9.5	11.7	19.5
7	13611	TRDFWDNLEKETDW	1696.1	32.6	11.7	9.5
8	13616	WDKVKDFANVYVDAVKD	2053.3	-2.6	9	0
		180 minutos después de SBI				
1	13625	Ph YEFRDRMRTH	1527.7	-17.1	-31.2	-21.5
2	25740	Plv YEFRDRMRTH	1494	-14.9	-10.8	-7.4
3	25984	EFRDRMRTH	1288.3	6.9	-11	-3
4	13608	WSKVKDF	978.1	-15.6	15.5	-11.7
5	13609	SGRDYVSQFES	1315.4	18.4	0	0
6	13610	YLDEFQKKWKE	1554.8	-10.6	-8.5	-20
7	13611	TRDFWDNLEKETDW	1696.1	-2	0	-16.1
8	13616	WDKVKDFANVYVDAVKD	2053.3	19.4	19.9	16.1

Tabla 8. Los ratones de dividieron en dos (4 ratones en cada grupo). Los péptidos o PBS se inyectaron por vía intravenosa en ratones experimentales o de control, respectivamente. A los 90 y 180 minutos después de las SBI se obtuvo el plasma, se combinó con cada grupo y se aplicó en una columna Superose 6. Los datos se expresaron como % de la variación del área TC (Act*ml) o área bajo los picos de VLDL, IDL/LDL y HDL, en relación con el control PBS.

[0279] *Impacto de SEQ ID No. 1 sobre el metabolismo de la lipoproteína (bombas de 20 horas)* - Para determinar el efecto relativamente a largo plazo de SEQ ID No. 1 sobre el perfil de lipoproteína en el plasma, las bombas mini-osmóticas Alzet, que contenían SEQ ID No. 1 ó PBS, se insertaron quirúrgicamente en ratones C57BL/6J alimentados con comida normal mediante cánula. El caudal de las bombas era igual a 8 ul por hora, el cual suministró la cantidad de entrega de SEQ ID No. 1 por hora como se indica para ***Figura 9***. Los ratones se pasaron a una dieta HFC inmediatamente después de la cirugía. 20 horas más tarde se obtuvieron muestras de plasma, se combinaron con cada grupo (4 a 6 ratones), y se sometieron a análisis FPLC y electroforesis en gel de agarosa para evaluación del colesterol y distribución de fosfolípidos entre las clases de lipoproteína. Los resultados se presentan en ***Figura 15*** y muestran una

disminución dramática en los niveles de lipoproteínas de baja densidad de los ratones, que recibieron SEQ ID No. 1, mientras que los niveles de colesterol HDL en el plasma en estos ratones fueron elevados. El efecto reductor de LDL se atenuó con el aumento de la concentración de SEQ ID No. 1. Este fenómeno puede explicarse por auto-competición entre la forma libre y fijada a LDL de SEQ ID No. 1 por los sitios de fijación de lipoproteína en el hígado. En contraste, los niveles de colesterol HDL se correlacionaron positivamente con la concentración de SEQ ID No. 1. El incremento en HDL-C en el plasma es indicio de la posible activación de LCAT (lecitina:colesterol aciltransferasa) o una creciente producción de ApoA-I, mientras que niveles elevados en el plasma de fosfolípidos de HDL (datos no mostrados) sugieren la implicación de PLTP (proteína transportadora de fosfolípidos) en el mecanismo de acción de SEQ ID No. 1. En consecuencia, los datos obtenidos indican multi-funcionalidad de SEQ ID No. 1 y sugieren su implicación en las vías tanto de HDL como de LDL.

[0280] *Impacto de derivados estructurales de SEQ ID No. 1 (3 a 13 residuos de aminoácidos) sobre el metabolismo de lipoproteína (bombas 20 horas)* – Para determinar el efecto relativamente a largo plazo sobre el perfil de lipoproteína en el plasma, las bombas mini-osmóticas Alzet, que contenían derivados de SEQ ID No. 1 o PBS, se insertaron quirúrgicamente en ratones C57BL/6J alimentados con comida común mediante cánula. El caudal de las bombas era igual a 8 ul por hora, el cual suministró las entregas de 30-40 µg de péptidos por hora. Los ratones se cambiaron a una dieta HFC inmediatamente después de la cirugía. 20 horas después se obtuvieron muestras de plasma, se combinaron con cada grupo (4 a 6 ratones), y se sometieron a análisis FPLC y electroforesis en gel de agarosa para evaluación del colesterol y distribución de fosfolípidos entre las clases de lipoproteína. Los datos de HDL-C se presentan en ***Figura 16*** y demuestran una disminución significativa de los niveles de plasma de lipoproteínas de baja densidad en ratones tratados con péptidos, mientras que los niveles de colesterol HDL en el plasma en estos ratones fueron

elevados. No obstante, unos cuantos péptidos (tales como SEQ ID No. 35 y 87) causaron el efecto opuesto, es decir, aumento de los niveles de plasma de lipoproteínas de baja densidad y disminución en colesterol de lipoproteínas de alta densidad y fosfolípidos. Esta inversión de efecto constituye información valiosa para efectos de SAR a la luz de relaciones estructurales estrechas de estos péptidos "que bloquean la depuración" (***"clearance blocking"***) con péptidos "que intensifican la depuración". El modesto aumento en HDL-C en el plasma podría ser indicativo de una posible activación de LCAT (lecitina: colesterol aciltransferasa) o producción creciente de ApoA-I, mientras que niveles en el plasma elevados de fosfolípidos de HDL sugieren la implicación de PLTP (proteína transportadora de fosfolípidos) en el mecanismo de la acción de los péptidos. Por consiguiente, los datos obtenidos sugieren que derivados de SEQ ID No. 1 se encuentran involucrados en las vías tanto de HDL como de LDL.

[0281] *Efecto a largo plazo de SEQ ID No. 34 ("plantilla", péptido de 3 residuos de aminoácidos) y sus derivados modificados (SEQ ID No. 8 y 91) sobre el metabolismo de lipoproteína (bombas de 7 días)* – Para determinar el efecto a largo plazo de estos péptidos sobre el perfil de lipoproteína en el plasma, las bombas mini-osmóticas Alzet, que contenían péptidos o PBS, se insertaron quirúrgicamente en ratones C57BL/6J alimentados son comida normal por medio de cánula. El caudal de las bombas era igual a 1 µl por hora, que suministró las entregas de la cantidad indicada en ***Figura 17*** de cada péptido por hora. Los ratones se cambiaron a una dieta HFC inmediatamente después de la cirugía. 160 horas después los ratones se sacrificaron, se obtuvieron muestras del plasma, se combinaron con cada grupo (4 a 6 ratones), y se sometieron a análisis FPLC y electroforesis en gel de azarosa para evaluación del colesterol y distribución de fosfolípidos entre las clases de lipoproteína. Se retiró inmediatamente la bilis de las vesículas biliares y se determinaron los contenidos totales de colesterol/ácidos biliares como se describe en los métodos. Los datos se presentan en ***Figura 17*** y demuestran una

disminución significativa de los niveles en el plasma de lipoproteínas de baja densidad en ratones tratados con péptidos, elevación de colesterol de HDL en el plasma (y fosfolípido de HDL – datos no mostrados), y un aumento dramático de la cantidad de colesterol total en la vesícula biliar y ácidos biliares. El modesto incremento en HDL-C en el plasma podría ser indicativo de la posible activación de LCAT (lecitina: colesterol aciltransferasa) o producción aumentada de ApoA-I, mientras que niveles elevados en el plasma de fosfolípidos de HDL sugieren la activación de PLTP (proteína transportadora de fosfolípidos), que se sabe que está involucrada en el mantenimiento de niveles de HDL en el plasma y que genera partículas de HDL nasciente (aceptores de colesterol primario). Puede observarse en ***Figura 17*** que la administración de SEQ ID No. 34, 86 y 91 en ratones se tradujo en un aumento en la cantidad de fosfolípido en la zona de HDL, el cual se acompaña usualmente por un incremento en colesterol total y ácidos biliares recuperados de la vesícula biliar. La cantidad incrementada de colesterol / ácidos biliares en una vesícula biliar, junto con la disminución de los niveles de lipoproteína de baja densidad en el plasma (VLDL, IDL, LDL) y aumento de los niveles de HDL, es indicativo de un flujo intensificado de colesterol "Plasma > Hígado > Vesícula Biliar", es decir, transporte reverso de colesterol en presencia de los péptidos, de acuerdo con aspectos preferidos de la presente invención, como se ilustra en ***Figura 17***.

[0282] *Efecto de péptidos sobre la actividad PLTP* – Puede apreciarse en ***Figura 18*** que la incubación de plasma de ratón con SEQ ID No. 34, 86, 91 y 96 se tradujo en activación de PLTP. Plasma de ratón (fuente de enzima), obtenido de ratones alimentados con comida común y de ratones alimentados con una dieta alta en grasa con contenido de colato, durante 4 días, se incubó con PBS o el péptido de SEQ ID No. 34, 86, 91 y 96 (0.4, 2, 5, y 10ug) a temperatura de la sala durante 30 minutos. Se inició la reacción mediante la adición de 0.3 µl de plasma/PBS o mezcla de plasma/SEQ ID No. (sic) a 100 µl de solución de análisis que contenía sustrato fluorescente. Se monitoreó la actividad PLTP en un

espectrofluorómetro durante 20 minutos a 37°C. Cada barra representa la media ± SEM obtenida de 3 experimentos independientes. Estos datos están en perfecto acuerdo con los resultados de estudiar el efecto a largo plazo de estos péptidos sobre los niveles de HDL en el plasma de ratón (p. ej., los resultados obtenidos con bombas de 7 días, mostrados en ***Figura 17***) y aportan una fuerte evidencia en favor de la implicación de PLTP en mecanismos *in vivo* de la acción del péptido. Péptidos correspondientes a SEQ ID No. 35 y 36 no tuvieron ningún efecto significativo sobre la actividad PLTP. Es digno de anotar que estos dos péptidos tampoco mostraron actividad significativa sobre la infusión en ratones durante 20 horas (véase ***Figura 16***).

[0283] *Efecto de la administración oral aguda de SEQ ID No. 91 (AVP-26249) sobre el perfil de lipoproteína en el plasma de ratón y ácido biliar / colesterol en la bilis* – Con referencia a ***Figura 19***, las barras mostradas para 2.5 y 20 ug representan la media ± SEM de 2 experimentos independientes y las barras mostradas para 5 y 10 ug representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes con C57BL/6J alimentados con HFD. Barras de no error – experimento único. El efecto se expresa como % de variación relativa al control PBS (0%).

[0284] *Efecto de administración oral ad libitum de SEQ ID No. 91 (AVP-26249) en ratones ApoE-/-alimentados con comida normal sobre TC (Colesterol Total) en el plasma* – Con referencia a ***Figura 20***, ratones machos ApoE-/-, de dos meses de edad, se alimentaron con dieta de comida normal. Un día del experimento en T0 (Tiempo 0) los ratones se sangraron (50ul), se determinó el TC en el plasma, y los ratones se dividieron en grupos (4 ratones por grupo) con valores en T0 similares de colesterol promedio del grupo. Los ratones de control recibieron agua potable y los ratones experimentales recibieron solución en agua del compuesto. Los ratones se sangraron cada 72-96 horas, y se cuantificó el colesterol en el plasma. Cada barra representa la media ± SEM de 4 animales y es representativa de 15 determinaciones llevadas a cabo bisemanalmente. La cantidad de SEQ ID No. 91 se expresa como mg por kg (mpk), consumida

por 24 horas.

[0285] *Efecto de SEQ ID No. 91, 145, 146 y 118 (AVP-26249, 26451, 26452, y 26355, respectivamente) sobre los niveles de colesterol en el plasma en ratones ApoE-/- alimentados con dieta alta en grasa* – Con referencia a ***Figura 21***, ratones machos ApoE-/- de tres meses de edad se mantuvieron a dieta con comida normal. El día 0, los ratones se sangraron, se determinó el TC en el plasma, y los ratones se dividieron en grupos (4 ratones por grupo) con valores similares de colesterol promedio y peso. Los ratones de control recibieron agua potable y los ratones experimentales recibieron solución en agua de los compuestos. Cuatro semanas más tarde, los ratones se cambiaron a una dieta alta en grasa. Los ratones se sangraron una vez en 10 días, y se cuantificó el colesterol total en el plasma. Cada barra representa la media ± SEM de 4 animales y es representativa de 7 determinaciones. La cantidad de SEQ ID No. (sic) se expresa como mg por kg (mpk), consumida por 24 horas.

[0286] *Efecto de SEQ ID No. 91, 145, 146 y 118 (AVP-26249, 26451, 26452, y 26355, respectivamente) sobre la cantidad de colesterol excretado por ratones ApoE-/-alimentados con dietas altas en grasa* - Con referencia a ***Figura 22***, ocho grupos de ratones machos ApoE-/-, de 5 meses de edad (4 ratones en cada grupo) se mantuvieron a dieta alta en grasa. Los ratones de control recibieron agua potable, mientras que los ratones experimentales recibieron soluciones en agua de los compuestos "*ad libitum*". Los ratones se pusieron en jaulas metabólicas de un día para otro el día siguiente, se recogieron las heces, se secaron durante 72 horas, se pesaron, y se extrajo el colesterol total y se cuantificó. Cada barra representa la media ± SEM de dos experimentos "de jaula metabólica" independientes que se llevaron a cabo 2.4 y 3.4 semanas después de que los ratones se alimentaron con dieta alta en grasa. La cantidad de SEQ ID No. (sic) se expresa como mg por kg (mpk), consumida por 24 horas.

[0287] En conclusión, los resultados resumidos en ***Figuras 2-22*** y ***Tablas 6-8*** demuestran que los ratones hiperlipidémicos, a los que se administraron los mediadores de péptido de RCT, diseñados de acuerdo con

el Modelo Molecular de la presente invención, por vías de administración intravenosas u orales, exhibieron mejoras sustanciales en el perfil de lipoproteína en el plasma, que se deben a una depuración mejorada de lipoproteínas de baja densidad (aterogénicas) y elevación de los niveles de plasma de lipoproteínas anti-aterogénicas de alta densidad.

[0288] Con referencia a ***Figura 23***, un diagrama esquemático muestra un triángulo *in vitro* usado en un método de cribado para identificar compuestos de prueba que tienden a mejorar el RCT *in vivo*. Las células de macrófagos cultivados se usan para evaluar los efectos de compuestos de mediadores de RCT de prueba, tanto en la acumulación de colesterol ac-LDL como en la descarga de colesterol de células de macrófagos precargados (macrófagos que acumulan colesterol contribuyen a la formación de células que contienen lípidos en pequeñas vacuolas (***"foam cells"***) y la formación de placa ateroesclerótica). Por consiguiente, este compartimiento del triángulo se usa para evaluar la efectividad de compuestos de prueba sobre RCT, así como la patogénesis de arterioesclerosis. Las células de músculo liso primario cultivadas se utilizan para evaluar los efectos de compuestos mediadores de RCT de prueba sobre la acumulación de ox-LDL en la pared vascular, los cuales pueden estar relacionados también con la formación de células que contienen lípidos en pequeñas vacuolas y la evolución de la arterioesclerosis. Los hepatocitos cultivados se usan para evaluar los efectos de los compuestos mediadores de RCT de prueba sobre la absorción de colesterol por el hígado. El uso de las células periféricas (macrófagos y/o células de músculo liso en combinación con los hepatocitos) proporciona ventajosamente un monitoreo de RCT — acumulación reducida de colesterol y descarga mejorada de colesterol de las células periféricas, así como absorción por el hígado (para metabolismo y excreción).

[0289] *Efecto de SEQ ID No. 91 y 146 (AVP-26249 y AVP-26452, respectivamente) sobre la Acumulación Mediada por LDL de Colesterol Total en Células HepG2.* Con referencia a ***Figura 24***, células

HepG2 humanas se esparcieron en una placa de 24 pocillos con la densidad de 2.5x105 por pocillo en medio de análisis libre de suero (libre de lipoproteína). 48 horas después 25ug de LDL humana pre-incubada durante 1 hora a temperatura de la sala con PBS o compuestos, se agregaron a las células en 500ul de medio libre de suero. Las células tratadas se incubaron durante 24 horas a 37°C en un incubador de CO_2 5% humidificado. Cada barra representa la media ± SEM de 2-3 experimentos independientes.

[0290] *Efecto de SEQ ID No. 91 (AVP-26249) sobre la Acumulación Mediada por Ac-LDL de Colesterol Total y Colesteril Éster en Macrófagos.* Con referencia a ***Figura 25***, células THP-1 humanas se esparcieron sobre una placa en medio de análisis en 24 pocillos, con la densidad de 1x106 por pocillo en presencia de 5x10-8 M de PMA. 48 horas después 50ug de AcLDL humana, pre-incubada durante 1hora a temperatura de la sala con PBS (control), o AVP-26249, se agregaron a las células en 500ul de medio de análisis. Las células tratadas se incubaron durante 24 horas a 37°C en un incubador de CO_2 5% humidificado. Cada barra representa la media ± SEM de 3-9 réplicas.

[0291] *Efecto de SEQ ID No. 91 y 146 (A VP-26249 y 26452, respectivamente) sobre la Acumulación Mediada por Ox-LDL de Colesterol Total y Colesteril Éster en Células de Músculo Liso Vascular.* Con referencia a ***Figura 26***, células de músculo liso vascular humano se esparcieron en una placa de 24 pocillos con la densidad 9x104 por pocillo en medio de análisis libre de suero. 24 horas después PBS únicamente o LDL oxidada humana, pre-incubada durante 1 hora a temperatura de la sala con PBS, o con compuestos, se agregaron a las células en 500ul de medio de análisis. Las células tratadas se incubaron durante 24 horas a 37°C en un incubador de CO_2 5% humidificado. Cada barra representa la media ± SEM de 4-7 experimentos independientes.

[0292] *Efecto de SEQ ID No. 91 y 146 (AVP-26249 y AVP-26452, respectivamente) sobre la Descarga de Colesterol de Macrófagos Cargados con AcLDL.* Con referencia a ***Figura 27***, células THP-1 humanas se esparcieron en medio de análisis en una placa de 24 pocillos

con la densidad de 1x106 por pocillo en presencia de 5x10-8 M de PMA. 48 horas después 50ug de LDL acetilada humana o PBS se agregaron a las células en 500ul de medio de análisis que contenía PMA. 24 horas más tarde las células se lavaron y de agregaron PBS o compuestos a las células en 500ul de medio de análisis. Antes y después de cada tratamiento, las células se incubaron a 37°C en un incubador de CO_2 5% humidificado. Cada barra representa la media ± SEM de 5-6 experimentos independientes.

[0293] Una meta es desplazar el colesterol de los macrófagos y las células de la aorta al hígado para depuración del colesterol (véase ***Figura 30***). La capacidad de uno de los compuestos de prueba, tales como los indicados en Tablas 3-5 para efectuar RCT puede predecirse con base en los análisis llevados a cabo, como se muestra en Figuras 24-27 más arriba. Es decir, estos tres tipos de células proporcionan una foto instantánea del estado del colesterol en el organismo. La capacidad de un compuesto dado de disminuir los niveles de colesterol y CE en una célula macrófago tal como células THP-1 y células de músculo liso vascular, aumentando al mismo tiempo los niveles de colesterol en hepatocitos tales como (células HepG2) es predictivo de su efectividad *in vivo*. Por consiguiente, una incorporación de la presente invención involucra un método de método cribado en el cual se analizan compuestos de prueba *in vitro*, usando líneas celulares de macrófago, células de músculo liso y hepatocitos, tales como las divulgadas, para suministrar un indicio de RCT *in vivo*.

[0294] *Efecto de SEQ ID No. 91 (AVP-26249) sobre la Evolución de Lesiones Ateroescleróticas en Aorta de Ratones ApoE-/- Alimentados con Dietas Altas en Grasa* – Con referencia ***Figura 28***, ratones machos ApoE-/- se mantuvieron a dieta de comida normal durante 4 semanas y en HFD (1.25% de colesterol) durante 9.3 semanas. Los ratones recibieron SEQ ID No. 91 (AVP-26249) "***ad libitum***" a través del agua potable durante 13.3 semanas. Las concentraciones de SEQ ID No. 91 son cero (panel izquierdo), 1.4 µg/kg (panel central) y 2.8 µg/kg (panel derecho). Al momento de la eutanasia, los animales se perfundieron con PBS, seguido

por sacarosa formal (4% paraformaldehído y 5% de sacarosa en PBS, pH 7.4). Se cortó en pedazos la aorta del ratón desde la aorta ascendente proximal hasta la bifurcación de la arteria ilíaca usando un microscopio de disección. Se retiró la grasa adventicia y se abrió la arteria en sentido longitudinal, se estiró y se aseguró sobre cera de disección negra, se tiñó con Sudan IV, y se fotografió con una ampliación fija. Las fotografías se digitalizaron y las imágenes digitales se muestran. Se calcularon el área aórtica total y el área de lesión usando Adope Photoshop 7.0 y software NIH Scion Image (datos no mostrados).

[0295] *Efecto de SEQ ID No. 146 (AVP-26452) sobre la Evolución de Lesiones Ateroescleróticas en la Aorta de Ratones ApoE-/- Alimentados con Dietas Altas en Grasa* - Con referencia a ***Figura 29***, ratones machos ApoE-/- se mantuvieron a dieta de comida normal durante 4 semanas y a HFD (1.25% de colesterol) durante 9.3 semanas. Los ratones recibieron SEQ ID No. 146 (AVP-26452) "***ad libitum***" por medio del agua potable durante 13.3 semanas. Las concentraciones de SEQ ID No. 146 son cero (panel izquierdo), 1.4 μg/kg (panel central) y 2.8 μg/kg (panel derecho).

REFERENCIAS CITADAS:

Alam *y colaboradores* (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 15641-15649

Anantharamaiah *y colaboradores* (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 10248-10255

Anantharamaiah *y colaboradores* (1987) *J. Lipid Res.* 29, 309-318

Anantharamaiah *y colaboradores* (1990) *Arteriosclerosis*, 10, 95-105

Arai *y colaboradores* (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 2366-2371

Argraves *y colaboradores* (1997) *J. Clin. Invest.* 100, 2170-2181

Austin *y colaboradores* (1988) *JAMA*, 260, 1917-1921

Austin *y colaboradores* (1990) *Circulation*, 82, 495-506

Banka *y colaboradores* (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 10288-10297

Barbaras *y colaboradores* (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142, 63-69

Barter P (2000) *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 2029

Berneis and Krauss (2002) *J. Lipid Res.* 43, 1363-1379

Bhatnagar A. (1999) *in Lipoproteins and Health Disease*, páginas 737-752, Arnold, London

Bolibar *y colaboradores* (2000) *Thromb. Haemost.* 84, 955-961

Boren *y colaboradores* (2001) *J. Biol Chem.* 276, 9214-9218

Brouillette and Anantharamaiah (1995) *Biochim. Biophys. Acta.* 1256, 103-129

Brunzell JD (1995) in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disorders*, páginas 1913-1932, McGraw-Hill, Inc., New York

Buchko *y colaboradores* (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 3039-3045

Camejo *y colaboradores* (1985) *Atherosclerosis*, 55, 93-105

Campos *y colaboradores* (1992) *Arteriosclerosis Thrombosis*, 12, 187-193

Canner *y colaboradores* (1986) *JACC*, 8, 1245-1255

Cao *y colaboradores* (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 39561-39565

Castelli *y colaboradores* (1986) *JAMA*, 256, 2835-2838

Castro and Fielding (1998) *Biochemistry*, 27, 25-29

Chait *y colaboradores* (1993) *Am. J. Med.* 94, 350-356

Chambenoit *y colaboradores* (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 9955-9960;

Chang *y colaboradores* (1997) *Annu Rev Biochem.* 66, 613-638

Chapman *y colaboradores* (1998) *Eur Heart J*, Suppl A: A24-30

Chen and Albers (1985) *Biochim Biophys. Acta*, 836, 275-285

Chen *y colaboradores* (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 30794-30800

Cohen *y colaboradores* (1999) *Curr Opin Lipidol.* 10, 259-268

Collet *y colaboradores* (1997) *J. Lipid Res.* 38, 634-644

Collet *y colaboradores* (1999) *J. Lipid Res.* 40, 1185-1193

Curtiss and Boisvert (2000) *Curr. Opin. Lipidol.* 11, 243-251

Datta *y colaboradores* (2001) *J. Lipid Res.* 42, 1096-1104

Davis *y colaboradores* (2002) *J. Lipid Res.* 43, 533-543

de Graaf *y colaboradores* (1993) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76, 197-202

Downs *y colaboradores* (1998) *JAMA*, 279, 1615-1622

Duverger *y colaboradores* (1996) *Circulation*, 94, 713-717

Ehnholm *y colaboradores* (1998) *J. Lipid Res.* 39, 1248-1253

Epand *y colaboradores* (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 9389-9396

Eriksson *y colaboradores* (1999) *Circulation*, 100, 594-598

Fan *y colaboradores* (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 40071-40079

Fidge NH (1999) *J. Lipid Res.* 40, 187-201

Fielding *y colaboradores* (1994) *Biochemistry*, 33, 6981-6985

Fitch WM (1977) *Genetics*, 86, 623-644

Fogelman *y colaboradores* (2003) United States Patent Application Publication, US 2003/0045460 A1

Föger *y colaboradores* (1996) *Arterioscler Thromb Vase Biology*, 16, 1430-1436

Föger *y colaboradores* (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 36912-36920

Frank and Marcel (2000) *J. Lipid Res.* 41, 853-872

Frick *y colaboradores* (1987) *N. England J. Medicine*, 317, 1237-1245

Fuskushima *y colaboradores* (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 10651-10657

Gamble *y colaboradores* (1978) *J. Lipid Res.* 16, 1068-1070

Garber *y colaboradores* (1992) *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 12, 886-894

Garber *y colaboradores* (2001) *J. Lipid Res.* 42, 545-552

Garcia *y colaboradores* (1996) *Biochemistry*, 35, 13064-13071

Genest *y colaboradores* (1991) *Am J Cardiol.* 67, 1185-1189

Genest *y colaboradores* (1992) *Circulation*, 85, 2025-2033

Genest *y colaboradores* (1999) *J. Invest. Med.* 47, 31-42

Gibbons *y colaboradores* (1995) *Am. J. Med.* 99, 378-385

Gillotte *y colaboradores* (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 2021-2028

Glomset JA (1968) *J. Lipid Res.* 9, 155-167

Goldberg I. (1996) *J. Lipid Res.* 37, 693-707

Golder-Novoselsky *y colaboradores* (1995) *Biochim. Biophys. Acta*, 1254, 217-220

Goldstein and Brown (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 5153-5162

Gordon *y colaboradores* (1989) *N Engl. J. Med.* 321, 1311-1315

Gotto AM (2001) *Circulation*, 103, 2213

Griffin *y colaboradores* (1994) *Arterioesclerosis*, 106, 241-253

Groen *y colaboradores* (2001) *J. Clin. Invest.* 108, 843-850

Hajjar and Haberland (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 22975-22978

Hara and Yokoyama (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 3080-3086

Hedrick *y colaboradores* (2001) *J. Lipid Res.* 42, 563-570

Huang *y colaboradores* (1995) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biology*, 15, 1412-1418

Huang *y colaboradores* (1997) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 2010-2015

Hulley *y colaboradores* (1998) *JAMA*, 280, 605-613

Huuskonen and Ehnholm (2000) *Curr. Opin. Lipidol.* 11, 285-289

Huuskonen *y colaboradores* (2000) *Arterioesclerosis*, 151, 451-461

Ikewaki *y colaboradores* (1993) *J. Clin. Invest.* 92, 1650-1658

Ikewaki *y colaboradores* (1995) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biology*, 15, 306-312

Ishigami *y colaboradores* (1994) *J. Biochem.* (Tokyo) 116, 257-262

Jaakkola *y colaboradores* (1993) *Coron. Artery Dis.* 4, 379-385

Jauhianen *y colaboradores* (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 4032-4036

Jiang *y colaboradores* (1996) *J. Clin. Invest.* 98, 2373-2380

Jiang *y colaboradores* (1999) *J. Clin. Invest.* 103, 907-914

Jonas A (1991) *Biochim. Biophys, Acta*, 1084, 205-220

Jones *y colaboradores* (1998) *Am. J. Cardiol.* 81, 582-587

Kaiser and Kezdy (1983) *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 80, 1137-1140

Kanellis *y colaboradores* (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 11464-11472

Kawano *y colaboradores* (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 29477-2948

Kozarsky *y colaboradores* (2000) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biology*, 20, 721-727

Krauss and Burke (1981) *J, Lipid Res.* 23, 97-104

Krieger M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 4077-4080

La Belle and Krauss (1990) *J Lipid Res.*, 31, 1577-1588

Lindholm *y colaboradores* (1998) *Biochemistry*, 37, 4863-4868

Liu and Krieger (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 34125-34135

Lund-Katz *y colaboradores* (1993) In *"Peptides: Chemistry and Biology"*

(R. Haughten, ed.) ESCOM
Press, Leiden, The Netherlands
Lusa *y colaboradores* (1996) *Biochem. J.* 313, 275-282
Main *y colaboradores* (1996) *Biochim Biophys Acta*, 29, 17-24
Marotti *y colaboradores* (1993) *Nature*, 364, 73-75
Martin-Jadraque *y colaboradores* (1996) *Arch. Intern. Med.* 156, 1081-1088
Marzal-Casacuberta *y colaboradores* (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 6720-6728
Matsumoto *y colaboradores* (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 16778-16782
McLachlan AD (1977) *Nature*, 267, 465-466
McLean *y colaboradores* (1991) *Biochemistry*, 30, 31-37
McManus *y colaboradores* (2000) *J. Biol Chem.* 275, 5043-5051
Mendez *y colaboradores* (1994) *J. Clin. Invest.* 94, 1-698-1705
Meng *y colaboradores* (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 8588-8596
Merkel *y colaboradores* (2002) *J. Lipid Res.* 43, 1997-2006
Miccoli *y colaboradores* (1997) *J. Lipid Res.* 38, 1242-1253
Miettinen *y colaboradores* (1997) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biology*, 17, 3021-3032
Miller *y colaboradores* (1987) *Am Heart J.* 113, 589-597
Milner *y colaboradores* (1991) *Biochim Biophys Acta*, 26, 1082, 71-78
Mishra *y colaboradores* (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 7185-7191
Mishra *y colaboradores* (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 1602-1611
Mishra *y colaboradores* (1998) *Biochemistry*, 37, 10313-10324
Morton RE (1999) *Curr Opin Lipidol.* 10, 321-327
Nagano *y colaboradores* (2002) *J. Lipid Res.* 43, 1011-1018
Naito HK (1985) *Ann. NY Acad. Sci*, 454, 230-238
Nakagawa *y colaboradores* (1985) *J. Am. Chem. Soc.* 107, 7087-7092
Ohnishi and Yokoyama (1993) *Biochemistry*, 32 (19), 5029-5035
Oka *y colaboradores* (2000) *Clin. Chem.* 46, 1357-1364
Oka *y colaboradores* (2000) *J. Lipid Res.* 41, 1651-1657
Oka *y colaboradores* (2002) *J. Lipid Res.* 43, 1236-1243
Okamoto *y colaboradores* (2000) *Nature*, 13, 406 (6792): 203-7
Oram and Lawn (2001/*J. Lipid Res.* 42, 1173-1179

Oram and Yokoyama (1997) *J Lipid Res.* 37, 2473-2491

Packard and Shepherd (1997) *Arteriosclerosis, Thromb, Vasc. Biology*, 17, 3542-3556

Palgunachari *y colaboradores* (1996) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 16, 328-338

Plump *y colaboradores* (1997) *Prc. Natl. Acad Sci. USA*, 91, 9607-9611

Ponsin *y colaboradores* (1986a) *J. Biol Chem.* 261, 9202-9205

Ponsin *y colaboradores* (1986b) *J. Clin. Invest.* 77, 559-567

Pownall *y colaboradores* (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77(6), 3154-3158

Pownall *y colaboradores* (1985) *Biochim. Biophys. Ada*, 833, 456-462

Puchois *y colaboradores* (1987) *Atherosclerosis*, 68, 35-40

Pussinen *y colaboradores* (1997) *J. Lipid Res.* 38, 12-21

Pussinen *y colaboradores* (1998) *J. Lipid Res.* 39, 152-161

Qin *y colaboradores* (2000) *J. Lipid Res.* 41, 269-276

Ramsamy *y colaboradores* (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 33480-33486

Remaley *y colaboradores* (1997) *Arterioscler Thromb. Vasc. Biology*, 17, 1813-1821

Reschly *y colaboradores* (2002) *J. Biol Chem.* 277, 9645-9654

Riemens *y colaboradores* (1998%) *Atherosclerosis*, 140, 71-79

Riemens *y colaboradores* (1999) *J. Lipid Res.* 40, 1459-1466

Rinninger *y colaboradores* (1998) *J. Lipid Res.* 39, 1335-1348

Ross R. (1993) *Nature*, 362, 801-809

Rothblat *y colaboradores* (1999) *J. Lipid Res.* 40, 781-796

Rubin etal. (1991) *Nature*, 353, 265-267

Rubins, *y colaboradores* (1999) *N. Engl. J. Med.* 341, 410-418

Santamarina-Fojo and Dugi (1994) *Curr. Opin. Lipidol.* 5, 117-125

Santamarina-Fojo *y colaboradores* (2000) *Curr. Opin. Lipidol.* 11, 267-275

Schissel *y colaboradores* (1996) *J. Clin. Invest.* 98, 1455-1464

Second Report of the Expert Panel (1994) *Circulation*, 89, 1329-1445

Segrest *y colaboradores* (1983) *Journal Biol Chem.* 258, 2290-2295

Segrest *y colaboradores* (1994) *Advances in Protein Chem.* 45, 303-369

Segrest *y colaboradores* (2001) *J. Lipid Res.* 42, 1346-1367

Segrest JP (1974) *FEBS Lett.* 38, 247-253

Settasation *y colaboradores* (2000) *J. Biol. Chem.* 276, 26898-26905

Shaefer EJ (1994) *Eur. J. Clin. Invest.* 24, 441-443

Shatara *y colaboradores* (2000) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 78, 367-371

Shepherd *y colaboradores* (1995) *N. Engl. J. Med.* 333, 1301-1307

Sorci-Thomas *y colaboradores* (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 2665-2670

Sorci-Thomas *y colaboradores* (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 12156-12163

Sparks *y colaboradores* (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 25839-25847

Sparrow *y colaboradores* (1981) In: *"Peptides: Synthesis-Structure-Function,"* Roch and Gross, Eds., Pierce Chem. Co., Rockford, IL. 253-256

Sparrow *y colaboradores* (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 10021-10027

Srinivas *y colaboradores* (1990) *Virology*, 176, 48-57

Stein and Stein (1999) *Atherosclerosis*, 144, 285-303

Steiner *y colaboradores* (1987) *Circulation*, 75, 124-130

Steinmetz and Utermann (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 2258-2264

Sviridov *y colaboradores* (1996) *Biochemistry*, 35, 189-196

Sviridov *y colaboradores* (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 19707-19712

Sviridov *y colaboradores* (2000) *J. Lipid Res.* 41, 1872-1882

Swinkels *y colaboradores* (1989) *Arteriosclerosis*, 9, 604-613

Tall and Wang (2000) *J. Clin. Invest.* 106, 1205-1207

Tall *y colaboradores* (2000) *Arterioscler. Thromb, Vase. Biol.* 20, 1185-1188

Tall *y colaboradores* (2001) *J. Clin. Invest.* 108, 1273-1275

Tall *y colaboradores* (2001) *J. Clin. Invest.* 108, 1273-1275

Tangirala *y colaboradores* (1999) *Circulation*, 100, 1816-1822

Temel *y colaboradores* (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 26565-26572

The BIP study group (2000) *Circulation*, 102, 21-27

The International Task Force for Prevention of Coronary Heart Disease (1998) *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 8, 205-271

Thuahnai *y colaboradores* (2001) *J. Biol Chem.* 276, 43801-43808

Tribble *y colaboradores* (1992) *Atherosclerosis*, 93, 189-199

Trigatti *y colaboradores* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 9322-9327

Tu *y colaboradores* (1993) *J. Biol Chem.* 268, 23098-23105

Utermann *y colaboradores* (1984) *Eur. J. Biochem.* 144, 325-331

Vakkilainen *y colaboradores* (2002) *J. Lipid Res.* 43, 598-603

van Eck *y colaboradores* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 6298-6303

Venkatachalapathi *y colaboradores* (1993) *Proteins*, 15, 349-359

von Eckardstein A. (1996) *Curr Opin Lipidol.* 7, 308-319

von Eckardstein and Assmann (2000) *Curr Opin Lipidol.* 11, 627-637

von Eckardstein *y colaboradores* (1995) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 690-701

von Eckardstein *y colaboradores* (1996) *Biochim. Biophys. Acta*, 1301, 255-262

von Eckardstein *y colaboradores* (2001) *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 13

Webb *y colaboradores* (2002) *J. Lipid Res.* 43, 1890-1898

Whayne *y colaboradores* (1981) *Atherosclerosis*, 39, 411-424

Yamashita *y colaboradores* (1991) *Metabolism*, 40, 756-763

Yamazaki *y colaboradores* (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 5847-5853

Zhong *y colaboradores* (1994) *Peptide Research*, 7(2): 99-106

(1984) *JAMA*, 251, 365-374

LO QUE SE REIVINDICA ES:

1. Un mediador de transporte reverso de colesterol que comprende una molécula que incluye una región ácida, una región aromática o lipófila y una región básica, teniendo dicha molécula una estructura adaptada para acomplejarse con HDL y/o colesterol-lipoproteína de baja densidad (LDL) y, por ello, intensificar el transporte reverso de colesterol.

2. El mediador de transporte reverso de colesterol de la Reivindicación 1, en donde dicha molécula tiene entre 3 y 10 residuos de aminoácido o análogos de los mismos, y comprende la secuencia:

X1-X2-X3, en donde X1 es un aminoácido ácido, X2 es un aminoácido aromático o lipófilo, y X3 es un aminoácido básico, y en donde X1, X2 y X3 pueden disponerse en cualquier orden de secuencia;

en donde un terminal amino comprende además un primer grupo protector seleccionado del grupo conformado por un acetilo, fenilacetilo, pivolilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo, ácido 2-naftílico, ácido nicotínico, un $CH_3—(CH_2)_n—$ CO— donde n varía de 3 a 20, di-terc-butil-4-hidroxi-fenilo, naftilo, naftilo sustituido, f-MOC, bifenilo, fenilo sustituido, heterociclos sustituidos, alquilo, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo fusionado, heteroarilo saturado, y heteroarilo saturado sustituido; y

en donde un terminal carboxi comprende además un segundo grupo protector seleccionado del grupo conformado por una amina, tal como RNH_2 donde R = H, di-terc-butil-4-hidroxi-fenilo, naftilo, naftilo sustituido, f-MOC, bifenilo, fenilo sustituido, heterociclos sustituidos, alquilo, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo fusionado, heteroarilo saturado, y heteroarilo saturado sustituido.

3. El mediador de transporte reverso de colesterol de la Reivindicación 2, en donde uno o más de X1, X2 ó X3 son residuos D de aminoácido.

4. El mediador de transporte reverso de colesterol de la Reivindicación 2, en donde uno o más de X1, X2 ó X3 son aminoácidos sintéticos o semisintéticos modificados.

5. El mediador de transporte reverso de colesterol de la Reivindicación 4, en donde el aminoácido sintético o semisintético modificado es bifenilalanina.

6. Una sustancia derivada de aminoácido sustancialmente pura para tratar y/o prevenir hipercolesterolemia y/o arterioesclerosis en un mamífero, teniendo dicha sustancia un terminal amino y un terminal carboxi y que comprende un enantiómero L ó D de un residuo de aminoácido ácido o derivado del mismo, un enantiómero L ó D de un residuo de aminoácido aromático o lipófilo o derivado del mismo, y un enantiómero L ó D de un residuo de aminoácido básico o derivado del mismo,

en donde el terminal amino comprende además un primer grupo protector seleccionado del grupo conformado por un acetilo, fenilacetilo, pivolilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo, ácido 2-naftílico, ácido nicotínico, un CH_3—$(CH_2)_n$— CO— en donde n varía de 3 a 20, di-terc-butil-4-hidroxi-fenilo, naftilo, naftilo sustituido, f-MOC, bifenilo, fenilo sustituido, heterociclos sustituidos, alquilo, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo fusionado, heteroarilo saturado, heteroarilo saturado sustituido, y similares;

en donde el terminal carboxi comprende además un segundo grupo protector seleccionado del grupo conformado por una amina, tal como RNH_2 donde R = H, di-terc-butil-4-hidroxi-fenilo, naftilo, naftilo sustituido, f-MOC, bifenilo, fenilo sustituido, heterociclos sustituidos, alquilo, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo fusionado, heteroarilo saturado, heteroarilo saturado sustituido, y similares; y

en donde dicha sustancia tiene por lo menos una de las siguientes propiedades: (1) imita ApoA-I que se fija a LDL y HDL, (2) se fija preferencialmente al hígado, (3) intensifica la absorción de

LDL por los receptores LDL del hígado, (4) reduce los niveles de colesterol LDL, IDL y VLDL, (5) aumenta los niveles de colesterol HDL, y (6) intensifica los perfiles de lipoproteína en el plasma.

7. Una composición apropiada para administración oral que alivia o previene un síntoma de hipercolesterolemia, en donde dicha composición comprende una molécula derivada de aminoácido con una región ácida, una región aromática o lipófila y una región básica, y en donde dicha molécula derivada de aminoácido tiene un primer grupo protector unido a un terminal amino y un segundo grupo protector unido a un terminal carboxilo, y en donde dicha molécula derivada de aminoácido comprende opcionalmente por lo menos un residuo de aminoácido D.

8. La composición de la Reivindicación 7, que incluye por lo menos un residuo de aminoácido D.

9. Un mediador de péptido de RCT, que comprende la secuencia:

$$X_a\text{-}X_b\text{-}(X1\text{-}X2\text{-}X3)\text{-}X_c\text{-}X_d,$$

en donde

X_a es un residuo de aminoácido acilado;

X_b es cualquiera de 0-10 residuos de aminoácido;

X1-X2-X3 son residuos de aminoácido o derivados de los mismos, seleccionados independientemente de un residuo de aminoácido ácido, un residuo de aminoácido lipófilo, y un residuo de aminoácido básico o derivado del mismo, con la salvedad de que uno de dichos X1, X2 ó X3 es un residuo ácido, uno de dichos X1, X2 ó X3 es un residuo lipófilo y uno de dichos X1, X2 ó X3 es un residuo básico;

X_c es cualquiera de 0-10 residuos de aminoácido;

X_d es un residuo de aminoácido amidado; y

en donde el mediador de péptido tiene 15 ó menos residuos de aminoácido y comprende opcionalmente por lo menos un residuo de aminoácido D.

10. Un mediador de RCT, que comprende un compuesto seleccionado del grupo conformado por los compuestos sintéticos 1-96 de

Tabla 5.

11. Un mediador de RCT, que comprende un compuesto seleccionado del grupo conformado por SEQ ID Nos. 1 y 107-117.

12. Un mediador de RCT, que comprende un compuesto seleccionado del grupo conformado por SEQ ID Nos. 1, 26-36, 42, 45-47, 56-58, 68-70, 72-74, 76, 80, 81, 83-90 y 92-95.

13. Una composición farmacéutica que comprende SEQ ID No. 1.

14. Una composición farmacéutica que comprende SEQ ID No. 113.

15. Una composición farmacéutica que comprende SEQ ID No. 34.

16. Una composición farmacéutica que comprende SEQ ID No. 86.

17. Una composición farmacéutica que comprende SEQ ID No. 91.

18. Una composición farmacéutica que comprende SEQ ID No. 96.

19. Una composición farmacéutica que comprende SEQ ID No. 145.

20. Una composición farmacéutica que comprende SEQ ID No. 146.

21. Una composición farmacéutica que comprende SEQ ID No. 118.

22. Una composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1-21 para uso en la preparación de un medicamento apropiado para administración para el tratamiento de hipercolesterolemia y/o arterioesclerosis.

23. La composición de la Reivindicación 22, en donde dicho medicamento es apropiado para administración oral.

24. La composición de la Reivindicación 22, en donde dicho medicamento se combina con una resina fijadora de ácido biliar, niacina, una estatina, o una combinación de las mismas.

25. Un método de cribado *in vitro* para identificar compuestos de prueba que tienden a intensificar el transporte reverso de colesterol *in vivo*, que comprende:

medir la acumulación de colesterol en hepatocitos *in vitro* en la presencia y ausencia de los compuestos de prueba;

medir la acumulación de colesterol y/o descarga en macrófagos cargados con AcLDL *in vitro* en la presencia y ausencia de compuestos de prueba; y

identificar compuestos de prueba que intensifican la acumulación de colesterol en hepatocitos y reducen los niveles de colesterol en macrófagos.

26. El método de cribado *in vitro* de la Reivindicación 25, que comprende además medir los niveles de colesterol en células de músculo liso vascular cargadas con OxLDL *in vitro* en la presencia y ausencia de compuestos de prueba, y en donde el paso de identificar compuestos de prueba comprende además identificar compuestos que intensifican la acumulación de colesterol en hepatocitos y reducen los niveles de colesterol en macrófagos y/o reducen los niveles de colesterol en células de músculo liso vascular.

27. El método de cribado *in vitro* de la Reivindicación 25, en donde dichos hepatocitos son células de hepatoma HepG2 humano.

28. El método de cribado *in vitro* de la Reivindicación 25, en donde dichos macrófagos son células THP-1 humanas.

29. El método de cribado *in vitro* de la Reivindicación 26, en donde dichas células de músculo liso vascular son células de músculo liso aórtico primario.

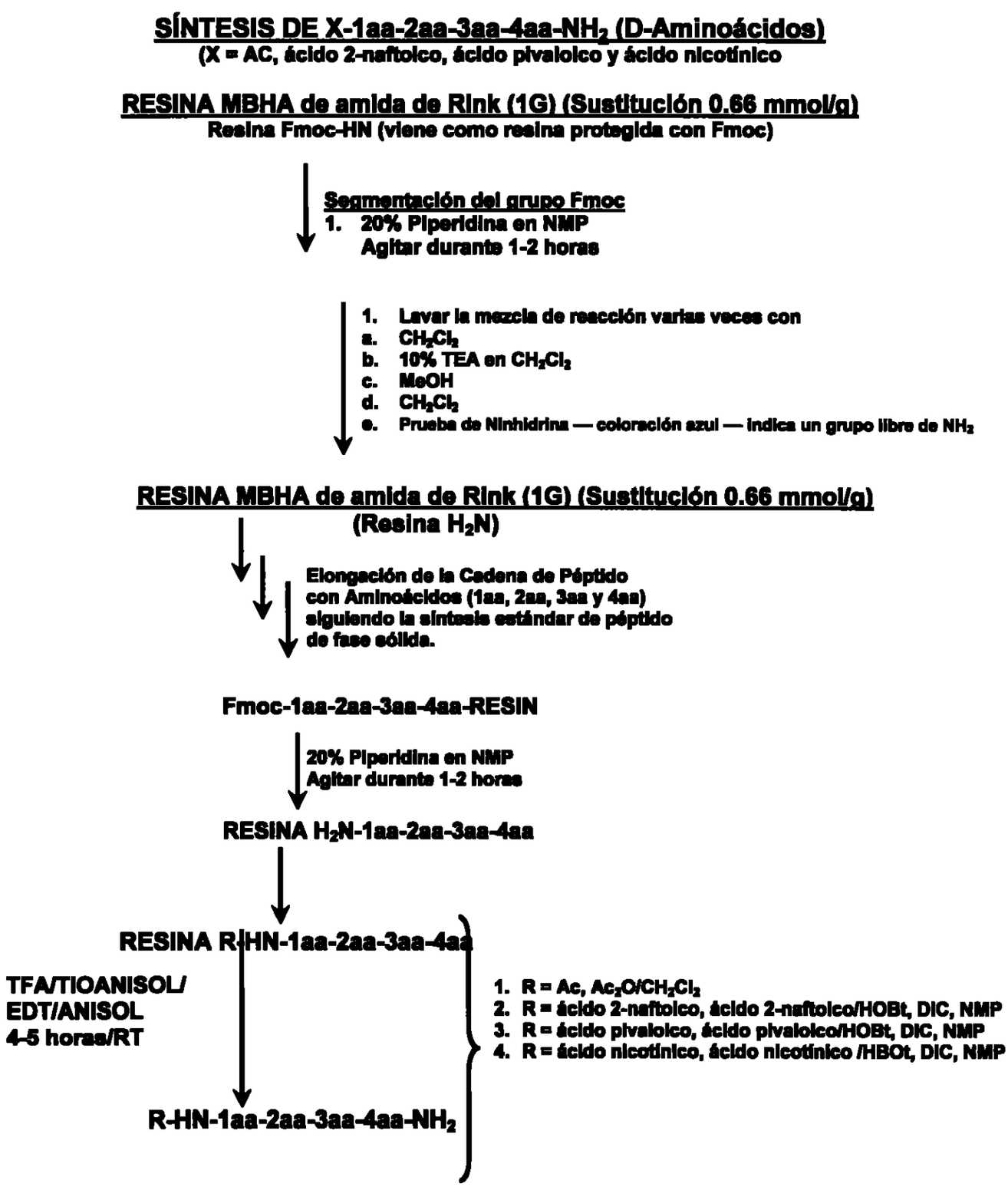
30. Un método de cribado *in vitro* para identificar compuestos de prueba que tienden a intensificar el transporte reverso de colesterol *in vivo*, que comprende:

Medir la acumulación de colesterol en hepatocitos *in vitro* en la presencia y ausencia de los compuestos de prueba;

medir los niveles de colesterol en células de músculo liso

vascular cargadas con AcLDL *in vitro* en la presencia y ausencia de compuestos de prueba; y

identificar compuestos de prueba que intensifican la acumulación de colesterol en hepatocitos y reducen los niveles de colesterol en células de músculo liso vascular.



Representación Esquemática de la Síntesis de Fase Sólida

FIG. 1

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

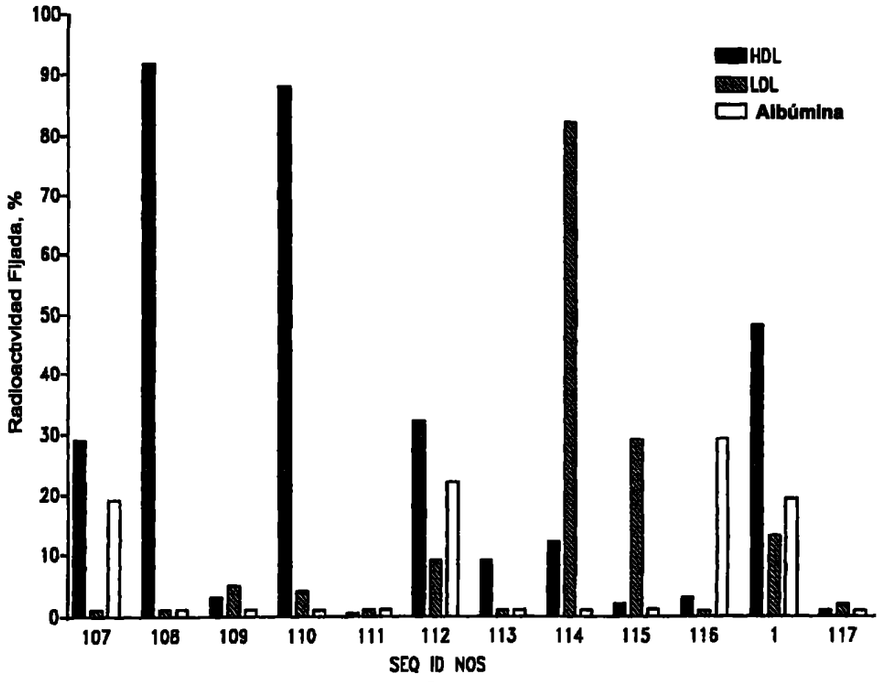


FIG. 2

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

FIG. 3

312

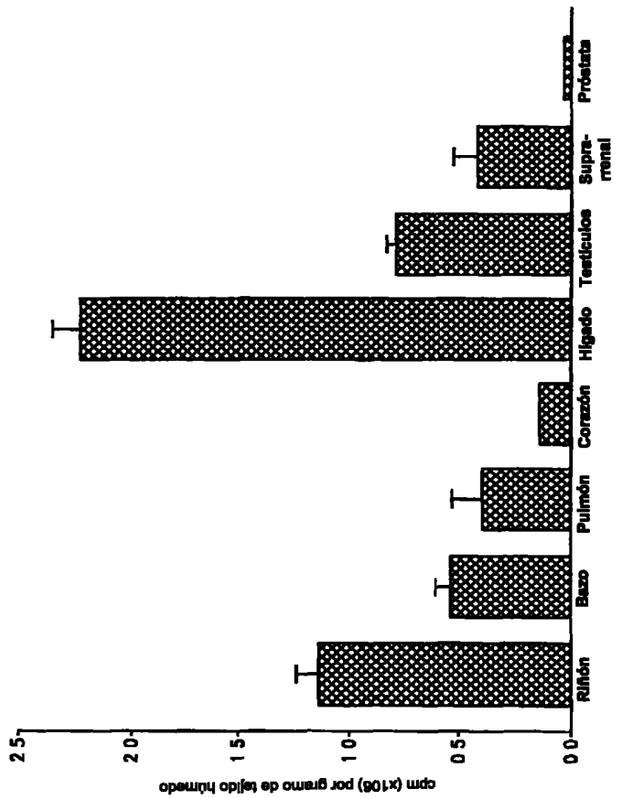

cpm (x10e6) por gramo de tejido húmedo
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
Riñón
Bazo
Pulmón
Corazón
Hígado
Testículos
Supra-renal
Próstata

FIG. 4

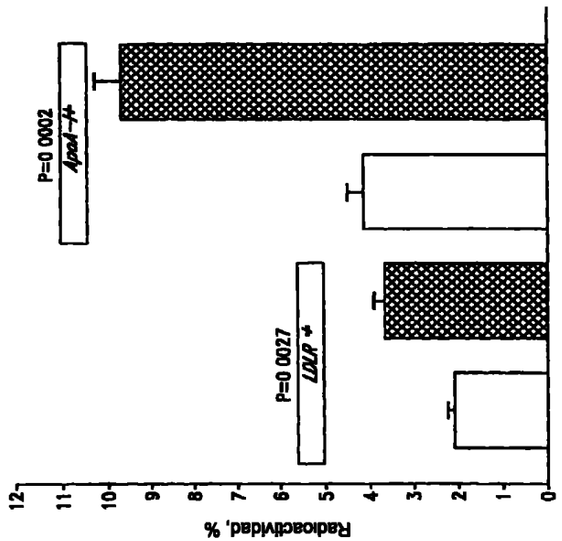

P=0 0002
Apaf-1+/+
P=0 0027
LDLR +/-
Radioactividad, %
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

FIG. 5

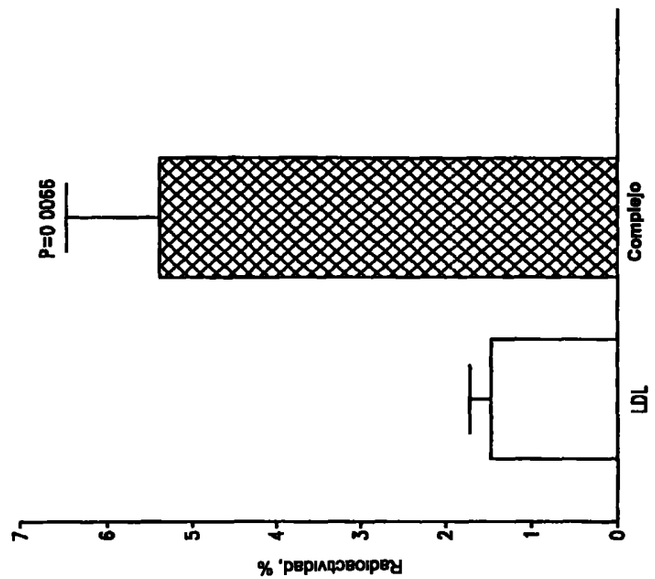


FIG. 6

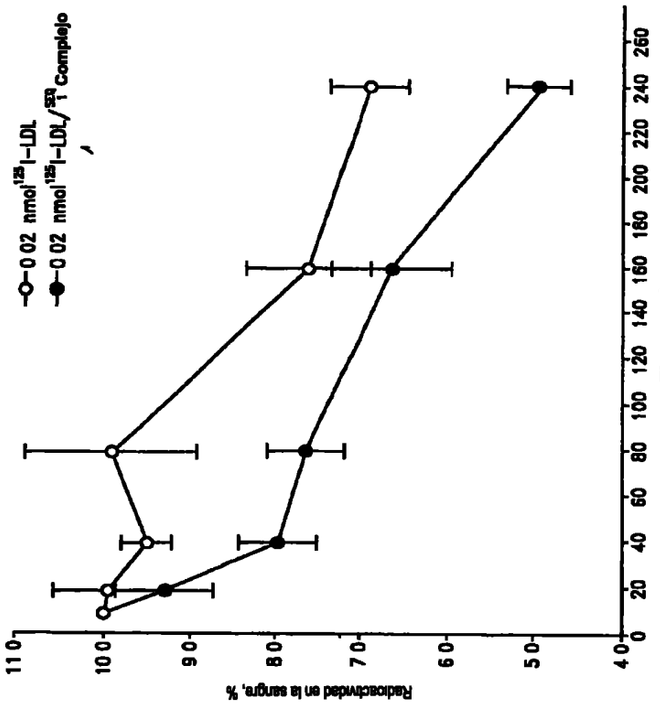

0 02 nmol 125I–LDL
0 02 nmol 125I–LDL/213 Complejo
Radioactividad en la sangre, %
Tiempo, min
110
100
90
80
70
60
50
40
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
240
260

FIG. 7

WO 2004/094471

PCT/US2004/012445

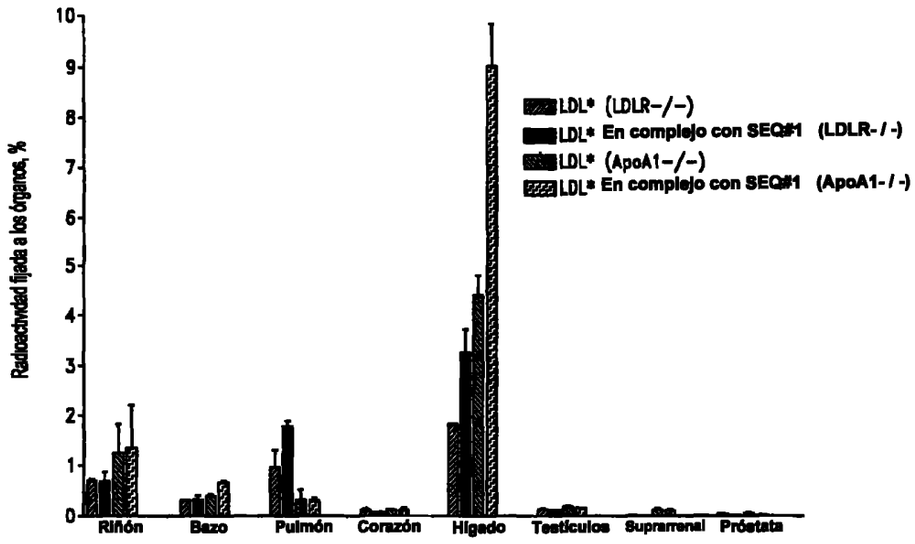


FIG. 8

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

WO 2004/094471

PCT/US2004/012445

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

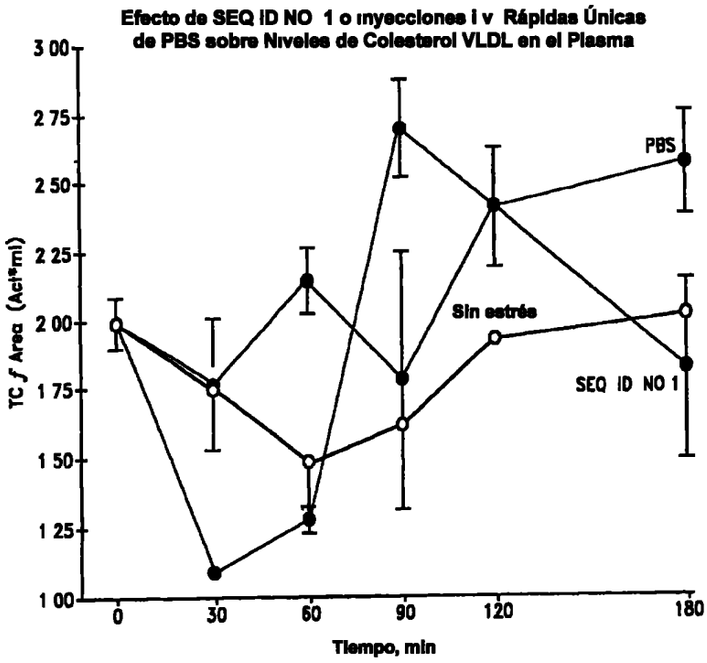


FIG. 9

WO 2004/094471

PCT/US2004/012445

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

FIG. 10

WO 2004/094471

PCT/US2004/012445

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

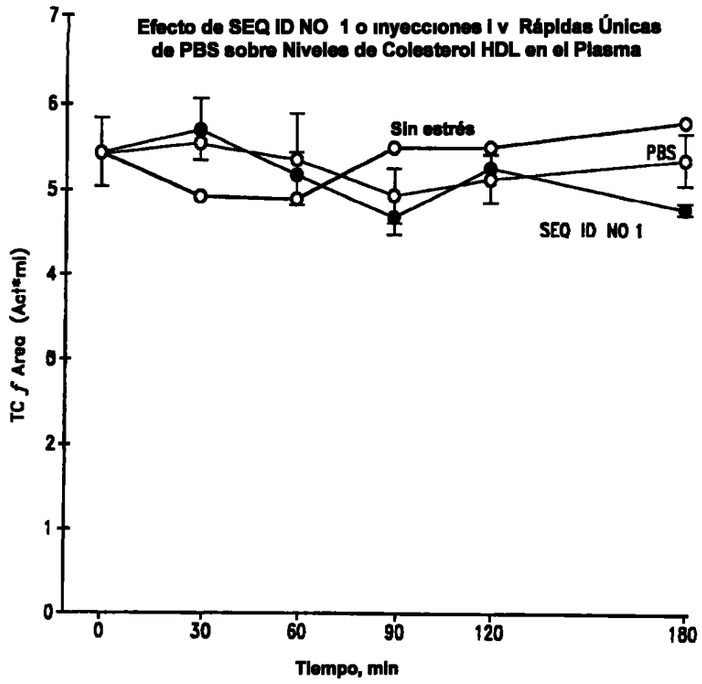


FIG. 11

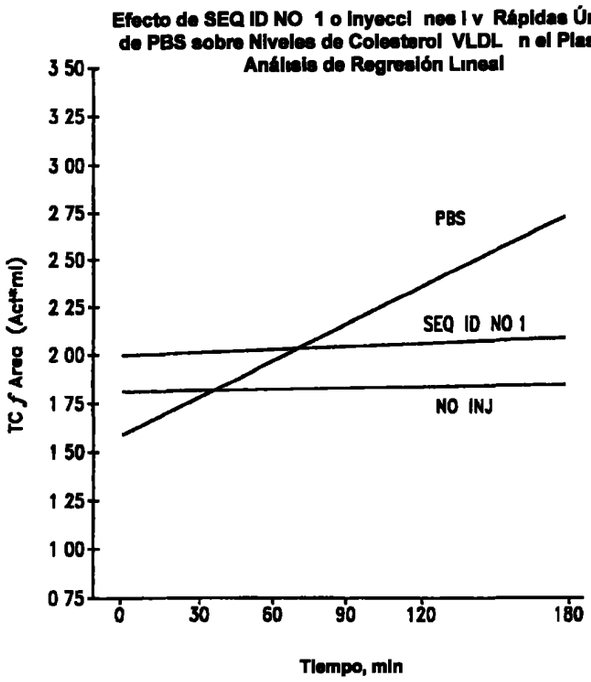


FIG. 12

WO 2004/094471

PCT/US2004/012445

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

WO 2004/094471

PCT/US2004/012445

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

Efecto de SEQ ID NO 1 Inyecciones I v Rápidas Unicas de PBS sobre Niveles de Colesterol IDL/LDL n el Plasma
Análisis de Regresión Lineal

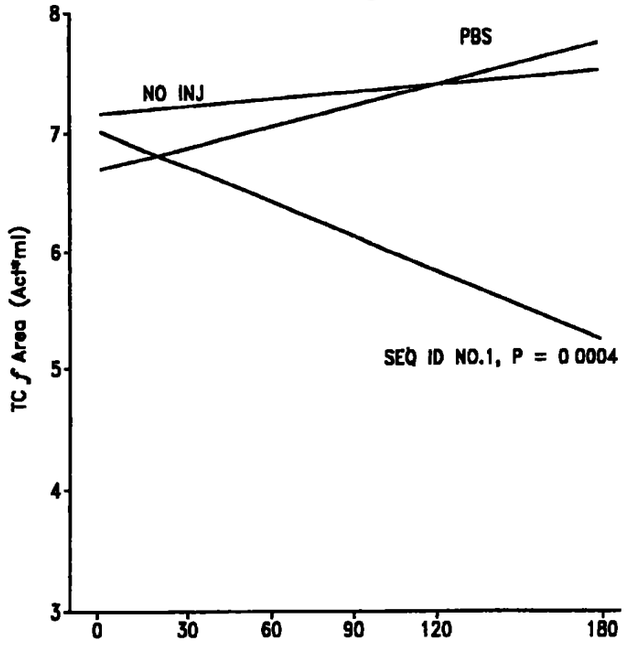


FIG. 13

WO 2004/094471

PCT/US2004/012445

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

Efecto de SEQ ID NO 1 Inyecci nes I v Rápidas Únicas de PBS sobre Niveles de Colesterol HDL en el Plasma Análisis de Regresión Lineal

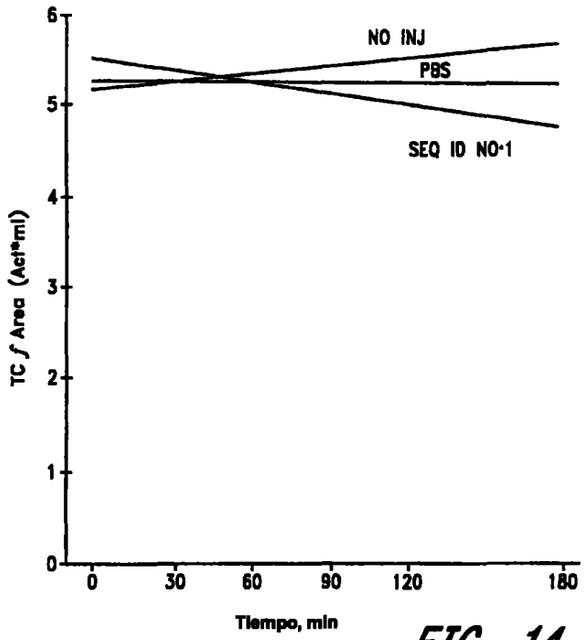


FIG. 14

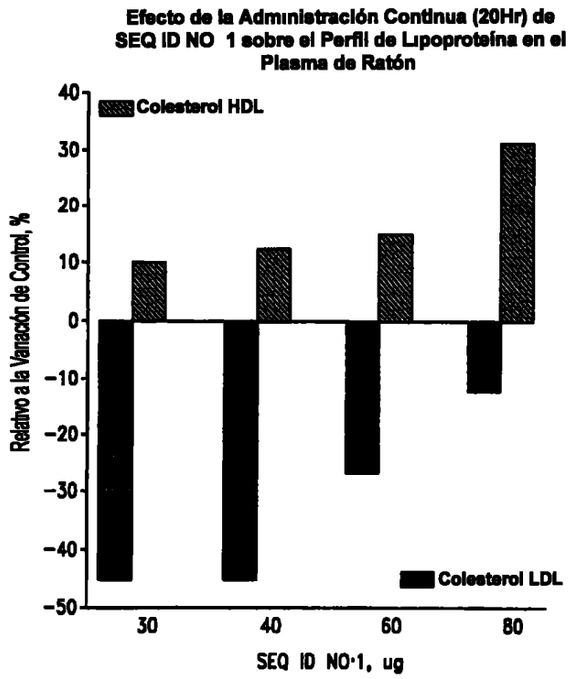

Efecto de la Administración Continua (20Hr) de SEQ ID NO 1 sobre el Perfil de Lipoproteína en el Plasma de Ratón
Colesterol HDL
Colesterol LDL
Relativo a la Variación de Control, %
40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
-50
30
40
60
80
SEQ ID NO:1, ug

FIG. 15

WO 2004/094471

PCT/US2004/012445

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

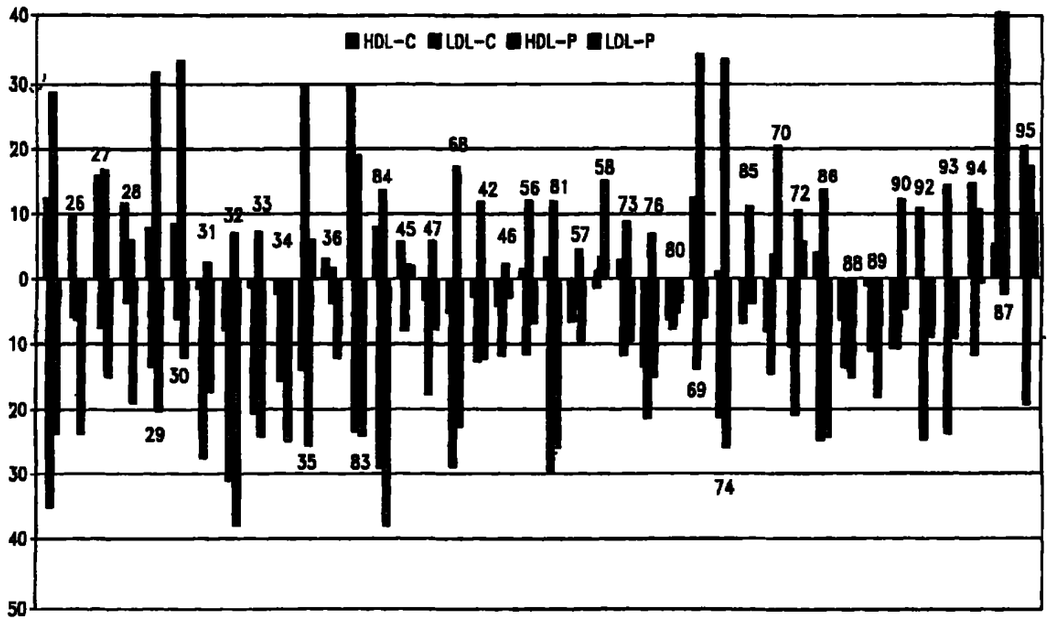


FIG. 16

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

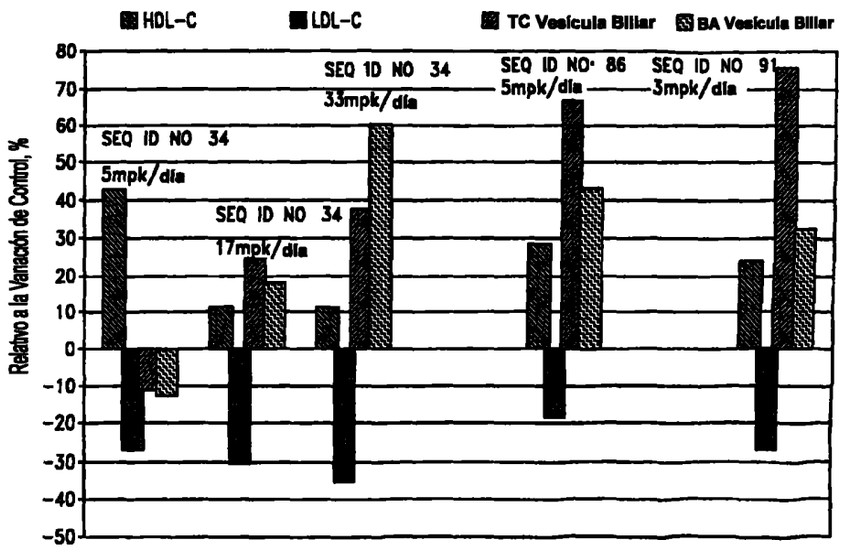


FIG. 17

WO 2004/094471

PCT/US2004/012445

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

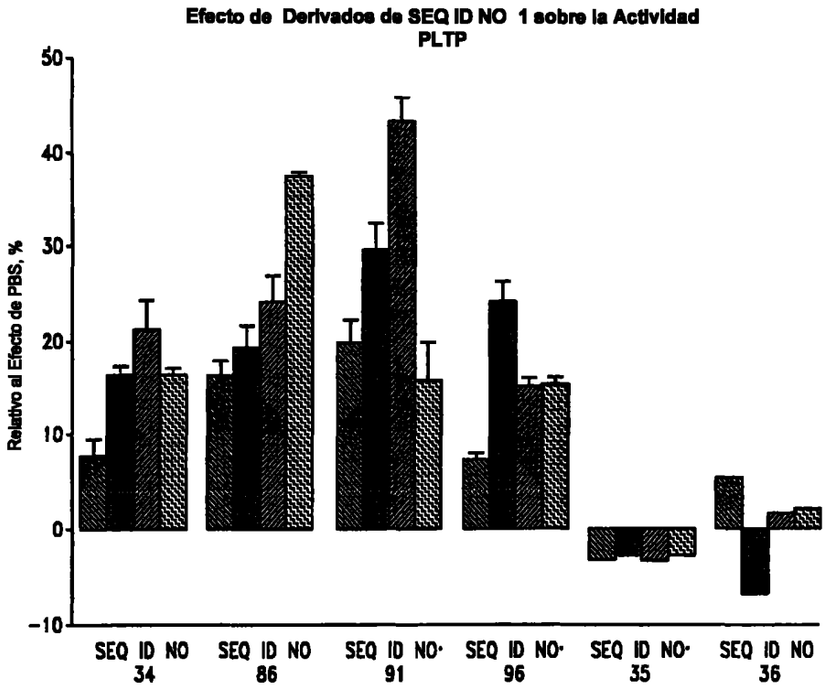


FIG. 18

WO 2004/094471

PCT/US2004/012445

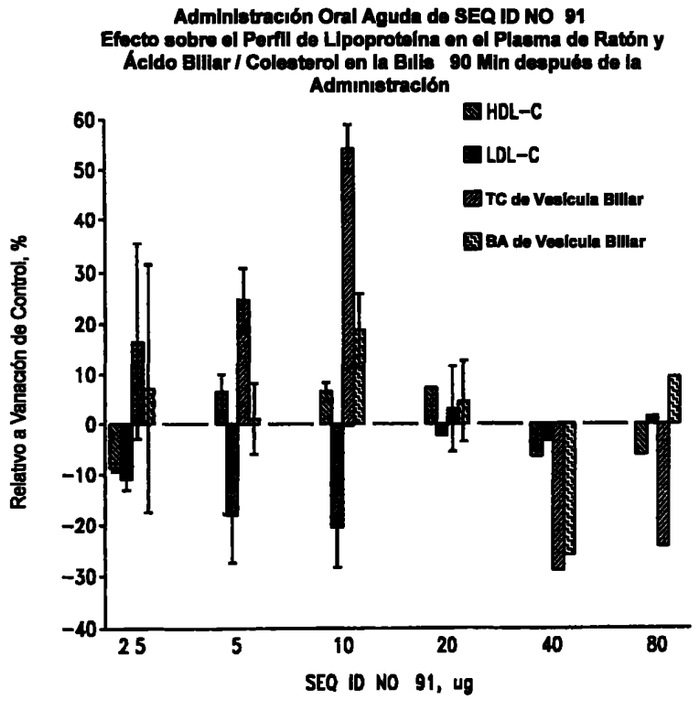


FIG. 19

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

Administración Oral Ad Lib de SEQ ID NO 91 en Ratones ApoE- / Alimentados con C mida N rmal
Efecto de TC en el Plasma (Colesterol Total)

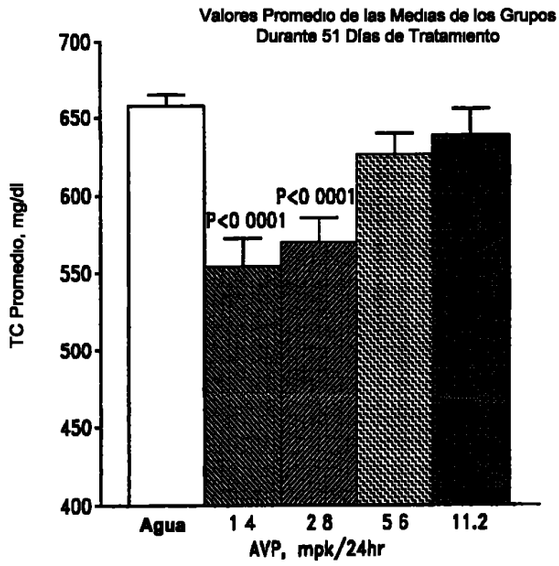


FIG. 20

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

Efecto de Compuestos SEQ ID NO. 91, 145, 146 & 118 sobre Niveles de Colesterol en el Plasma en Ratones APoE- / -. Dieta Alta en Grasa durante 9.3 Semanas

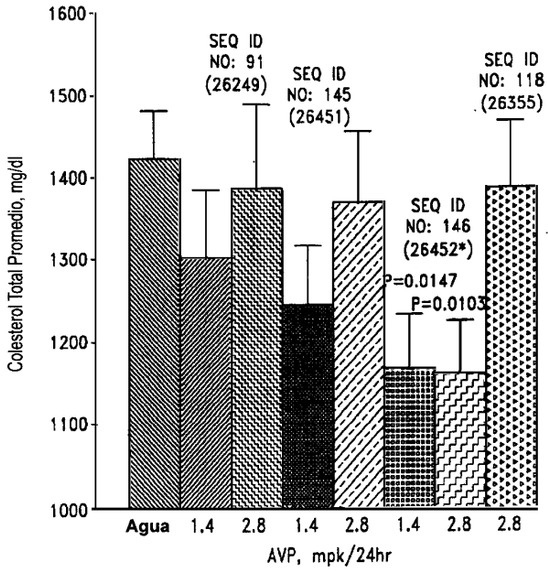


FIG. 21

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

Efecto de SEQ ID NOS: 91, 145, 146 & 118 sobre la Cantidad de Colesterol Excretado por Ratones APoE- / - durante Dieta Alta en Grasa de 16 hr.

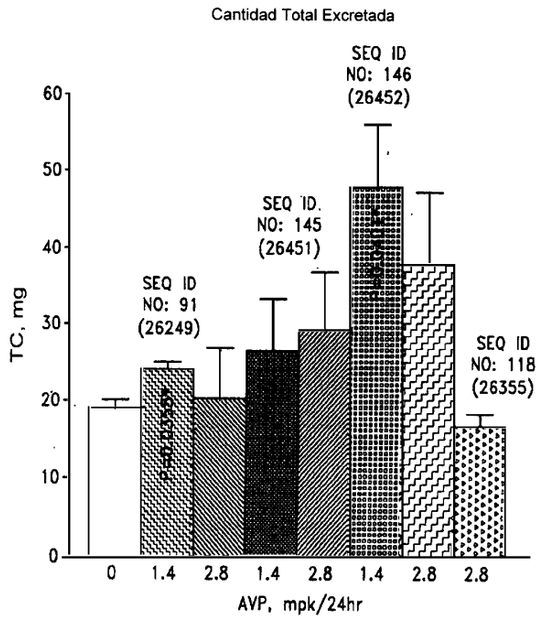


FIG. 22

WO 2004/094471

PCT/US2004/012445

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

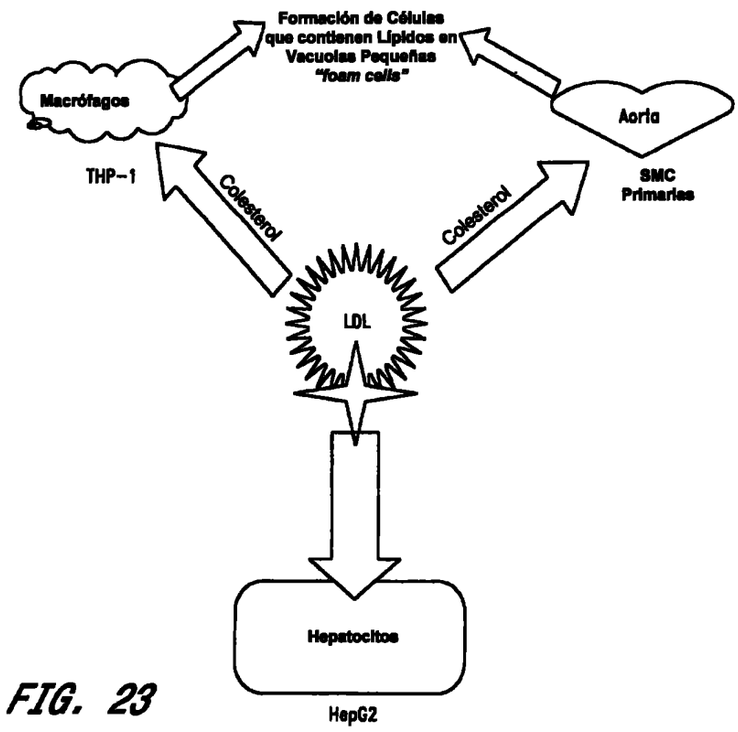


FIG. 23

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

Efecto de AVP-26249 (SEQ ID NO 91) y AVP-26452 (SEQ ID NO 146) s bre la Acumulación Mediada por LDL de Colesterol Total en células HepG2

Se Resta el Nivel TC

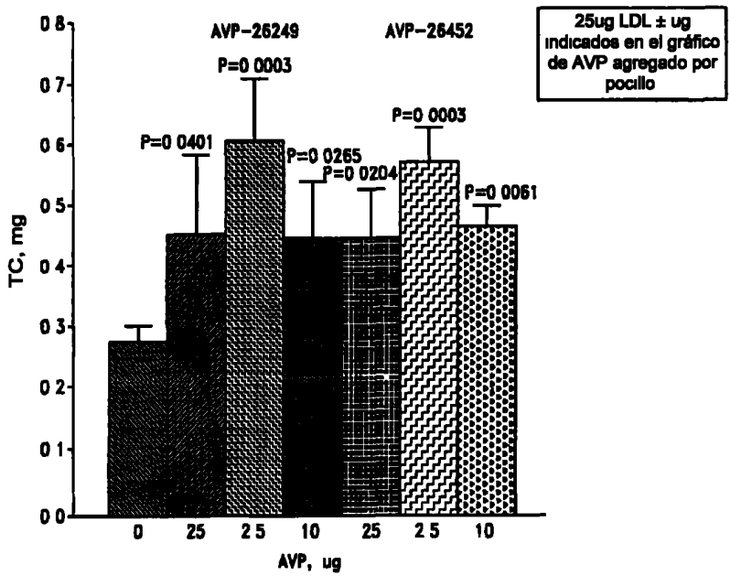


FIG. 24

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

Efecto d AVP-26249 (SEQ ID NO 91) y Acumulación Mediada por Ac-LDL de Colesteril Éster Total en Macrófagos

Se Restan el Nivel TC Basal CE

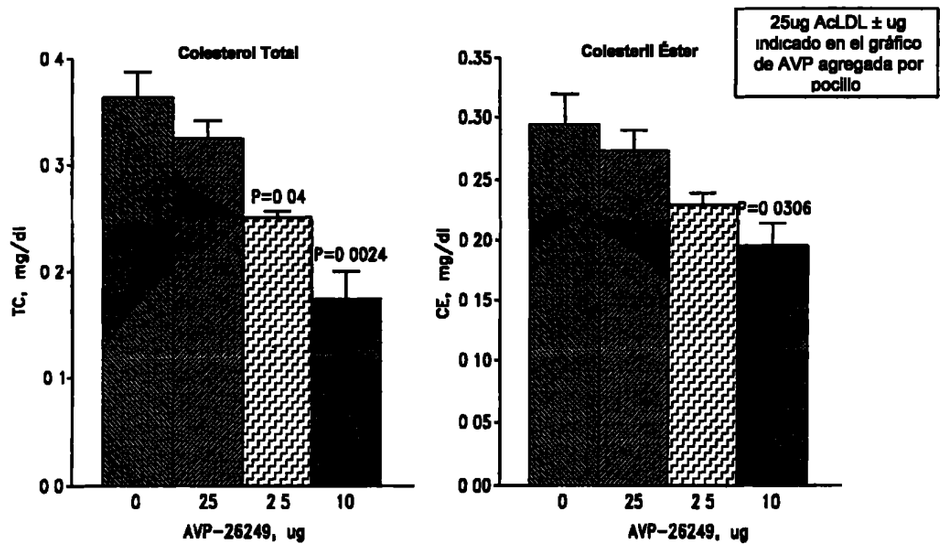


FIG. 25

WO 2004/094471

PCT/US2004/012445

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

Efecto de AVP-26249 (SEQ ID NO 91) y 26452 (SEQ ID NO 148) sobre Acumulación Mediada por Ox-LDL d l Colesterol Total y Colesteril Éster n Células de Músculo Liso Vascular

Se Restan el Nivel TC Basal y CE

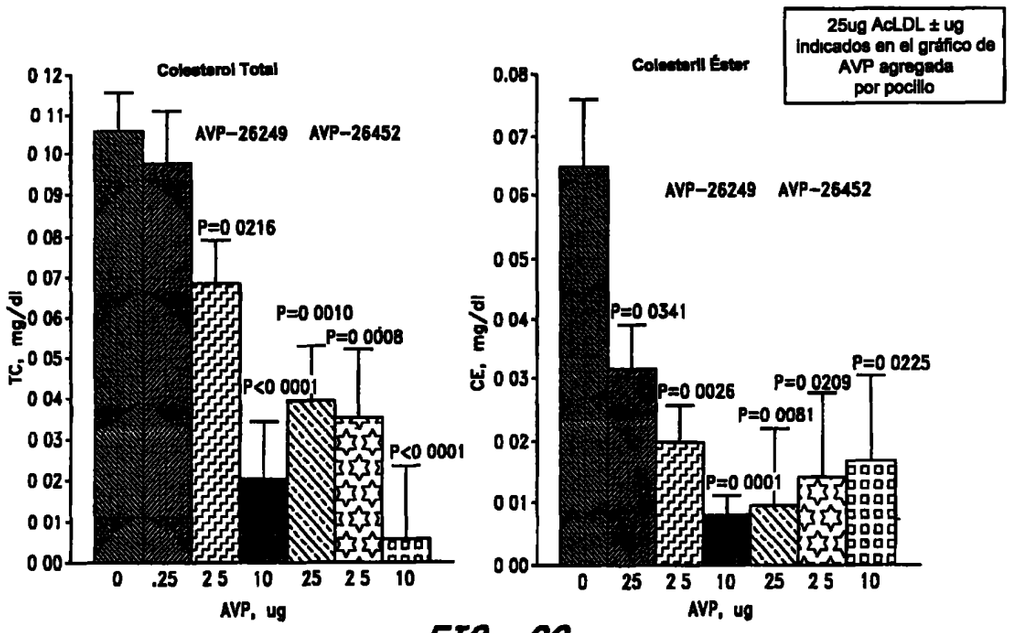


FIG. 26

WO 2004/094471

PCT/US2004/012445

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

Efecto de AVP-26249 (SEQ ID NO 91) y AVP-26452 (SEQ ID NO 146) sobre la Descarga d C lesterol de Macrófagos Cargados con AcLDL

Se Resta el Nivel TC y CE

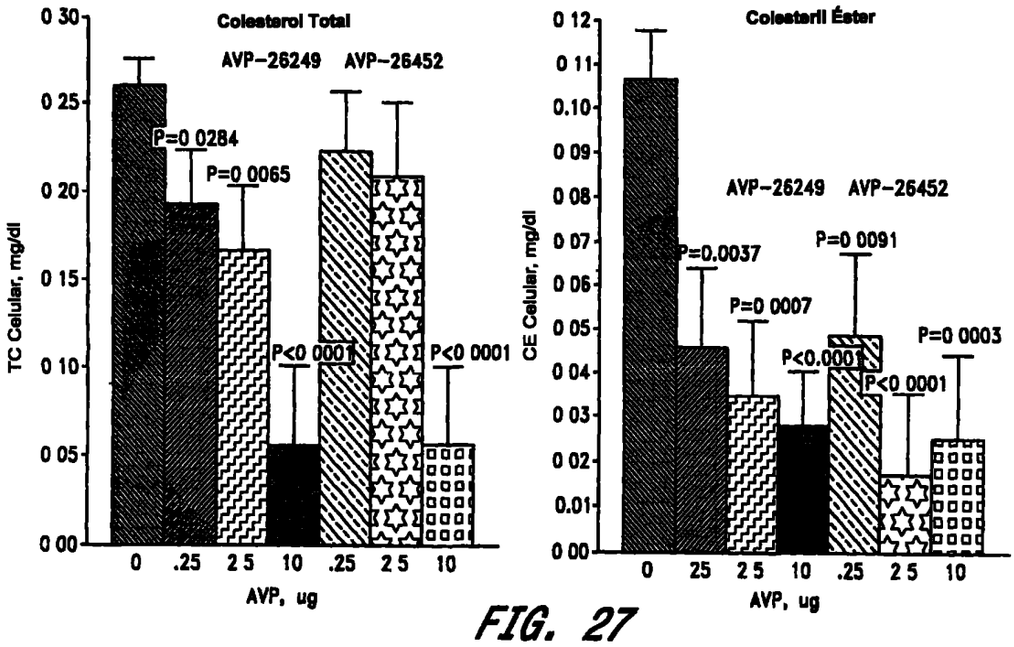


FIG. 27

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

Efecto de (SEQ ID NO 91) obre la Ev lución d Lesiones Arterioscleróticas n
Aorta de Ratones ApoE- / -
9 3 Semanas de HFD

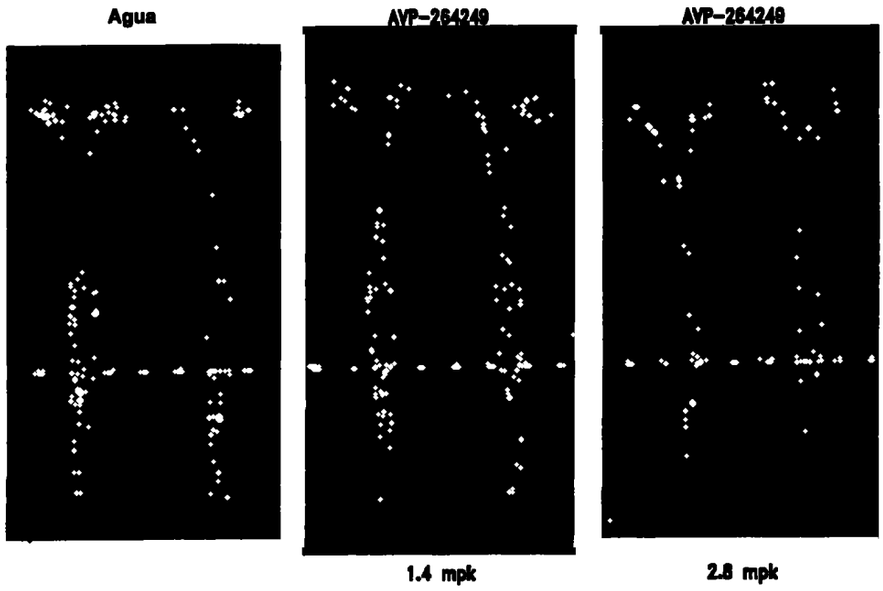


FIG. 28

Efecto de AVP-26452 (SEQ ID NO 146) sobre la Evolución de Lesiones Arterioscleróticas en la Aorta de Ratones ApoE- / -

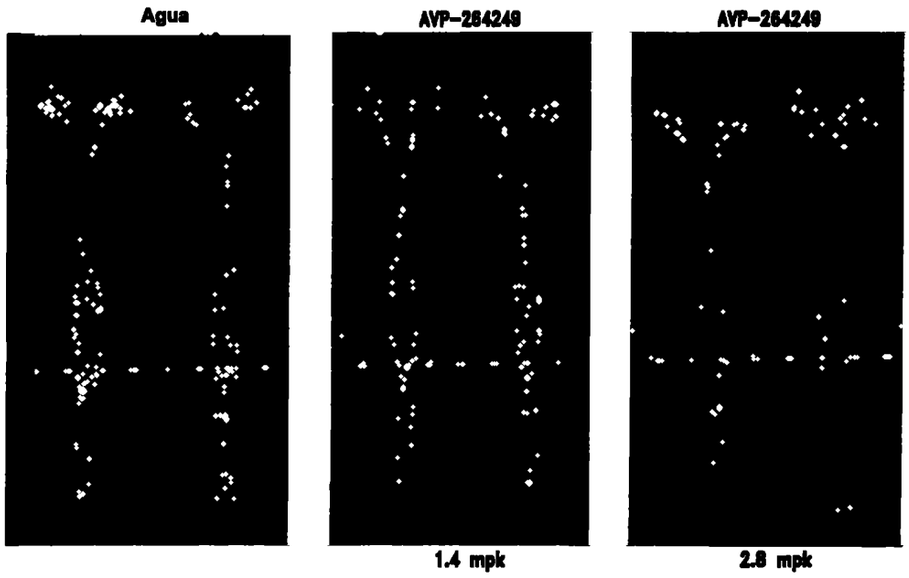


FIG. 29

WO 2004/084471
PCT/US2004/012445

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

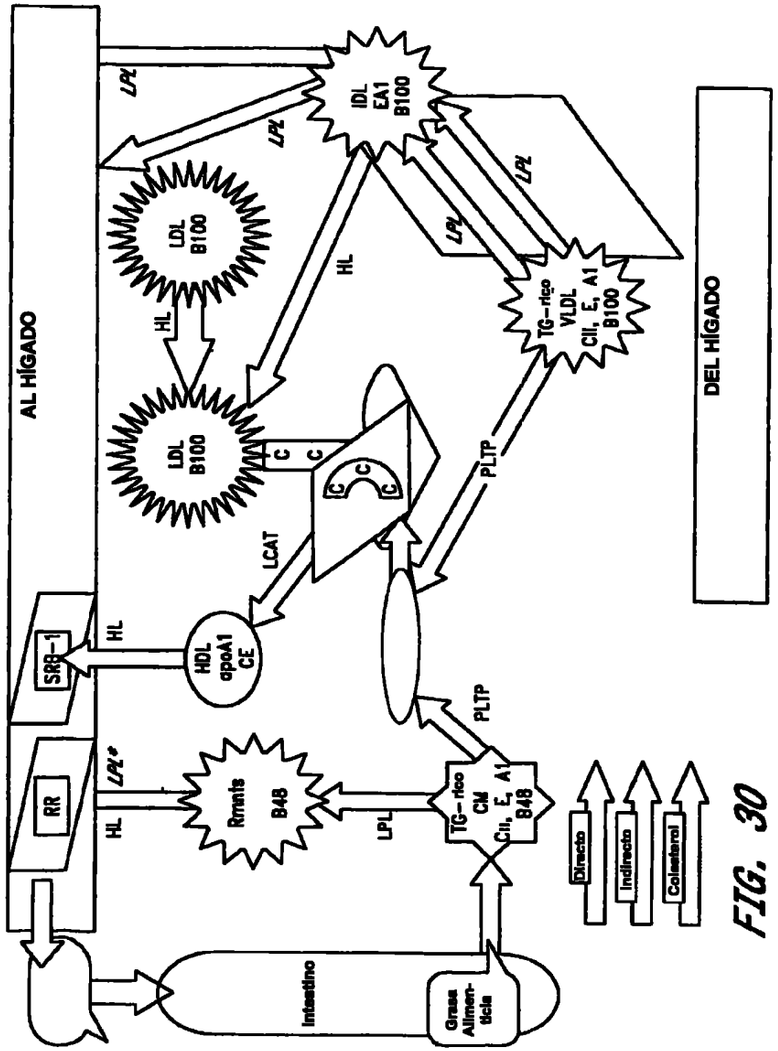

AL HÍGADO
DEL HÍGADO
IDL
EA1
B100
LPL
LDL
B100
HL
TG-rico
VLDL
CII, E, A1
B100
LDL
B100
C
PLTP
LCAT
HDL
apoA1
CE
SRB-1
RR
Rmnts
B48
TG-rico
CM
CII, E, A1
B48
Directo
Indirecto
Colesterol
Intestino
Grasas
Alimen-
ticia

FIG. 30

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

3/PCT
339

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
AVANIR.096VP		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US2004/012445	22/04/2004	22/04/2003
Applicant		
AVANIR PHARMACEUTICALS		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 13 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**
   a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
      ☐ The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).
   b. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box II).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box III).

4. With regard to the title,
   ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
   ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,
   ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
   ☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,
   a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
      ☐ as suggested by the applicant.
      ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
      ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
   b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/012445

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. type of material

   - [x] a sequence listing
   - [ ] table(s) related to the sequence listing

   b. format of material

   - [x] in written format
   - [x] in computer readable form

   c. time of filing/furnishing

   - [x] contained in the international application as filed
   - [x] filed together with the international application in computer readable form
   - [ ] furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/012445

344
341

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K14/775 C07K5/065 C07K5/087 C07K5/09 C07K5/093
C07K5/11 C07K5/107 C07K5/113 C07K7/04 A61K38/17
A61K38/05 A61K38/06 A61K38/07 A61K38/08 G01N33/92

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, CHEM ABS Data, Sequence Search, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/16408 A (BUTTNER KLAUS ; CORNUT ISABELLE (DE); METZ GUNTHER (DE); SEKUL RENATE) 8 April 1999 (1999-04-08)	1-9, 22-24
Y	page 51; page 1 - page 7; claims 1,15,37,40-51; sequences 75,94,109,213	11,13
X	WO 02/38609 A (GRAVERSEN JONAS ; MOESTRUP SOEREN (DK); PROTEOPHARMA APS (DK)) 16 May 2002 (2002-05-16)	1-9, 22-24
Y	claims 1,17,94,102-111; figure 2a	11,13
X	WO 02/083917 A (AGENSYS INC) 24 October 2002 (2002-10-24) page 28; claims 1,3,13; tables V,VII-IX,XI-XIII,XV,XVII; sequences 2,36,49,60,82,84,91,125,135,137,219,1787	1-9,12, 22-24

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
6 October 2004	26 04 2005

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Schmidt, Harald

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

International Application No
PCT/US2004/012445

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BANKA CL ET AL.: "Localization of an Apolipoprotein A-I Epitope Critical for Activation of Lecithin-Cholesterol Acyltransferase" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 266, no. 35, 15 December 1991 (1991-12-15), pages 23886-23892, XP002299434 abstract, Figure 6 -----	
A	EP 0 162 414 A (RESEARCH CORP) 27 November 1985 (1985-11-27) claims 1-10 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US2004/012445

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9916408 A	08-04-1999	US 6037323 A	14-03-2000
		AU 747823 B2	23-05-2002
		AU 9779198 A	23-04-1999
		CA 2304931 A1	08-04-1999
		CN 1345245 A	17-04-2002
		EP 1019010 A1	19-07-2000
		HU 0003280 A2	29-01-2001
		JP 2003525840 T	02-09-2003
		NO 20001600 A	03-05-2000
		NZ 503719 A	27-09-2002
		PL 362598 A1	02-11-2004
		RU 2219941 C2	27-12-2003
		WO 9916408 A2	08-04-1999
		US 6265377 B1	24-07-2001
		US 2004198662 A1	07-10-2004
		US 2003008827 A1	09-01-2003
WO 0238609 A	16-05-2002	AU 1384302 A	21-05-2002
		AU 2002213843 A2	21-05-2002
		BR 0115257 A	12-08-2003
		CA 2428114 A1	16-05-2002
		CN 1486327 A	31-03-2004
		WO 0238609 A2	16-05-2002
		EP 1335938 A2	20-08-2003
		JP 2004522424 T	29-07-2004
		NO 20032101 A	08-07-2003
		US 2002156007 A1	24-10-2002
		ZA 200304486 A	09-09-2004
WO 02083917 A	24-10-2002	CA 2440461 A1	24-10-2002
		CA 2442993 A1	24-10-2002
		CA 2443123 A1	24-10-2002
		CA 2443141 A1	24-10-2002
		EP 1383922 A2	28-01-2004
		EP 1409710 A1	21-04-2004
		WO 02083928 A2	24-10-2002
		WO 02083916 A2	24-10-2002
		WO 02083917 A2	24-10-2002
		WO 02083920 A2	24-10-2002
		WO 02083921 A2	24-10-2002
		US 2004003418 A1	01-01-2004
		US 2003229904 A1	11-12-2003
		US 2004010811 A1	15-01-2004
		US 2003109470 A1	12-06-2003
		CA 2443088 A1	24-10-2002
		CA 2443147 A1	24-10-2002
		EP 1434592 A1	07-07-2004
		WO 02083068 A2	24-10-2002
		WO 02083919 A2	24-10-2002
		WO 02083860 A2	24-10-2002
		US 2004018189 A1	29-01-2004
		US 2004062761 A1	01-04-2004
EP 0162414 A	27-11-1985	US 4643988 A	17-02-1987
		CA 1258229 A1	08-08-1989
		EP 0162414 A2	27-11-1985
		JP 61126099 A	13-06-1986

344

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/012445

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

13 (completely) and 1-9,11,12,22-24 (all partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 13 (completely) and 1-9,11,12,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NOs 1-3,9-12,16,22-26,29,31,32,44,45,55,71,73-80,87 and compositions comprising them

1.1. claims: 13 (completely) and 1-9,11,12 (partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO: 1 and compositions comprising them

1.2. claims: 1-9,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO: 2 and compositions comprising them

1.3. claims: 1-9,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO: 3 and compositions comprising them

1.4. claims: 1-9,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO: 9 and compositions comprising them

1.5. claims: 1-9,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO: 10 and compositions comprising them

1.6. claims: 1-9,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO: 11 and compositions comprising them

1.7. claims: 1-9,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO: 12 and compositions comprising them

1.8. claims: 1-9,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO: 16 and compositions comprising them

1.9. claims: 1-9,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO:22 and compositions comprising them

1.10. claims: 1-9,22-24 (all partially)

International Application No. PCT/ US2004/ 012445

peptide mediators comprising SEQ ID NO: 23 and compositions comprising them

1.11. claims: 1-9,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO: 24 and compositions comprising them

1.12. claims: 1-9,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO: 25 and compositions comprising them

1.13. claims: 1-9,12,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO: 26 and compositions comprising them

1.14. claims: 1-9,12,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO: 29 and compositions comprising them

1.15. claims: 1-9,12,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO: 31 and compositions comprising them

1.16. claims: 1-9,12,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO: 32 and compositions comprising them

1.17. claims: 1-9,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO: 44 and compositions comprising them

1.18. claims: 1-9,12,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO: 45 and compositions comprising them

1.19. claims: 1-9,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO: 55 and compositions comprising them

1.20. claims: 1-9,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO: 71 and compositions comprising them

1.21. claims: 1-9,12,22-24 (all partially)

International Application No. PCT/ US2004/ 012445

peptide mediators comprising SEQ ID NO: 73 and compositions comprising them

1.22. claims: 1-9,12,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO: 74 and compositions comprising them

1.23. claims: 1-9,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO: 75 and compositions comprising them

1.24. claims: 1-9,12,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO: 76 and compositions comprising them

1.25. claims: 1-9,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO: 77 and compositions comprising them

1.26. claims: 1-9,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO: 78 and compositions comprising them

1.27. claims: 1-9,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO: 79 and compositions comprising them

1.28. claims: 1-9,12,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO: 80 and compositions comprising them

1.29. claims: 1-9,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO: 87 and compositions comprising them

---

2. claims: 1-9,12,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NOs 4,5,27,28,35-42,51,53,54,59-61,64 and compositions comprising them

---

3. claims: 1-9,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NOs 6-8,15 and compositions comprising them

---

4. claims: 1-9,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NOs 13,14 and compositions comprising them

---

5. claims: 1-9,11,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NOs 17,21,108 and compositions comprising them

---

6. claims: 1-9,11,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NOs 18,110 and compositions comprising them

---

7. claims: 1-9,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO 19 and compositions comprising them

---

8. claims: 1-9,11,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NOs 20,113 and compositions comprising them

---

9. claims: 1-9,12,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NOs 30,43,46-50,52,62,63, and compositions comprising them

---

10. claims: 1-9,12,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO 33 and compositions comprising them

---

11. claims: 15,17-20 (completely) and 1-10,12,22-24 (partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NOs 34,83,89,90-94,96-101,104-106,120,122,125,126,128,137, 141,145-147,150, 176 and compounds nos. 1,3-9,11-13,16,18,20-22,31,35,39-41,83-86,93,94 and compositions comprising them

---

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

12. claims: 1-9,12,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NOs 56-58 and compositions comprising them

---

13. claims: 1-9,12,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NOs 65-67,72 and compositions comprising them

---

14. claims: 1-9,12,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO 68 and compositions comprising them

---

15. claims: 1-9,12,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NOs 69,70, and compositions comprising them

---

16. claims: 1-9,12,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NOs 82,84,85 and compositions comprising them

---

17. claims: 16,21 (completely) and 1-10,22-24 (partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NOs 86,102,103,118,121,123,124,136,140,151 and compounds nos. 2,10,14,17,19,30,34,81,82 and compositions comprising them

---

18. claims: 1-9,12,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO 88 and compositions comprising them

---

19. claims: 1-10,12,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NOs 95,119,153,165,172,174,175 and compounds nos. 15,42, and compositions comprising them

---

20. claims: 1-9,11,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO 107 and compositions comprising them

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

---

21. claims: 1-9,11,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO 108 and compositions comprising them

---

22. claims: 1-9,11,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO 109 and compositions comprising them

---

23. claims: 1-9,11,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO 111 and compositions comprising them

---

24. claims: 1-9,11,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO 112 and compositions comprising them

---

25. claims: 1-9,11,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO 114 and compositions comprising them

---

26. claims: 1-9,11,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO 115 and compositions comprising them

---

27. claims: 1-9,11,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO 116 and compositions comprising them

---

28. claims: 1-9,11,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO 117 and compositions comprising them

---

29. claims: 1-9,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO 127 and compositions comprising them

---

30. claims: 1-10,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NOs 129-134 and compounds nos. 23-28 and compositions comprising them

---

31. claims: 1-10,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NOs 135,138,139,142,143,149,152 and compounds nos. 29,32,33,36,37, and compositions comprising them

---

32. claims: 1-9,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NOs 144,163 and compositions comprising them

---

33. claims: 1-9,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NOs 154,159,162,164,166,168-171,173 and compositions comprising them

---

34. claims: 1-9,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NOs 155-158,160,161 and compositions comprising them

---

35. claims: 1-9,22-24 (all partially)

peptide mediators comprising SEQ ID NO 167 and compositions comprising them

---

36. claims: 1-9,12,22-24 (all partially)

compounds nos. 87,88,91,92 and compositions comprising them

---

37. claims: 1-9,12,22-24 (all partially)

compound nos. 89,90 and compositions comprising them

---

38. claims: 1-9,12,22-24 (all partially)

compound nos. 95,96 and compositions comprising them

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing *(day/month/year)* see form PCT/ISA/210 (second sheet)	
Applicant's or agent's file reference see form PCT/ISA/220	**FOR FURTHER ACTION** See paragraph 2 below

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2004/012445	22.04.2004	22.04.2003

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
C07K14/775, C07K5/065, C07K5/087, C07K5/09, C07K5/093, C07K5/11, C07K5/107, C07K5/113, C07K7/04,

Applicant
AVANIR PHARMACEUTICALS

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:	Authorized Officer
European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016	Schmidt, Harald Telephone No. +31 70 340-4023

Form PCT/ISA/237 (Cover Sheet) (January 2004)

353

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2004/012445

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

   ☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).

2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

   a. type of material:

   ☒ a sequence listing

   ☐ table(s) related to the sequence listing

   b. format of material:

   ☒ in written format

   ☒ in computer readable form

   c. time of filing/furnishing:

   ☒ contained in the international application as filed.

   ☒ filed together with the international application in computer readable form.

   ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

4. Additional comments:

WRITTEN OPINION F THE INTERNATI NAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2004/012445

Box No. II Priority

1. ☒ The following document has not been furnished:

   ☒ copy of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 43*bis*.1 and 66.7(a)).

   ☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 43*bis*.1 and 66.7(b)).

   Consequently it has not been possible to consider the validity of the priority claim. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date is the claimed priority date.

2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43*bis*.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. ☐ It has not been possible to consider the validity of the priority claim because a copy of the priority document was not available to the ISA at the time that the search was conducted (Rule 17.1). This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date is the claimed priority date.

4. Additional observations, if necessary:

WRITTEN PINI N OF THE INTERNATI NAL SEARCHING AUTH RITY

International application No.
PCT/US2004/012445

Box No. II Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 10,14-21,25-30 (completely) and 1-9,11,12,22-24 (partially)

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination *(specify)*:

☐ the description, claims or drawings *(indicate particular elements below)* or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 10,14-21,25-30 (completely) and 1-9,11,12,22-24 (partially)

☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:

the written form ☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

the computer readable form ☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions.

☐ See separate sheet for further details

WRITTEN PINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2004/012445

Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	11,13
	No:	Claims	1-9,12,22-24
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	11,13
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-9,11-13,22-24
	No:	Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Re item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

An international search was performed for the first group of inventions only (for reasoning and groups of inventions see "invitation to pay additional fees"). Consequently, the examination is also restricted to the first group of invention, i.e. subject-matter of claims 1-9,11-13 and 22-24 relating to SEQ ID NOS 1-3,9-12,16,22-26,29,31,32,44,45,55,71,73-80 and 87 (Rule 66.1(e) PCT).

Re item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Reference is made to the following documents:

D1: WO 99/16408 A (BUTTNER KLAUS ; CORNUT ISABELLE (DE); METZ GUNTHER (DE); SEKUL RENATE) 8 April 1999 (1999-04-08)
D2: WO 02/38609 A (GRAVERSEN JONAS ; MOESTRUP SOEREN (DK); PROTEOPHARMA APS (DK)) 16 May 2002 (2002-05-16)
D3: WO 02/083917 A (AGENSYS INC) 24 October 2002 (2002-10-24)

Novelty

The document D1 discloses several oligopeptides derived from apolipoprotein A-I comprising the amino acid motif EFR. It is further taught that the N-terminus can be blocked by groups including acetyl, formyl or dansyl and the C-terminus may be an amide. Such compounds are useful as mediators of reverse cholesterol transport and are thus suitable for treating disorders associated with dyslipoproteinemia, e.g. hypercholesterolemia or atherosclerosis.
(see pages 1-7, 51, SEQ ID NOS 75,94,109,213 and claims 1,15,37,40-51).
Therefore, subject-matter of claims 1-9 and 22-24 does not meet the requirements of Article 33(2) PCT.

The document D2 discloses compounds comprising murine apolipoprotein A-I that contain inter alia SEQ ID Nos 2,3,9-12,16,25 and 26 of the present application. It is further taught that the amino acids of the apolipoproteins may be modified. The compounds are useful for treating cardiovascular diseases.
Therefore, subject-matter of claims 1-9 and 22-24 are not new in the sense of Article 33(2) PCT.

The document D3 discloses peptides for treatment of cancer comprising SEQ ID NO:32 of the current application. It is further taught that the peptides may be modified N- and/or C-terminally (see page 28, Tables V,VII-IX,XI-XIII, XV,XVII and claims 1,3, and 13).
Therefore, subject-matter of claims 1-9,12 and 22-24 does not fulfil the requirements of Article 33(2) PCT.

Inventive step

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 11 and 13 does not involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.
The document D1 is regarded as being the closest prior art to the subject-matter of claims 11 and 13 and discloses several oligopeptides derived from apolipoprotein A-I comprising the amino acid motif EFR. It is further taught that the N-terminus can be blocked by groups including acetyl, formyl or dansyl and the C-terminus may be an amide. Such compounds are useful as mediators of reverse cholesterol transport and are thus suitable for treating disorders associated with dyslipoproteinemia, e.g. hypercholesterolemia or atherosclerosis.
(see pages 1-7, 51, SEQ ID Nos 75,94,109,213 and claims 1,15,37,40-51).
The subject-matter of claims 11 and 13 therefore differs from this known D1 in that different peptides derived from apolipoprotein A-I are used.

The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as providing further mediators of reverse cholesterol transport for treating disorders associated with dyslipoproteinemia, e.g. hypercholesterolemia or atherosclerosis.

The solution proposed in claims 11 and 13 of the present application cannot be considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT), since it appears a routine

choice for the skilled person to select apolipoprotein I-A analogues of claims 11 and 13 to solve the problem posed, particularly with view to the document D2 disclosing a compound that comprises the sequence EFRDRDRMRTH for treating disorders associated with dyslipoproteinemia, e.g. hypercholesterolemia or atherosclerosis.

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form - PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.150)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	AVANIR.096VP
I	Title of Invention	MEDIATORS OF REVERSE CHOLESTEROL TRANSPORT FOR THE TREATMENT OF HYPERCHOLESTEROLEMIA
II	Applicant	
II-1	This person is:	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name:	AVANIR PHARMACEUTICALS
II-5	Address:	11388 Sorrento Valley Road Suite 200 San Diego, California 92121 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
III-1	Applicant and/or Inventor	
III-1-1	This person is:	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	SIRCAR, Jagadish, C.
III-1-5	Address:	4832 Riding Ridge Road San Diego, California 92130 United States of America
III-1-6	State of nationality	US
III-1-7	State of residence	US

III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is:	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	ALISALA, Kashinatham
III-2-5	Address:	11846 Scripps Creek Drive, #C San Diego, California 92131 United States of America
III-2-6	State of nationality	IN
III-2-7	State of residence	US
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is:	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	NIKOULIN, Igor
III-3-5	Address:	3845 Elijah Court, #635 San Diego, California 92130 United States of America
III-3-6	State of nationality	RU
III-3-7	State of residence	US
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	ALTMAN, Daniel, E.
IV-1-2	Address:	2040 Main Street Fourteenth Floor Irvine, California 92614 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	949-760-0404
IV-1-4	Facsimile No.	949-760-9502
IV-1-5	e-mail	daltman@kmob.com
IV-1-6	Agent's registration No.	34,115
V	DESIGNATIONS	
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.	

361 362

VI-1	Priority claim of earlier national application		
VI-1-1	Filing date	22 April 2003 (22.04.2003)	
VI-1-2	Number	60/464,667	
VI-1-3	Country	US	
VI-3	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1	
VII-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)	
VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	
IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	4	-
IX-2	Description (excluding sequence listing part)	88	-
IX-3	Claims	4	-
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	30	-
IX-7a	Sub-total number of sheets	127	
IX-8a	Sequence listing part of description filed in computer readable form in addition to being filed in paper form (under Section 801(a)(i))	58	-
IX-7	TOTAL	185	

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-11	Copy of general power of attorney	reference no. AVANIR	-
IX-16(A)	Sequence listing in computer readable form:		
IX-16(A)-(i)	copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application)	-	
IX-17	PCT-SAFE physical media	-	✓
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract		
IX-20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative	Daniel Altman	
X-1-1	Name:	ALTMAN, Daniel, E.	
X-1-2	Name of signatory		
X-1-3	Capacity		

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	

AVANIR.096VP

364

PCT (ANNEX - FEE CALCULATION SHEET)

Original (for SUBMISSION)

(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	Date stamp of the receiving Office	

0-4	Form PCT/RO/101 (Annex) PCT Fee Calculation Sheet				
0-4-1	Prepared Using		PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.150)		
0-6	Applicant's or agent's file reference		AVANIR.096VP		
2	Applicant		AVANIR PHARMACEUTICALS		
12	Calculation of prescribed fees		fee amount/multiplier	Total amounts (USD)	
12-1	Transmittal fee	T	⇨	300	
12-2-1	Search fee	S	⇨	1818	
12-2-2	International search to be carried out by		EP		
12-3	International filing fee (first 30 sheets)	H	1035		
12-4	Remaining sheets		155		
12-5	Additional amount	(x)	11		
12-6	Total additional amount	R	1705		
12-7	H + R =	I	2740		
12-12	EASY Filing reduction	R	-74		
12-13	Total international filing fee (I-R)	I	⇨	2666	
12-14	Fee for priority document				
	Number of priority documents requested		1		
12-15	Fee per document	(x)	20		
12-16	Total priority document fee:	P	⇨	20	
12-17	TOTAL FEES PAYABLE (T+S+I+P)		⇨	4804	
12-19	Mode of payment		cheque		
12-20	Deposit account instructions				
	The receiving Office		United States Patent and Trademark Office (USPTO). (RO/US)		
12-20-2	Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above.		✓		
12-21	Deposit account No.		11-1410		
12-22	Date		22 April 2004 (22.04.2004)		
12-23	Name and signature		ALTMAN, Daniel E.		

Daniel Altman

AVANIR.096VPC
PCT/US2004/012445

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

ALTMAN, Daniel, E.
2040 Main Street
Fourteenth Floor
Irvine, California 92614
United States of America

Date of mailing (day/month/year) 20 September 2004 (20.09.2004)	
Applicant's or agent's file reference AVANIR.096VP	**IMPORTANT NOTIFICATION**
International application No. PCT/US2004/012445	International filing date (day/month/year) 22 April 2004 (22.04.2004)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 22 April 2003 (22.04.2003)
Applicant AVANIR PHARMACEUTICALS et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

3. (If applicable) An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
22 April 2003 (22.04.2003)	60/464,667	US	09 August 2004 (09.08.2004)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland
Facsimile No. (41-22) 338.90.90

Authorized officer
Elisabeth SASON (Fax 338 9090)
Telephone No. (41-22) 338 9915

366
369

SUPERINTENDENCIA I COMERCIO
Radicacion : 05117186 00000000 Folios 368
Fecha (AMD): 2005-11 18 15:37:51
Tramite : 011 PCT-PATENTE 370 FASE NAL 411 PRESENTAL
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCIÓN **MODELO DE UTILIDAD**	( )	( )
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente	( )	( )
- Datos de identificacion del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	( )	( )
- Descripcion de la invención.	( )	( )
- Dibujos de ser estos pertinentes.	( )	( )
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.		
COMPLETA ( ) INCOMPLETA	( )	( )
DISEÑO INDUSTRIAL ( )		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	( )	( )
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta	( )	( )
- la solicitud		
- Representacion gráfica o fotografica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño	( )	( )
Comprobante de pago de las tasas establecidas	( )	( )
COMPLETA ( ) INCOMPLETA	( )	( )
ESQUEMA DE TRAZADO ( )		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado	( )	( )
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud	( )	( )
Representación gráfica del esquema de trazado	( )	( )
Comprobante de pago de las tasas establecidas	( )	( )
COMPLETA ( ) INCOMPLETA	( )	( )

Firma Responsable 18 NOV-05

Fecha