



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 71552

(13) C2

(51) 7 A61K38/00,38/16

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД(54) АГОНІСТ АПОЛІПОПРОТЕЇНУ А-I (АРО А-I), МУЛЬТИМІРНИЙ АРО А-I (ВАРІАНТИ) ТА ЇХ ЗАСТОСУ-
ВАННЯ В ЛІКУВАННІ ДИСЛІПІДЕМІЧНИХ ПОРУШЕНЬ

1

2

(21) 2000042494

(22) 28.09.1998

(24) 15.12.2004

(86) PCT/US98/20326, 28.09.1998

(31) 08/940,096

(32) 29.09.1997

(33) US

(46) 15.12.2004, Бюл. № 12, 2004 р.

(72) Дассе Жан-Луї, US, Зекуль Ренате, DE, Бутт-
нер Клаус, DE, Корню Ізабелль, DE, Метц Гунтер,
DE(73) Дассе Жан-Луї, US, Зекуль Ренате, DE, Бутт-
нер Клаус, DE, Корню Ізабелль, DE, Метц Гунтер,
DE

(56) WO A1 9605227, 22.02.1996

CORNUT I. et al. Application to the novo design of
ideally amphipathic Leu, Lys peptides with hemolytic
activity higher than that melittin. FEBS Letters, 1994,
v.349. p.29-33NASHAR T. et. al. Cross-linking of cell surface
ganglioside GM1 induced the selective apoptosis of
mature CD8+ T lymphocytes. J. Immunology, 1996,
Vol. 8, No. 5, pages 731-736(57) 1. Агоніст аполіпопротеїну А-I (АроА-I), що
включає(i) 15 - 29 членний пептид або аналог пептиду,
який утворює амфіпатичну α -спіраль в присутності
ліпідів, і який включає структурну формулу (I)
$$Z_1-X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-X_{19}-X_{20}-X_{21}-X_{22}-X_{23}-Z_2$$
 (I)або його фармацевтичну прийнятну сіль, де
 X_1 являє собою Pro (P), Ala (A), Gly (G), Gln (Q),
Asn (N), Asp (D) або D-Pro (p); X_2 являє собою аліфатичний залишок; X_3 являє собою Leu (L) або Phe (F); X_4 являє собою Glu (E); X_5 являє собою аліфатичний залишок; X_6 являє собою Leu (L) або Phe (F); X_7 являє собою Leu (L) або Glu (E); X_8 являє собою Asn (N) або Gln (Q); X_9 являє собою Leu (L); X_{10} являє собою Leu (L), Trp (W) або Gly (G); X_{11} являє собою кислий залишок; X_{12} являє собою Arg (R); X_{13} являє собою Leu (L) або Gly (G); X_{14} являє собою Leu (L), Phe (F) або Gly (G); X_{15} являє собою Asp (D); X_{16} являє собою Ala (A); X_{17} являє собою Leu (L); X_{18} являє собою Asn (N) або Gln (Q); X_{19} являє собою основний залишок; X_{20} являє собою основний залишок; X_{21} являє собою Leu (L); X_{22} являє собою основний залишок; X_{23} відсутній або являє собою основний залишок; Z_1 являє собою H_2N -або $RC(O)NH$ -; Z_2 являє собою: $-C(O)NRR$, $-C(O)OR$, $-C(O)OH$ або
їх солікожний R являє собою незалежно -H, (C_1-C_6) алкі-
льну, (C_1-C_6) алкенільну, (C_1-C_6) алкінільну, (C_5 -
 C_{20}) арильну, (C_6-C_{26}) алкарильну групи, 5-20 -
членну гетероарильну або 6-26 - членну алкете-
роарильну групу, або 1-7 - членний пептид або
пептидний аналог;кожний символ "-" між залишками X_n незалежно
означає амідний зв'язок, заміщений амідний зв'я-
зок, ізостер аміду або амідоміметик; абоii) делетована форма структурної формули (I), в
якій принаймні від одного до восьми залишків з X_1 ,
 X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , X_8 , X_9 , X_{10} , X_{11} , X_{12} , X_{13} , X_{14} ,
 X_{15} , X_{16} , X_{17} , X_{18} , X_{19} , X_{20} , X_{21} і X_{22} видалено, або
iii) модифікована форма структурної формули (I), в
якій принаймні один із залишків X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 ,
 X_6 , X_7 , X_8 , X_9 , X_{10} , X_{11} , X_{12} , X_{13} , X_{14} , X_{15} , X_{16} , X_{17} , X_{18} ,
 X_{19} , X_{20} , X_{21} , X_{22} або X_{23} консервативно заміщені
іншим залишком.2. Агоніст АроА-I за п.1, який відрізняється тим,
що виявляє принаймні 38% LCAT-активуючої акти-
вності в порівнянні з людським АроА-I.3. Агоніст АроА-I за п.1, який відрізняється тим,
що являє собою модифіковану форму структурної
формули (I).4. Агоніст АроА-I за п.3, який відрізняється тим,
що в ньому гідрофобні залишки фіксовані у відпо-
відності зі структурною формулою (I) і принаймні
один нефіксований залишок консервативно замі-
щений іншим залишком.5. Агоніст АроА-I за п.4, який відрізняється тим,
що у нього: X_1 являє собою Pro (P), D-Pro (p), Gly (G), Asn (N)
або Ala (A); X_2 являє собою Ala (A), Leu (L) або Val (V); X_3 являє собою Leu (L) або Phe (F); X_5 являє собою Leu (L);

(13) C2

(11) 71552

(19) UA

X₆ являє собою Phe(F);
 X₉ являє собою Leu (L);
 X₁₀ являє собою Leu (L), Trp (W) або Gly (G);
 X₁₃ являє собою Leu (L), Gly (G);
 X₁₄ являє собою Leu (L), Phe (F), Gly (G);
 X₁₆ являє собою Ala (A);
 X₁₇ являє собою Leu (L);
 X₂₁ являє собою Leu (L); і
 принаймні один з X₄, X₇, X₈, X₁₁, X₁₂, X₁₅, X₁₈, X₁₉,
 X₂₂ і X₂₃ консервативно заміщені іншим залишком.
 6. Агоніст АроА-I за п.3, який **відрізняється** тим,
 що в ньому гідрофобні залишки фіксовані у відпо-
 відності зі структурною формулою (I), і принаймні
 один нефіксований залишок консервативно замі-
 щений іншим залишком.
 7. Агоніст АроА-I за п.6, який **відрізняється** тим,
 що в ньому
 X₄ являє собою Glu (E);
 X₇ являє собою Glu (E);
 X₈ являє собою Asn (N) або Gln (Q);
 X₁₁ являє собою Asp (D) або Glu (E);
 X₁₂ являє собою Arg (R);
 X₁₅ являє собою Asp (D);
 X₁₈ являє собою Asn (N) або Gln (Q);
 X₁₉ являє собою Lys (K);
 X₂₀ являє собою Lys (K);
 X₂₂ являє собою Lys (K);
 X₂₃ відсутній або являє собою Lys (K); і принаймні
 один з X₁, X₂, X₃, X₅, X₆, X₉, X₁₀, X₁₃, X₁₄, X₁₆, X₁₇,
 X₂₁ консервативно заміщений іншим залишком.
 8. Агоніст АроА-I за п.6, який **відрізняється** тим,
 що у нього
 X₃ являє собою Leu (L) або Phe (F),
 X₆ являє собою Phe (F),
 X₉ являє собою Leu (L),
 X₁₀ являє собою Leu (L), Trp (W) або Gly (G) і при-
 наймні один з X₁, X₂, X₅, X₁₃, X₁₄, X₁₆, X₁₇ і X₂₁ кон-
 сервативно заміщені іншим залишком.
 9. Агоніст АроА-I за п.5 або 7, який **відрізняється**
 тим, що у нього залишок, що заміняється, відно-
 ситься до тієї ж підкатегорії, що і заміщений зали-
 шок.
 10. Агоніст АроА-I за п.1, який **відрізняється** тим,
 що являє собою делетовану форму структурної
 формули (I).
 11. Агоніст АроА-I за п.10, який **відрізняється** тим,
 що у нього один спіральний виток пептиду або
 пептидного аналога видалено.
 12. Агоніст АроА-I за п.1, який **відрізняється** тим,
 що являє собою 22-23 - членний пептид або пеп-
 тидний аналог структурної формули (I).
 13. Агоніст АроА-I за п.12, який **відрізняється** тим,
 що у нього
 "-" між залишками означає -C(O)NH-,
 Z₁ являє собою H₂N- і
 Z₂ являє собою -C(O)OH або його сіль.
 14. Агоніст АроА-I за п.13, який **відрізняється** тим,
 що у нього
 X₁ являє собою Pro (P), Ala (A), Gly (G), Asn (N),
 Asp (D), Gln (Q) або D-Pro (p);
 X₂ являє собою Ala (A), Val (V) або Leu (L);
 X₃ являє собою Leu (L) або Phe (F);
 X₄ являє собою Glu (E);
 X₅ являє собою Leu (L);
 X₆ являє собою Phe(F);
 X₇ являє собою Leu (L) або Glu (E);

X₈ являє собою Asn (N) або Gln (Q);
 X₉ являє собою Leu (L);
 X₁₀ являє собою Leu (L), Trp (W) або Gly (G);
 X₁₁ являє собою Glu (E);
 X₁₂ являє собою Arg (R);
 X₁₃ являє собою Leu (L) або Gly (G);
 X₁₄ являє собою Leu (L), Phe (F) або Gly (G);
 X₁₅ являє собою Asp (D);
 X₁₆ являє собою Ala (A);
 X₁₇ являє собою Leu (L);
 X₁₈ являє собою Asn (N) або Gln (Q);
 X₁₉ являє собою Lys (K);
 X₂₀ являє собою Lys (K);
 X₂₁ являє собою Leu (L);
 X₂₂ являє собою Lys (K); і
 X₂₃ відсутній або являє собою Lys (K).
 15. Агоніст АроА-I за п.14, який **відрізняється** тим,
 що X₂₃ відсутній.
 16. Агоніст АроА-I за п.14, який **відрізняється** тим,
 що кожний з X₁₀, X₁₃ і X₁₄ відмінний від Gly (G).
 17. Агоніст АроА-I за п.14, який **відрізняється** тим,
 що один з X₁₀, X₁₃ і X₁₄ являє собою Gly (G), а інші
 залишки відмінні від Gly (G).
 18. Агоніст АроА-I за п.1, який **відрізняється** тим,
 що має послідовність, вибрану з групи, що склада-
 ється з:
 (SEQ ID NO:144) PVLELFENLLERLLDALQKKLK;
 (SEQ ID NO:145) GVLELFENLLERLLDALQKKLK;
 (SEQ ID NO:146) PVLELFENLLERLLDALQKKLK;
 (SEQ ID NO:147) PVLELFENLLERLLFDALQKKLK;
 (SEQ ID NO:148) PVLELFENLLERLLGDALQKKLK;
 (SEQ ID NO:149) PVLELFENLWERLLDALQKKLK;
 (SEQ ID NO:150) PLLELFENLLERLLDALQKKLK;
 (SEQ ID NO:151) PVLELFENLGERLLDALQKKLK;
 (SEQ ID NO:152) PVFELFENLLERLLDALQKKLK;
 (SEQ ID NO:153) AVLELFENLLERLLDALQKKLK;
 (SEQ ID NO:154) PVLELFENLLERGLDALQKKLK;
 (SEQ ID NO:155) PVLELFNLWERLLDALQKKLK;
 (SEQ ID NO:186) PVLELFEQLLERLLDALQKKLK;
 (SEQ ID NO:187) PVLELFENLLERLLDALNKKLK;
 (SEQ ID NO:188) PVLELFENLLDRLLDALQKKLK;
 (SEQ ID NO:189) DVLELFENLLERLLDALQKKLK;
 і ацилована за N-кінцем і/або амідована або есте-
 рифікована за C-кінцем його форма.
 19. Мульти-
 ірний агоніст АроА-I, який **відрізняється** тим, що
 виявляє принаймні 38% LCAT-активуючої активно-
 сті в порівнянні з людським АроА-I і має структурну
 формулу (II)

$$\text{HN-[LL}_m\text{-NH]}_n\text{-LL}_m\text{-NH} \quad (\text{II})$$

 або є фармацевтично прийнятною його сіллю, де:
 кожний m являє собою незалежно ціле число від 0
 до 1;
 n являє собою ціле число від 0 до 10;
 кожний HN являє собою незалежно пептид або
 пептидний аналог за п.1;
 кожний LL являє собою незалежно біфункціональ-
 ний лінкер; і
 кожний "-" незалежно означає ковалентний зв'язок.
 20. Мультиірний агоніст АроА-I за п.19, який **від-
 різняється** тим, що біфункціональний лінкер може
 бути розщеплений.
 21. Мультиірний агоніст АроА-I, за п.19, який **від-
 різняється** тим, що n є 0.

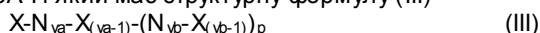
22. Мультимірний агоніст АроА-I за п.21, який **відрізняється** тим, що $m \in 0$.

23. Мультимірний агоніст АроА-I за п.19, який **відрізняється** тим, що кожний НН являє собою незалежно пептид за п.13.

24. Мультимірний агоніст АроА-I за п.19, який **відрізняється** тим, що кожний НН являє собою незалежно пептид за п.14.

25. Мультимірний агоніст АроА-I за п.19, який **відрізняється** тим, що кожний НН являє собою незалежно пептид за п.18.

26. Мультимірний агоніст АроА-I, який **відрізняється** тим, що виявляє принаймні 38% LCAT-активуючої активності в порівнянні з людським АроА-I і який має структурну формулу (III)



або є фармацевтично прийнятною його сіллю, де: кожний X являє собою незалежно $HN-[LL_m-HN]_n-LL_m-HN$;

кожний НН являє собою незалежно коровий пептид структури (I) або аналог, або мутантну, зрізану, з внутрішніми делеціями або розширену форму його, як описано тут;

кожний LL являє собою незалежно біфункціональний лінкер; і

кожний m являє собою незалежно ціле число від 0 до 1;

n являє собою ціле число від 0 до 8;

N_{ya} і N_{yb} являють собою незалежно мультифункціональний зв'язуючий радикал, де Y_a і Y_b представляють число функціональних груп на N_{ya} і N_{yb} відповідно;

кожний Y_a і Y_b являє собою незалежно ціле число від 3 до 8;

p являє собою незалежно ціле число від 0 до 7;

кожний "-" незалежно означає ковалентний зв'язок.

27. Мультимірний агоніст АроА-I за п.26, який **відрізняється** тим, що біфункціональний лінкер може бути розщеплений.

28. Мультимірний агоніст АроА-I, за п.26, який **відрізняється** тим, що $p \in 0$.

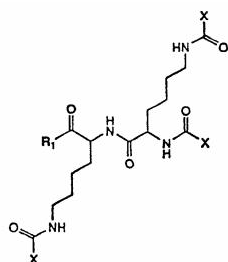
29. Мультимірний агоніст АроА-I за п.28, який **відрізняється** тим, що $m \in 0$.

30. Мультимірний агоніст АроА-I за п.26, який **відрізняється** тим, що кожний НН являє собою незалежно пептид за п.13.

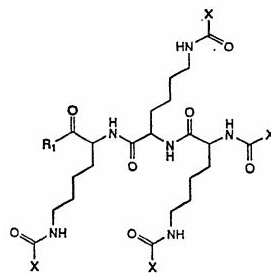
31. Мультимірний агоніст АроА-I за п.26, який **відрізняється** тим, що кожний НН являє собою незалежно пептид за п.14.

32. Мультимірний агоніст АроА-I за п.26, який **відрізняється** тим, що кожний НН являє собою незалежно пептид за п.18.

33. Мультимірний агоніст АроА-I, який **відрізняється** тим, що виявляє принаймні 38% LCAT-активуючої активності в порівнянні з людським АроА-I і який має структурні формули (IV) або (V)



(IV)



(V)

або є фармацевтично прийнятною його сіллю, де: кожний X являє собою незалежно $HN-[LL_m-HN]_n-LL_m-HN$;

кожний НН являє собою незалежно пептид або пептидний аналог за п.1;

кожний LL являє собою незалежно біфункціональний лінкер і

кожний n являє собою незалежно ціле число від 0 до 1;

m являє собою ціле число від 0 до 8;

R_1 являє собою $-OR$ або $-NRR$; і

кожний R являє собою незалежно $-H$, (C_1-C_6) алкілну, (C_1-C_6) алкенільну, (C_1-C_6) алкінілну, (C_5-C_{20}) арильну, (C_6-C_{26}) алкарильну групи, 5-20 - членну гетероарильну або 6-26 - членну алкгетероарильну групу.

34. Мультимірний агоніст АроА-I за п.33, який **відрізняється** тим, що біфункціональний лінкер може бути розщеплений.

35. Мультимірний агоніст АроА-I, за п.33, який **відрізняється** тим, що $p \in 0$.

36. Мультимірний агоніст АроА-I за п.35, який **відрізняється** тим, що $m \in 0$.

37. Мультимірний агоніст АроА-I за п.33, який **відрізняється** тим, що кожний НН являє собою незалежно пептид за п.13.

38. Мультимірний агоніст АроА-I за п.33, який **відрізняється** тим, що кожний НН являє собою незалежно пептид за п.14.

39. Мультимірний агоніст АроА-I за п.33, який **відрізняється** тим, що кожний НН являє собою незалежно пептид за п.18.

40. Комплекс агоніста АроА-I з ліпідом, який **відрізняється** тим, що включає агоніст АроА-I і ліпід, де агоніст АроА-I являє собою пептид або пептидний аналог за п.1, мультимірний агоніст АроА-I за п.19, мультимірний агоніст АроА-I за п.26, або мультимірний агоніст АроА-I за п.33.

41. Комплекс агоніста АроА-I з ліпідом за п.40, який **відрізняється** тим, що агоніст АроА-I являє собою пептид за п.12.

42. Комплекс агоніста АроА-I з ліпідом за п.40, який **відрізняється** тим, що агоніст АроА-I являє собою пептид за п.13.

43. Комплекс агоніста АроА-I з ліпідом за п.40, який **відрізняється** тим, що агоніст АроА-I являє собою пептид за п.14.

44. Комплекс агоніста АроА-I з ліпідом за п.40, який **відрізняється** тим, що агоніст АроА-I являє собою пептид за п.18.

45. Комплекс агоніста АроА-I з ліпідом за п.40, який **відрізняється** тим, що ліпід являє собою сфінгомелін.

46. Комплекс агоніста АроА-I з ліпідом за п.40, який **відрізняється** тим, що знаходиться в формі ліофілізованого порошку.
47. Комплекс агоніста АроА-I з ліпідом за п.40, який **відрізняється** тим, що знаходиться в формі розчину.
48. Фармацевтична композиція, яка **відрізняється** тим, що включає агоніст АроА-I і фармацевтично прийнятний носій, наповнювач або розчинник, в якому агоніст АроА-I являє собою пептид або пептидний аналог за п.1, мультимірний агоніст АроА-I за п.19, мультимірний агоніст АроА-I за п.26, або мультимірний агоніст АроА-I за п.33.
49. Фармацевтична композиція за п.48, яка **відрізняється** тим, що агоніст АроА-I являє собою пептид за п.12.
50. Фармацевтична композиція за п.48, яка **відрізняється** тим, що агоніст АроА-I являє собою пептид за п.13.
51. Фармацевтична композиція за п.48, яка **відрізняється** тим, що агоніст АроА-I являє собою пептид за п.14.
52. Фармацевтична композиція за п.48, яка **відрізняється** тим, що агоніст АроА-I являє собою пептид за п.18.
53. Фармацевтична композиція за будь-яким з пп.48-52, яка **відрізняється** тим, що агоніст АроА-I знаходиться в формі комплексу агоніст АроА-I-ліпід, і згаданий комплекс включає агоніст АроА-I і ліпід.
54. Фармацевтична композиція за п.53, яка **відрізняється** тим, що комплекс агоніст АроА-I-ліпід знаходиться в формі ліофілізованого порошку.
55. Спосіб лікування суб'єкта, що страждає на порушення, пов'язані з дисліпідемією, причому вказаний спосіб включає стадію введення суб'єкту ефективної кількості агоніста АроА-I за п.1.
56. Спосіб за п.55, який **відрізняється** тим, що вказаний суб'єкт є людиною.
57. Спосіб за п.55, який **відрізняється** тим, що приблизно від 0,5 мг/кг до 100 мг/кг агоніста АроА-I вводять вказаному суб'єкту.

58. Спосіб за п.55, який **відрізняється** тим, що агоніст АроА-I знаходиться в формі фармацевтичної композиції, причому вказана композиція включає агоніст АроА-I і фармацевтично прийнятний носій, наповнювач і розчинник.
59. Спосіб за п.55, який **відрізняється** тим, що агоніст АроА-I знаходиться в формі комплексу агоніст АроА-I-ліпід, причому вказаний комплекс включає агоніст АроА-I і ліпід.
60. Спосіб за п.55, який **відрізняється** тим, що порушення, пов'язане з дисліпідемією, являє собою гіперхолестеринемію.
61. Спосіб за п.55, який **відрізняється** тим, що порушення, пов'язане з дисліпідемією, являє собою серцево-судинне захворювання.
62. Спосіб за п.55, який **відрізняється** тим, що порушення, пов'язане з дисліпідемією, являє собою атеросклероз.
63. Спосіб за п.55, який **відрізняється** тим, що порушення, пов'язане з дисліпідемією, являє собою рестеноз.
64. Спосіб за п.55, який **відрізняється** тим, що порушення, пов'язане з дисліпідемією, являє собою недостатність ЛПВП або АроА-I.
65. Спосіб за п.55, який **відрізняється** тим, що порушення, пов'язане з дисліпідемією, являє собою гіпертригліцеридемію.
66. Спосіб за п.55, який **відрізняється** тим, що порушення, пов'язане з дисліпідемією, являє собою метаболічний синдром.
67. Спосіб лікування суб'єкта, що страждає на септичний шок, причому вказаний спосіб включає стадію введення суб'єкту ефективної кількості агоніста АроА-I за п.1.
68. Спосіб за п.67, який **відрізняється** тим, що вказаний суб'єкт є людиною.
69. Спосіб за п.67, який **відрізняється** тим, що приблизно від 0,5мг/кг до 100мг/кг агоніста АроА-I вводять вказаному суб'єкту.

1. Вступ

Винахід стосується композицій агоністу аполіпропротеїну А-I (АроА-I) для лікування порушень, пов'язаних з дісліпопротеїнемією, включаючи гіперхолестеринемію, серцево-судинні захворювання, атеросклероз, рестеноз, і інших порушень, таких як септичний шок.

2. Передумови винаходу

Циркулюючий холестерин переноситься в ліпопротеїнами плазми крові - частками, що складаються з комплексу ліпідів і білку, які транспортують ліпіди в крові. Ліпопротеїни низької щільності (ЛПНЩ) і ліпопротеїни високої щільності (ЛПВЩ) є головними переносниками холестерину. Вважають, що ЛПНЩ відповідають за доставку холестерину з печінки (де вони синтезуються або виходять з харчових джерел) до позапечіночних тканин організму. Термін "зворотний транспорт холестерину" описує транспорт холестерину з позапечіноч-

них тканин до печінки, де вони зазнають катаболізму і виводяться. Вважають, що ЛПВЩ-частки грають головну роль в процесі зворотного транспорту, працюючи як прибиральники тканинного холестерину.

Зв'язок підвищення рівня холестерину в сироватці з розвитком коронарної серцевої недостатності очевидний. Наприклад, атеросклероз являє собою повільно прогресуючу хворобу, яка характеризується накопиченням холестерину в стінках артерій. Очевидно, що ліпіди, які нагромаджуються в атеросклеротичних пошкодженнях, насамперед, мають походження з ЛПНЩ плазми, і таким чином, ЛПНЩ стали популярними під назвою "погані" холестерин. Навпаки, рівень ЛПВЩ в сироватці зворотно корелює з розвитком коронарних захворювань - насправді, припускають, що високий рівень ЛПВЩ в сироватці є негативним чинником ризику. Припускають, що високий рівень

ЛПВЩ в плазмі є не тільки захистом проти серцево-судинних хвороб, але насправді може викликати навіть регресію атеросклеротичних бляшок (напр. див. Badimon et al., 1992, *Circulation*, 86 (Suppl.III): 86-94). Таким чином, ЛПВЩ стали популярними під назвою "хороший" холестерин.

2.1. Транспорт холестерину

Систему транспорту жирів можна поділити на два шляхи: екзогенний шлях для холестерину і тригліцеридів, що всмоктуються з кишечника, і ендогенний шлях для холестерину і тригліцеридів, що попадають в кровоносне русло з печінки і інших непечінкових тканин.

За екзогенного шляху харчові жири упаковуються в ліпопротеїнові частки, звані хіломікронами, які попадають в кровоносне русло і доставляють свої тригліцериди до жирових тканин (або депо) і до м'язів (для окислення і виходу енергії). Інші хіломікрони, що містять ефір холестерину, видаляються з кровоносного русла за допомогою специфічних рецепторів, виявлених тільки на клітинах печінки. Цей холестерин потім знову стає доступним для клітинного метаболізму або для повторного циклу у позапечінкових тканинах у вигляді ліпопротеїнів плазми.

За ендогенного шляху, печінка секретує великі ліпопротеїни дуже низької щільності (ЛПДНЩ) в кровоносне русло. Серцевина ЛПДНЩ складається в основному з тригліцеридів, синтезованих в печінці, і невеликої кількості ефіру холестерину (або синтезованих в печінці або отриманих з хіломікронів). На поверхні ЛПДНЩ переважають два основних білки: апопротеїн В-100 і апопротеїн Е. Коли ЛПДНЩ досягають капілярів жирових тканин або м'язів, їх тригліцериди екстрагуються, і внаслідок цього утворюється новий вид частки, яка менша в розмірі і збагачується ефіром холестерину, але при цьому зберігає два своїх апопротеїни. Така частка називається ліпопротеїном проміжної щільності (ЛППЩ).

У людини приблизно половина часток ЛППЩ швидко видаляється з циркуляції (в межах двох-шести годин після утворення), оскільки вони добре зв'язуються з печінковими клітками, які екстрагують їх холестерин, утворюючи нові ЛПДНЩ і жовчні кислоти. ЛППЩ частки, не захоплені печінкою, залишаються в кровотоці довше. Апопротеїн Е дисоціює з циркулюючих часток, таким чином, перетворюючи їх в ЛПНЩ, які містять апопротеїн В-100 як єдиний білок.

Спочатку печінка захоплює і руйнує велику частину холестерину до жовчних кислот, які є кінцевими продуктами метаболізму холестерину. Захоплення часток, що містять холестерин, опосередковано рецепторами ЛПНЩ, які у високій концентрації є на гепатоцитах. Рецептори ЛПНЩ зв'язують як апопротеїн Е, так і апопротеїн В-100, і відповідають за скріплення і видалення як ЛППЩ, так і ЛПНЩ з циркуляції. Афіність апопротеїну Е до рецептору ЛПНЩ більше афіності апопротеїну В-100. У результаті ЛПНЩ частки мають велику тривалість життя в циркуляторному руслі, чому ЛППЩ частки - ЛПНЩ циркулюють приблизно 2,5 дні до скріплення з рецепторами ЛПНЩ в печінці і інших тканинах. Високий рівень ЛПНЩ (поганого холестерину) в сироватці позитивно пов'язаний з

розвитком ішемічної хвороби серця. Наприклад, при атеросклерозі холестерин, отриманий з циркулюючих ЛПНЩ, нагромаджується в стінках артерій, приводячи до формування великих бляшок, які ускладнюють кровоток, в результаті приводячи до утворення тромбу, що закупорює артерію, що викликає серцевий напад або інсульт.

Кількість внутрішньоклітинного холестерину, що вивільняється з ЛПНЩ, контролює клітинний метаболізм холестерину. Накопичення клітинного холестерину, отриманого з ЛПДНЩ і ЛПНЩ, контролює три процеси: по-перше, зменшує синтез клітинного холестерину шляхом вимкнення синтезу HMGCoA-редуктази - ключового ферменту шляху біосинтезу холестерину. По-друге, надходження холестерину отриманого з ЛПНЩ запускає накопичення холестерину шляхом активації ACAT-клітинного ферменту, що перетворює холестерин в ефір холестерину, який відкладається потім у вигляді накопичувальних крапель. По-третє, накопичення холестерину всередину клітини керує механізмом зворотного зв'язку, який інгібує клітинний синтез нових ЛПНЩ рецепторів. Таким чином, клітини ніби-то настроюють компліментарність своїх ЛПНЩ рецепторів, таким чином, щоб всередину проникла достатня кількість холестерину для задоволення метаболічних потреб клітини, не приводячи до надмірного накопичення (див. Brown & Goldstein, In, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th Ed., Goodman & Oilman, Pergamon Press, NY, 1990, Ch.36, pp.874-896).

2.2. Зворотний транспорт холестерину

Периферичні (непечінкові) клітини отримують свій холестерин шляхом комбінації локального синтезу і захоплення раніше сформованого стерину з ЛПДНЩ і ЛПНЩ. Навпаки, зворотний транспорт холестерину (ЗТХ) являє собою шлях, яким холестерин з периферичних клітин може повернутися в печінку для повторного циклу у позапечінкові тканини або для виведення в кишечник в складі жовчі, або в модифікованій або окисленій формі у вигляді жовчних кислот. Шлях ЗТХ являє собою спосіб виведення холестерину з більшості позапечінкових тканин і є дуже важливим для підтримки структури і функцій більшості клітин в організмі.

ЗТХ складається в основному з 3 кроків: а) вихід холестерину, початкове видалення холестерину з різних пулів периферичних кліток, в) естерифікація холестерину шляхом впливу лецитин:холестеринацилтрансферази (LCAT), що запобігає повторному входженню в клітини холестерину, що вже вийшов, з) захоплення/доставка ефіру холестерину ЛПВЩ в клітини печінки. Шлях ЗТХ опосередковується ЛПВЩ. ЛПВЩ являє собою загальний термін для ліпопротеїнових часток, які характеризуються своєю високою щільністю. Головними ліпідними складовими комплексів ЛПВЩ є різні фосфоліпіди, холестерин (ефір холестерину) і тригліцериди. Найбільш значущими компонентами аполіпопротеїну є А-I і А-II, які і визначають функціональні характеристики ЛПВЩ; а також присутні мінорні кількості аполіпопротеїнів С-I, С-II, С-III, D, E, J і т.д. ЛПВЩ мають широку різноманітність різних розмірів і існують в різних сполученнях вищезазначених складових в залежності від стану

реконструкції протягом метаболічного каскаду ЗТХ.

Ключовим ферментом, що бере участь в ЗТХ, є LCAT. LCAT в основному утворюється в печінці і циркулює в плазмі, пов'язаним з фракцією ЛПВЩ. LCAT перетворює отриманий з клітин холестерин в ефір холестерину, який потім секвеструється в ЛНВЩ, призначених для видалення. Білки-переносники ефіру холестерину (БПЕХ) і білки-переносники фосфоліпідів (БПФЛ) також роблять внесок в подальше ремоделювання циркулюючої популяції ЛПВЩ. БПЕХ можуть переміщувати ефір холестерину, зроблений LCAT, на інші ліпопротеїни, що зокрема містять АроВ ліпопротеїни, такі як ЛПДНЩ і ЛПНЩ. БПФЛ постачають лецитин до ЛНВЩ. Тригліцериди ЛПВЩ можуть бути катаболізовані позаклітинною печінковою тригліцерид ліпазою, а холестерин ліпопротеїнів видаляється печінкою за допомогою декількох механізмів.

Кожна частка ЛНВЩ містить, принаймні, одну копію (зазвичай 2-4 копії) АроА-I. АроА-I синтезується печінкою і тонким кишечником у вигляді пре-проаполіпопротеїну, який потім секретується у вигляді пропротеїну, який швидко розщеплюється, при цьому виходить зрілий поліпептид, що включає 243 амінокислотних залишки. АроА-I в основному складається з 6-8 різних 22-амінокислотних повторів, розділених лінкером, який часто являє собою пролін, а в деяких випадках являє собою ланцюжок, що складається з декількох залишків. АроА-I формує стабільні комплекси з ліпідами, які бувають 3 типів: малі, бідні ліпідами комплекси, що відносяться до пре-бета-1 ЛПВЩ, сплюснені дисковидні частки, що містять полярні ліпіди (фосфоліпід і холестерин), що відносяться до пре-бета-2 ЛНВЩ, і сферичні частки, що містять як полярні, так і неполярні ліпіди, що відносяться до сферичних або зрілих ЛПВЩ (ЛПВЩ₃ і ЛПВЩ₂). Більшість ліпопротеїнів ЛПВЩ в циркулюючій популяції містять і АроА-I і АроА-II (другий великий білок ЛПВЩ) і названі тут як АI/АП-ЛПВЩ фракція ЛПВЩ. Фракція ЛПВЩ, що містить тільки АроА-I (А1-ЛПВЩ фракція), схоже, є найбільш ефективною в ЗТХ. Епідеміологічні дослідження підтверджують гіпотезу, що А1-ЛПВЩ фракція є протиатерогенною. (Parra et al., 1992, *Arterioscler. Thromb.* 12, 701-707; De-cossin et al., 1997, *Eur. J. Clin. Invest.* 27, 299-307)

Попри те, що механізм перенесення холестерину з клітинної поверхні, тобто (холестериновий вихід) невідомий, передбачають, що бідний ліпідами комплекс пре-бета-1 ЛПВЩ є переважним акцептором для холестерину, що переноситься з периферичних тканин, що беруть участь в ЗТХ (Davidson et al, 1994, *J.Biol. Chem.* 269:22975-22983; Bielicki et al, 1992, *J.Lipid Res.* 33:1699-1709; Rothblat et al, 1992, *L. Lipid Res.* 33: 1091-1097, Kawano et al, 1993, *Biochemistry*, 36:9816-9825). В процесі збору холестерину з клітинних поверхонь, пре-бета-1 ЛПВЩ швидко перетворюється в пре-бета-2 ЛПВЩ. БПФЛ можуть збільшувати швидкість утворення пре-бета-2 дисків, але опублікованих результатів, що вказують на роль БПФЛ в ЗТХ, немає. LCAT переважно реагує з дисковидними і сферичними ЛПВЩ, переносючи 2-ацильні групи лецитину або інших фосфоліпідів на вільні гідро-

кислі залишки холестерину, виробляючи таким чином ефір холестерину (що залишаються в ЛПВЩ) і лізолецитин. Для LCAT реакції АроА-I потрібний як активатор; тобто АроА-I є натуральним спів фактором LCAT. Перетворення холестерину в його ефір обмежене просторово в частках ЛПВЩ, що запобігає зворотному входу холестерину до клітини, внаслідок чого ефір холестерину призначений для видалення. Ефір холестерину в зрілих частках ЛПВЩ в А1-ЛПВЩ фракції (тобто утримуючої АроА-I і не утримуючої АроА-II) видаляються в печінці і виводяться з жовцю більш ефективно чим такі з ЛПВЩ, що містять і АроА-I і АроА-II (АI/АП-ЛПВЩ фракція). Це можливе завдяки більш ефективному скріпленню А1-ЛПВЩ з мембраною гепатоцитів. Припускають наявність ЛПВЩ-рецептору, і нещодавно як рецептор ЛПВЩ, було виявлено рецептор-сміттяр SR-BI. (Acton et al, 1996, *Science*, 271: 518-520; Xu et al, 1997, *J.Lipid Res.* 38:1289-1298). SR-BI експресується найбільш рясно в стероїдогенних тканинах, наприклад, (в надниркових залозах) і в печінці (Landshuiz et al., 1996, *J.Clin. Invest.* 98:984-995; Riggotti et al., 1996, *J.Biol. Chem.* 271: 33545-33549).

Вважають, що БПЕХ не відіграють важливої ролі в ЗТХ, і, навпаки, беруть участь в метаболізмі ліпідів, отриманих з ЛПДНЩ і ЛПНЩ. Але зміна активності БПЕХ або їх акцептор ЛПДНЩ і ЛПНЩ має значення в ремоделюванні ЛПВЩ популяції. Наприклад, у відсутність БПЕХ, частки ЛПВЩ збільшуються в розмірах, які потім не виводяться. Огляди за ЗТХ і ЛПВЩ наведено в Fielding & Fielding, 1995, *J.Lipid Res.* 36: 211-228; Barrans et al, 1996, *Biochem. Biophys. Acta*, 1300: 73-85; Hirano et al., 1997, *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* 17 (6): 1053-1059).

2.3. Сучасні способи лікування дисліпідопroteinемією

В наш час існує ряд способів лікування для зниження рівня сироваточного холестерину і тригліцеридів. (Brown & Goldstein, *supra*). Але кожний з них має свої недоліки і обмеження відносно ефективності, наявності побічних ефектів і визначення групи пацієнтів.

Смоли, зв'язуючі жовчні кислоти, являють собою клас ліків, які порушують повторний транспорт жовчних кислот з кишечника до печінки (наприклад, холестирамін (Ques-tran Lighto, Bristol-Myers Squibb), коlestиполу гідрохлорид) (Colestido, The Up John Company). За перорального застосування, такі позитивно заряджені смоли зв'язують негативно заряджені жовчні кислоти в кишечнику. Оскільки смоли не можна адсорбувати з кишечника, вони виводяться, виносячи жовчні кислоти з собою. Застосування таких смол, проте, знижує рівень холестерину в сироватці щонайбільше приблизно на 20%, і має побічні ефекти в кишечнику, включаючи запори і певні авітамінози. Оскільки смоли зв'язують і інші ліки, застосування інших пероральних лікарських засобів повинно відбуватися, принаймні, за одну годину або через чотири-шість годин після вживання смол, що ускладнює режим прийому ліків у кардіологічних хворих.

Статини являють собою агенти, що понижують рівень холестерину, які блокують синтез холестерину шляхом інгібування HMGCoA-редуктази -

ключового ферменту, що бере участь в біосинтезі холестерину. Статини, наприклад, ловастатин (Mevacor, Merck & Co., Inc) і правастатин (Pravachol, Bristol-Myers Squibb Co) іноді використовують в комбінації зі смолами, що зв'язують жовчні кислоти. Статини значно зменшують рівень сироваточного холестерину і ЛПНЩ і уповільнюють прогресування коронарного атеросклерозу. Але рівень ЛПВЩ холестерину сироватки при цьому збільшується не набагато. Механізм зниження ЛПНЩ може включати як зменшення концентрації ЛПДНЩ, так і індукцію експресії ЛПНЩ-рецептору, що призводить до зменшення продукції і/або посилення катаболізму ЛПНЩ. Прийом цих ліків супроводжують побічні ефекти, включаючи печінкову і ниркоподібну дисфункції (Physicians Desk Reference, Medical Economics Co., Inc., Montvale, N.J., 1997). Нещодавно PDA схвалила аторвастатин (інгібітор HMGCoA редуктази, розроблений Parke-Davis) (Warner Lambert) для лікування рідких, але важких випадків сімейної гіперхолестеринемії. (1995, Scrip 20(19): 10).

Ніацин, або нікотинова кислота являє собою водорозчинний комплекс вітаміну В, що використовується як харчова добавка і антигіперліпідемічний агент. Ніацин зменшує продукцію ЛПДНЩ і є ефективним при зниженні рівня ЛПНЩ. У деяких випадках він використовується в комбінації зі смолами, що зв'язують жовчні кислоти. Ніацин може підвищувати рівень ЛПВЩ при використанні в адекватних дозах, але його використання обмежене серйозними побічними ефектами, які виявляються при таких високих дозах.

Фібрати являють собою клас ліпідопонижувальних ліків, що використовуються для лікування різних форм гіперліпідемій (наприклад, підвищений рівень тригліцеридів в сироватці), що також може бути пов'язано з гіперхолестеринемією. Фібрати знижують рівень ЛПДНЩ фракції і помірно збільшують рівень ЛПВЩ - але ефект цих ліків на сироваточний холестерин є різнобічним. У США фібрати схвалені для використання в якості протиліпідемічних засобів, але не отримали дозволу в якості гіперхолестеринемічних агентів. Наприклад, клофібрат (Atromid-So, Wyeth-Ayerst Laboratories) є протиліпідемічним агентом, який діє (за невідомим механізмом), знижуючи тригліцериди сироватки за рахунок зменшення ЛПДНЩ фракції.

Хоч зміст сироваточного холестерину можна знизити у деяких груп пацієнтів, біохімічна відповідь на ліки різна, і не завжди представляється можливим передбачити у якого саме пацієнта буде отримано бажаний ефект.

Не було показано, що артомід-S® є ефективним в профілактиці ішемічної хвороби серця. Хімічно і фармакологічно родинні ліки гемфіброзил (Лопід®, Parke-Devis) являє собою агент, регулюючий рівень ліпідів, який помірно знижує рівень сироваточних тригліцеридів і холестерину ЛПДНЩ і помірно підвищує рівень холестерину ЛПВЩ₁ і ЛПВЩ₂ субфракцій, а також і АроА-I і А-II (AI/АП-ЛПВЩ фракція). Але ліпідна відповідь є гетерогенною особливо у різних груп пацієнтів. Запобігання ішемічній хворобі серця спостерігали у чоловіків 40-55 років без випадків вияву ішемічної хвороби серця в анамнезі і незрозуміло, чи

можна екстраполювати результати, отримані в цьому випадку на інші групи пацієнтів (напр. на жінок, на чоловіків більше за ранній і пізній вік). Не отримано ефект у пацієнтів з вже сталою ішемічною хворобою серця. Із застосуванням фібрів пов'язані серйозні побічні ефекти, включаючи токсичність, і онкогенність (особливо рак шлунково-кишкового тракту), хвороби жовчного міхура і збільшення випадків некоронарної смертності. Ці ліки не рекомендовані для лікування пацієнтів з високим ЛПНЩ або низьким ЛПВЩ як тільки ліпідних порушень (Physician's Desk Reference, 1997, Medical Economics Co., Inc. Montvale, N.J.)

Пероральна заміщувальна терапія естрогенами може бути запропонована для зниження гіперхолестеринемії у жінок в постменопаузний період. Але збільшення ЛПВЩ може супроводитися збільшенням тригліцеридів. Безумовно, лікування естрогенами обмежене особливою групою пацієнтів (жінки в постменопаузі) і пов'язане з серйозними побічними ефектами, включаючи злоякісні новоутворення, хвороби жовчного міхура, тромбоемболічну хворобу, гепатоаденому, підвищений кров'яний тиск, знижену толерантність до глюкози, гіперкальціємію.

Таким чином, є необхідність створення ліків, які були б ефективні в зниженні холестерину в сироватці, підвищенні рівня ЛПВЩ, запобіганні ішемічній хворобі серця і/або лікуванні вже існуючої хвороби, особливо атеросклерозу.

2.4. АроА-I як мішень

Жодне з нині існуючих ліків, для зниження рівня холестерину не збільшує рівень ЛПВЩ і не стимулює ЗТХ - і представляється найбільш відповідним для надання впливу на транспорт холестерину, модулюючи його надходження з їжею, повторне використання, синтез холестерину а також на популяцію ЛПДНЩ.

Бажано знайти ліки, які стимулюють вихід холестерину і його видалення; існує декілька потенційних мішеней на шляху зворотного транспорту холестерину -наприклад, LCAT, ЛПВЩ або їх різні компоненти (АроА-I, АроА-II і фосфоліпіди), БПФЛ і БПХ - і невідомо, яка з цих мішеней буде найбільш ефективною при досягненні бажаного профілю ліпопротеїнів і протективних ефектів. Збурення будь-якого окремого компонента в ЗТХ впливає величезний чином на склад циркулюючих популяцій ліпопротеїнів і на ефективність ЗТХ.

Результати, отримані in vivo, призвели до ряду висновків, які висувають ЛПВЩ і їх головний складовий білковому компоненту АроА-I велику роль в запобіганні атеросклеротичним пошкодженням і потенційній регресії бляшок - і це робить їх привабливими мішенями для терапевтичних втручань. По-перше, існує зворотна залежність між концентрацією сироваточного АроА-I (ЛПВЩ) і атерогенезом у чоловіків (Gordon & Rifkind et al., 1989, N. Eng. J. Med, 321: 1311-1316; Gordon et al., 1989, Circulation, 79:8-15). Насправді, наявність специфічних субпопуляцій ЛПВЩ зв'язують із зменшенням ризику розвитку атеросклерозу у людини (Miller, 1987, Amer. Heart 113: 589-597; Cheung et al., 1991, Lipid Res., 32: 383-394; Fruchart & Ailhaud, 1992, Clin. Chem, 38:79)

По-друге, дослідження на тваринах підтверджують протективну роль ApoA-I (ЛПВЩ). При лікуванні кролів, що отримують холестеринову дієту, ApoA-I або ЛПВЩ знижує розвиток і прогресію бляшок (жирових смужок) у цих кроликів. (Kloizumi 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). Але ефективність змінюється в залежності від джерела ЛПВЩ (Beitz et al., 1992, Prosta-glandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acides 47: 149-152; Mezdour et al., 1995, Atherosclerosis, 113: 237-246).

По-третє, очевидний доказ ролі ApoA-I отриманий з експериментів на трансгенних тваринах. Експресія людського гена ApoA-I у мишей, генетично схильних до дієто-залежного атеросклерозу, захищає їх від розвитку пошкоджень на аорті (Rubin et al., 1991 Nature 353: 265-267). Також показано, що ApoA-I трансгени супресують атеросклероз у ApoE-дефіцитних мишей і Apo(a) трансгенних мишей (Paszy 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). Такі ж результати отримали у трансгенних кроликів, експресуючих людський ApoA-I (Duverger, 1996, Circulation, 94: 713-717; Duverger et al., 1996, Atheroscler. Thromb. Vase. Biol. 16: 1424-1429) і у трансгенних пацюків, у яких підвищений рівень людського ApoA-I захищає проти атеросклерозу і інгібує рестеноз, який виникає внаслідок балонної ангіо-пластики (Burkey et al., 1992, Circulation, Supplement 1, 86: 1-472, Abstract No. 1876; Burkey et al., 1995, J.LipidRes., 36: 1463-1473).

Виявилося, що фракція A-I-ЛПВЩ більш ефективна в ЗТХ ніж A/II-ЛПВЩ фракція. Дослідження на трансгенних для людського ApoA-I або ApoA-II (A/II) мишах показали, що білковий склад ЛПВЩ значно впливає на їх роль - A-I-ЛПВЩ є більше проти-атерогенним, ніж A/II-ЛПВЩ (Schultz et al., 1993, Nature 365:762-764). Паралельні дослідження, що проводяться на трансгенних мишах, експресуючих LCAT генів людини, показали, що помірне збільшення активності LCAT значно змінює рівень холестерину в ліпо-протеїнах і цей LCAT значною мірою переважніше для ЛПВЩ, що містять ApoA-I (Francone et al., 1995, J.Clinic. Invest., 96: 1440-1448; Berard et al., 1997, Nature Medicine 3(7): 744-749). Ці результати підтверджують важливу роль ApoA-I в активації LCAT і стимуляції ЗТХ; додаткові дослідження показали ще більш складний сценарій: головним компонентом ЛПВЩ, що модулює вихід холестерину з клітин, є фосфоліпіди (Fournier et al., 1996, J. Lipid. Res., 37:1704-1711).

У зв'язку з потенційною роллю ЛПВЩ, тобто як ApoA-I, так і пов'язаних з ним фосфоліпідів, в захисті проти атеросклеротичної хвороби, було початі і продовжуються клінічні випробування на людині, з використанням рекомбінантно отриманого ApoA-I компанії UCB (Бельгія) (Pharmaprojects, Oct. 27 1995; IMS R&D Focus, June 30, 1997, Dmg Status Update, 1997, Atherosclerosis 2(6): 261-265), також "M. Eriksson (Congress The Role of HDL in Disease Prevention" Nov. 7-9 1996, Fort Worth; Lacko & Miller, 1997, J. Lip. Res. 38: 1267-1273, WO 94/13819), а також почато і продовжуються Bio-

Tech (Pharmaprojects, April 7, 1989). Також зроблені спроби використання ApoA-I в лікуванні септичного шоку (Opal, "Reconstituted HDL as a Treatment Strategy for Sepsis" IBC's 7th International Conference on Sepsis, April 28-30, 1997, Washington, D.C.; Gouni et al., 1993, J.Lipid Res, 94: 139-146; Levine, WO96/04916). Але існує безліч підводних каменів, пов'язаних з отриманням і використанням ApoA-I, що робить його далеким від ідеалу в якості ліків; наприклад, ApoA-I являє собою великий білок, отримання якого є складним і дорогим; значні проблеми виробництва і репродукції можуть виникнути відносно стабільності збереження ліків, доставки активного продукту, а також часу половини-життя *in vivo*.

Враховуючи ці труднощі, були зроблені спроби отримання пептидів, які мімікують ApoA-I. Ключову активність ApoA-I зв'язують з наявністю множинних повторів унікальної межі повторної структури білку - мфпатичний α -спіралі класу A (Segrest, 1974, FEBS Lett, 38: 247-253); більшість спроб по створенню пептидів, мімікуючих активність ApoA-I, сфокусовано на створенні пептидів, що здатні утворювати амфпатичні α -спіралі класу A.

Амфпатичні α -спіралі класу A є унікальними за внаслідок своїх позитивно заряджених амінокислотних залишків, кластеризованих на гідрофільно-гідрофобній поверхні, і негативно заряджених амінокислотних залишків, кластеризованих в центрі гідрофільної поверхні, α -спіральні пептиди класу A мають гідрофобний кут менше за 180° (Segrest et al., 1990, Proteins: Structure, Function and Genetics 8: 103-117). Стратегії ініціації *de novo* для створення ApoA-I мімікуючих пептидів засновані не на первинній послідовності природно існуючих аполіпопротеїнів, а швидше на впровадженні цих унікальних рис α -спіралей класу A в послідовність пептидних аналогів, а також деяких властивостей доменів ApoA-I (Davidson et al., 1996, PNAS, USA, 93: 13605-13610; Rodgers et al., 1997, Biochemistry, 36: 288-300; Lins et al., 1993, Biochem., Biophys. Acta Biomem-branes 1151:137-142; Ji & Jonas, 1995, J. Biol. Chem., 270:11290-11297; Collet et al., 1997, J. Lipid Res., 38: 634-644; Sparrow & Gotto 1980, Ann. N.Y. Acad. Sci. 348: 187-211, Sparrow & Gotto, 1982, 187-211, CRC Crit. Rev. Biochem. 13, 87-107; Sorci-Thomas et al., 1993, J. Biol. Chem, 268: 21403-21409; Wang et al., 1996, Biochim. Biophys. Acta 174-184; Minnich et al., 1992, J. Biol. Chem, 267: 16553-16560; Holvoet et al., 1995, Biochemistry 34: 13334-13342; Sorci-Thomas et al., 1997, J.Biol. Chem. 272(11): 7278-7284; Frank et al., 1997, Biochemist Ry, 1798-1806).

В одному з досліджень Fukushima et al. синтезували 22-членний пептид, що складався в основному з Glu, Lys і Leu залишків, які розташовані періодично таким чином, що формують амфпатичну α -спіраль з рівними гідрофобною і гідрофільною поверхнями ("ELK пептид") (Fukushima et al., 1979, J. Amer. Chem. Soc. 101(13) 3703-3704; Fukushima et al., 1980, J. Biol. Chem, 255, 10651-10657). ELK пептид має послідовність з 41% гомології з 198-219 фрагментом ApoA-I. Дослідження з допомогою кількісної ультрафільтрації, гелі-проникаючої хроматографією і кругового дихрої-

зму показали, що ELK пептид ефективно зв'язується з фосфоліпідами і мімікрує деякі фізичні і хімічні властивості ApoA-I (Kaiser et al, 1983, PNAS USA 80: 1137-1140; Kaiser et al, 1984, Science 223: 249-255; Fuku-shima et al., 1989, supra; Nakagawa et al, 1985, J.Am. Chem. Soc. 107: 7087-7092). Yokoyama et al. на основі цих досліджень зробили висновок, що надзвичайно важливим чинником для активації LCAT є наявність достатньої кількості великої амфipатичної структури (Yokoyama et al, 1980, J.Biol. Chem. 255(15): 7333-7339). Пізніше виявили, що димер такого 22-членного пептиду мімікрує ApoA-I ще в більшій мірі, ніж мономер; на основі цих результатів припустили, що такий 44-мер, вміщений в середину за допомогою зломщика спіралі (або Gly або Pro) являє собою мінімальний функціональний домен в ApoA-I (Nakagawa et al., 1985, supra).

В іншому дослідженні використали модель амфipатичних пептидів, названих "LAP пептидами" (Pownall et al., 1980, PNAS USA 77(6): 3154-3158; Sparrow et al., 1981, In:) Peptides: Synthesis-Structure-Function, Roch and Gross, Eds., Pierce Chem. Co., Rockford, IL, 253-256). На основі вивчення скріплення ліпідів з фрагментами нативних аполіпопротеїнів, були розроблені декілька LAP пептидів, названі LAP-16, LAP-20 і LAP-24 (утримуючих 16, 20 і 24 амінокислотних залишків відповідно). Це модель амфipатичних пептидів, послідовності яких не мають гомології з аполіпопротеїнами, модель була створена, щоб отримати гідрофільні поверхні, організовані іншим чином, ніж у амфipатичних спіральних доменів класу A, пов'язаних з аполіпопротеїнами (Segrest et al., 1992, J.Lipid Res. 33: 141-166). На основі цих досліджень автори дійшли висновку, що для моделі амфipатичних пептидів повинна бути мінімальна довжина в 20 залишків, необхідна для підтримки ліпід озв'язуючих властивостей.

Дослідження з мутантами LAP20, що містять залишок проліну в різних положеннях послідовності визначили, що існує прямий зв'язок між скріпленням ліпиду і активацією LCAT, але сам по собі потенціал спіралі пептиду не призводить до активації LCAT. (Ponsin et al., 1986, J. Biol. Chem, 261(20): 9202-9205). Більш того присутність зломщика спіралі (Pro) близько до середини пептиду зменшує його афінність до фосфоліпідних поверхонь, а також його здібність до активації LCAT. Крім того, показано, що певні LAP пептиди зв'язують фосфоліпіди (Sparrow et al., supra) і існує контрверсія, що LAP пептиди спіральні в присутності ліпідів (Buchko et al., 1996, J.Biol. Chem, 271(6): 3039-3045; Zhong et al., 1994, Peptide Research 7(2): 99-106).

Segrest et al., синтезували пептиди, що складаються з 18-24 амінокислотних залишків, гомологічні спіралі ApoA-I (Kannelis et al., 1989, J.Biol. Chem, 255(3): 11464-11472; Segrest et al., 1983, J.Biol. Chem. 258:2290-2295). їх послідовності створені специфічним чином, щоб мімікрувати амфipатичних спіральних доменів класу A відповідних аполіпопротеїнів відносно гідрофобного моменту (Eisenberg et al., 1982, Nature 299: 371-374) і розподіли заряду (Segrest et al., 1990, Proteins 8:103-117; U.S.PatentNo 4,643,988). Один 18 член-

ний пептид, "18A" пептид, був створений для того, щоб бути моделлю α -спіралі класу A (Segrest et al., 1990, supra). Вивчення цих і інших пептидів, що мають звернений розподіл заряду, подібно "18R" пептиду, показало, що розподіл заряду є надзвичайно важливим для активності; пептиди із зверненим розподілом заряду мають зменшення афінності до ліпідів в порівнянні з 18A миметиками класу A, а також пониження спіральності в присутності ліпідів (Kannelis 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).

Інші синтетичні пептиди, що не мають гомології з аполіпопротеїнами, створені з метою включати димери і тримери 18A пептиду (Anantharamaiah et al., 1986, Proteins of Biological Fluids 34:63-66), GALA і EALA пептидів (Subbarao et al., 1988, PROTEINS: Structure, Function and Genetics 3:187-198) і ID пептидів (Labeur et al., 1997, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 17: 580-588) і 18AM4 пептид (Brasseur et al., 1993, Biochim. Biophys. Acta 1170:1-7).

Також був створений "консенсусний" пептид, що містить 22 амінокислотних залишки на основі послідовності спіралі людського ApoA-I (Anantharamaiah et al., 1990, Arteriosclerosis, 10(1), 95-105; Venkatachalapathi et al., 1991, Mol. Conformation and Biol. Interaction, Indian Acad Sci. B: 585-596). Його послідовність сконструйована за допомогою ідентифікації найбільш переважаючих залишків в кожному положенні гіпотетичних спіралей людського ApoA-I. Подібно до пептидів, описаних вище, спіраль, що формується цими пептидами, має позитивно заряджені амінокислотні залишки, кластеризовані в гідрофільно-гідрофобні поверхні, негативно заряджені амінокислотні залишки, кластеризовані в центрі гідрофільної поверхні і гідрофобний кут менше за 180° . Димер такого пептиду являє собою щось таке, що ефективно в активації LCAT, а мономер має слабкі ліпід-зв'язуючі властивості (Venkatachalapathi et al., 1992, supra). На основі насамперед досліджень *in vitro* з пептидами, описаними вище, було встановлене зведення правил для створення пептидів, мімікуючих функцію ApoA-I. Вважається важливим, що амфipатична α -спіраль має позитивно заряджені залишки, кластеризовані на гідрофільно-гідрофобній поверхні і негативно заряджені амінокислотні залишки, кластеризовані в центрі гідрофільної поверхні, необхідна для афінності до ліпідів і активації LCAT (Venkatachalapathi et al., 1991, supra). Anantharamaiah et al. визначили так само, що негативно заряджений залишок Glu в положенні 13 узгодженого 22-членного пептиду, розташований в межах гідрофобної поверхні α -спіралі, грає важливу роль в активації LCAT (Anantharamaiah et al., 1991, supra). Крім того Brasseur визначив, що гідрофобний кут (ϕ кут) менше за 180° необхідний для оптимальної стабільності ліпід-аполіпопротеїнового комплексу і роблять внесок в формування дисковидних часток, в яких пептиди розташовуються по краю ліпідного бішару (Brasseur 1991, J.Biol. Chem. 66(24): 16120-16127).

Rosseneu et al., також стверджують, що гідрофобний кут менше за 180° необхідний для активації LCAT (WO93/25581).

Але, незважаючи на ці правила, доки нікому не вдалося створити пептид такої ж активності, як АроА-I - найкращий з тих, що мав активність менше за 40% в порівнянні з АроА-I, що було перевірено в тесті активації LCAT, описаному тут. У літературі не наведено жодного пептиду-миметика, придатного в якості ліків.

Тому необхідно створити стабільний агоніст АроА-I, який мімікрує активність АроА-I, і який відносно простий і дешевий в отриманні. Однак, принципи створення ефективних АроА-I миметиків не визначені, і принципи створення органічних молекул з функцією АроА-I невідомі.

3. Короткий опис винаходу

Винахід стосується агоністів АроА-I, здатних до формування амфіпатичних α -спіралей, які мімікрують активність АроА-I, що мають специфічну активність, тобто одиниці активності (активація ІХАТ)/одиниця маси), або перевершуючу активність нативної молекули, що наближається. У принципі, агоністи АроА-I винаходу являють собою пептиди або аналоги пептидів, які: формують амфіпатичні спіралі (в присутності ліпідів), зв'язують ліпіди, формують пре- β -подібні або ЛПВЩ-подібні комплекси, активують LCAT, збільшують рівень ЛПВЩ в сироватці і посилюють вихід холестерину.

Винахід заснований, зокрема, на створенні і відкритті заявниками пептидів, які мімікрують функцію АроА-I. Пептиди винаходу були створені на основі передбачуваної спіральної структури і амфіпатичних властивостей 22-амінокислотних узгоджених послідовностей, отриманих із спіральних повторів АроА-I. Дивно, але пептиди винаходу мають специфічну активність набагато вище, ніж пептиди, отримані з АроА-I, вже описані в літературі. Насправді, деякі втілення винаходу наближаються до 100% активності нативного АроА-I, а суперагоністи, описані тут, навіть перевершують специфічну активність АроА-I.

Винахід проілюстровано робочими прикладами, які описують структуру, отримання і використання окремих амфіпатичних пептидів, які формують спіралі (в присутності ліпідів), зв'язують ліпіди, утворюють комплекси і підвищують активність LCAT. На основі структури і активності втілених прикладів, заявники визначили ряд принципів, які можуть бути використані для створення альтернативних або мутантних форм, які також входять до області даного винаходу.

Винахід також стосується фармацевтичних композицій, що містять такі агоністи АроА-I (пептиди або пептидо-ліпідні комплекси) в якості активного інгредієнту, а також способів отримання таких складів і їх використання в лікуванні захворювань, пов'язаних з дисліпопротеїнемією (наприклад, серцево-судинні хвороби, атеросклероз, метаболічний синдром), рестенозу або ендотоксемії (напр. септичного шоку).

3.1. Скорочення

Скорочення, що використовуються тут для L-енантімерів амінокислот, що генетично кодується такі, що звичайно використовуються, і являють собою наступні:

Амінокислота	Однолітерний символ	Загальноприйняте скорочення
Аланін	A	Ala
Аргінін	R	Arg
Аспарагін	N	Asn
Аспарагінова кислота	D	Asp
Цистеїн	Z	Cys
Глутамін	Q	Gln
Глутамінова кислота	E	Glu
Гліцин	G	Gly
Гістидин	H	His
Ізолейцин	I	Ile
Лейцин	L	Leu
Лізин	DO	Lys
Метіонін	M	Met
Фенілаланін	F	Phe
Пролін	P	Pro
Серин	S	Ser
Треонін	N	Thr
Триптофан	W	Trp
Тирозин	Y	Tyr
Валін	V	Val

Скорочення, що використовуються для D-енантімерів амінокислот, що генетично кодується, являють собою велику прописну літеру однолітерних символів. Наприклад, "R" означає L-Аргінін і "r" означають D-Аргінін.

3.2. Визначення

Терміни, що використовуються тут мають наступні значення:

"Алкіл" стосується насиченого розгалуженого прямого ланцюга або циклічного вуглеводневого радикала. Типові алкільні групи включають наступні групи, не обмежуючись ними: метил, етил, пропіл, ізопропіл, бутіл, ізобутіл, третбутил, пентил, ізопентил, гексил і т.п. В переважних втіленнях алкільна група являє собою (C_1-C_6) алкіл.

"Алкеніл" стосується ненасиченого розгалуженого прямого ланцюга або циклічного вуглеводневого радикала, що має принаймні один подвійний зв'язок. Радикал може знаходитися або в цис- або в транс-конформації по відношенню до подвійного зв'язку(ам). Типові алкенільні групи включають, не обмежуючись ними: етеніл, пропеніл, ізопропеніл, бутеніл, ізобутеніл, третбутеніл, пентеніл, гексеніл і т.п. В переважних втіленнях алкенільна група представляє собою (C_1-C_6) алкеніл.

"Алкініл" стосується ненасиченого розгалуженого прямого ланцюга або циклічного вуглеводневого радикала, що має, принаймні, один потрійний зв'язок. Типові алкінільні групи включають, не обмежуючись ними: етиніл, пропиніл, бутиніл, ізобутиніл, пентиніл, гексиніл і т.п. В переважних втіленнях алкінільна група являє собою (C_1-C_6) алкініл.

"Арил" відноситься до ненасиченого циклічного вуглеводневого радикала, що має кон'юговану π -електронну систему. Типові арильні групи включають, не обмежуючись ними: пента-2,4-дієн, феніл, нафтил, антрацил, азуленіл, хризеніл, короненіл, флуорантеніл, індеценіл, іденіл, оваленіл, периленил, феналенил, фенантренил, піценіл, плейаденил, піреніл, пірантренил, рубеценіл, і т.п. В переважних втіленнях арильна група являє собою (C_5-C_{20}) арил, і особливо переважний (C_5-C_{10}) арил.

"Алкарил" стосується прямоланцюгової алкільної, алкенильної або алкінільної груп, де один з атомів водню пов'язаний з кінцевим вуглеводом, заміщений на арильний залишок. Типові алкарильні групи включають, не обмежуючись ними: бензил, бензиліден, бензилідин, бензолобензил, нафтолобензил і т.п. В переважних втіленнях арильна група являє собою (C_6-C_{26}) алкарил, тобто алкільна, алкенильна або алкінільна половина алкарильної групи являє собою (C_1-C_6), а арильна частина являє собою (C_5-C_{20}) і особливо переважний (C_5-C_{10}) арил. У особливо переважному втіленні алкарильна група являє собою (C_6-C_{13}) алкарил, тобто алкільну, алкенильну або алкінільну частину алкарильної групи являє собою і (C_1-C_3) а арильна частина це (C_5-C_{10}).

"Гетероарил" стосується арильної частини, де один або більше атомів вуглеводу заміщені іншим атомом, таким як N, P, O, S, As, Se, Si, Te і т.д. Типові гетероарильні групи включають, не обмежуючись ними: акридарзин, акридин, арсантридин, арсиндол, арсиндолін, карбазол, β -карболін, хроміні, цинолін, фуран, імідазол, індазол, індол, індолизін, ізоарсиндол, ізоарсинолін, ізобензофуран, ізохромен, ізоиндол, ізофосфоіндол, ізофосфінолін, ізохінолін, ізотіазол, ізоксазол, нафтиридин, перимідин, фенантридин, фенантролін, феназин, фосфоіндол, фосфінолін, фталазин, птеридин, пурин, пуран, піразин, піразол, піридазин, піридин, піримідин, пірол, пірролизін, хіназолін, хінолін, хінолізин, хіноксалин, селенофен, теллуорофен, тиофен, і ксантен. У переважному втіленні гетероарильні групи являє собою 5-20 членний гетероарил, причому 5-10 членний гетероарил найбільш переважний.

"Алкгетероарил" стосується прямоланцюгової алкільної, алкенильної або алкінільної груп, де один з атомів водню, пов'язаний з кінцевим вуглеводом, заміщений на гетероарильну частину. У переважному втіленні алкгетероарильні групи являють собою 6-26 членну алкгетероарильну групу, тобто алкільна, алкенильна або алкінільна частина алкгетероарильної групи являє собою (C_1-C_6), а гетероарильна частина це 5-20 членна гетероарильна група. У особливо переважному втіленні алкгетероарильна група є 6-13 членним алкгетероарилом, тобто алкіл-, алкенили алкінільна частина алкарильної групи являє собою 5-10 членну гетероарильну групу.

"Заміщений алкіл, алкенил, алкініл, арил, алкарил, гетероарил або алкгетероарил" стосуються алкільної, алкенильної або алкінільної групам, арильної, алкарильної, гетероарильної або алкгетероарильної групам, де один або більше атоми водня заміщені іншими групами. Переважні замітники включають -OR, -SR, -NRR, -NO₂, -CN, галоген, -C(O)R, -C(O)OR, -C(O)NR, де кожний R являє собою незалежно водень, алкільну, алкенильну, алкінільну, арильну, алкарильну, гетероарильну або алкгетероарильну групи.

4. Короткий опис фігур

На Фіг.1А представлено діаграму спірального колеса Шиффера-Едмундсона ідеальної амфіпатичної α -спіралі, в якій незаштриховані кільця представляють гідрофільні амінокислотні залишки

і заштриховані кільця представляють гідрофобні амінокислотні залишки.

На Фіг.1В представлено діаграму спіральної мережі ідеальної амфіпатичної спіралі Фіг.1А.

На Фіг.1С представлено діаграму спірального циліндру ідеальної амфіпатичної спіралі Фіг.1А.

На Фіг.2А представлено діаграму спірального колеса Шиффера-Едмундсона корового пептиду структури (I), яка показує амфіпатичність спіралі (незаштриховані кільця представляють гідрофільні амінокислотні залишки, заштриховані кільця представляють гідрофобні амінокислотні залишки і частково заштриховані кільця представляють або гідрофільні або гідрофобні амінокислотні залишки).

На Фіг.2В представлено діаграму спіральної мережі корового пептиду структури (I), яка показує гідрофобну поверхню спіралі.

На Фіг.2С представлено діаграму спіральної мережі корового пептиду структури (I), яка показує гідрофільну поверхню спіралі.

На Фіг.3А представлено діаграму спіральної мережі, ілюструючу гідрофільну поверхню узгодженого 22-членного пептиду Сергеста (PVLDEFREKLNEELEALKQKLIK; SEQ ID NO:75).

На Фіг.3В представлено діаграму спіральної мережі, показуючу гідрофільну поверхню ілюстративного корового пептиду 146 (PVLELFENLLERLLDALQKCLK/SEQ ID NO: 146).

На Фіг.4А представлено діаграму спіральної мережі, що ілюструє гідрофобну поверхню узгодженого 22-членного пептиду Сергеста - SEQ ID NO:75).

На Фіг.4В представлено діаграму спіральної мережі, що ілюструє гідрофобну поверхню ілюстративного корового пептиду 146 SEQ ID NO: 146).

На Фіг.5А представлено діаграму спірального колеса Шиффера-Едмундсона узгодженого 22-членного пептиду Сергеста SEQ ID NO:75).

На Фіг.5В представлено діаграму спірального колеса Шиффера-Едмундсона корового пептиду 146 SEQ ID NO: 146).

На Фіг.6 представлено комп'ютерну модель двох пептидів 146 (SEQ ID NO: 146), організованих анти паралельно, в яких залишки Glu-7 і Gin-18 виділені, щоб показати здатність цих двох пептидів утворювати міжмолекулярні водневі зв'язки, перебуваючи в стані, пов'язаному з ліпідами.

На Фіг.7А представлено тетрамірну структуру винаходу.

На Фіг.7В представлено сумарно розгалужену структуру винаходу.

На Фіг.7С представлено змішану розгалужену структуру винаходу.

На Фіг.7D представлено приклад ("Lys-дерево") розгалуженої мережі структури винаходу.

На Фіг.8А представлено графік, що ілюструє різницю між тим, що спостерігається на хімічним зміщенням і випадковим табульованим на хімічним зміщенням для пептиду 146 (SEQ ID NO: 146) і для узгодженого пептиду Сергеста (SEQ ID NO:75).

На Фіг.8В представлено графік, що ілюструє різницю між хімічним зміщенням амідного протону, що спостерігається і табульованим випадковим хімічним зміщенням амідного протону для пептиду

146 (SEQ ID NO: 146) і узгодженого пептиду Сергеста (SEQ ID NO:75).

На Фіг.8С представлено графік порівняння хімічного зсуву повторного амідного протону для пептиду 146 (SEQ ID NO: 146) з таким для ідеальної α -спіралі (в ідеальній спіралі гідрофільні залишки - незаштриховані кільця, гідрофобні - заштриховані кільця).

На Фіг.9 представлено графік, що показує профіль ліпопротеїнів у кроля, якому ввели в дозі 8мг/кг тіла пептид 146 (SEQ ID NO: 146) (в формі комплексу пептид/DPPC).

На Фіг.10 представлено фігуру, що показує різні стани агрегації і ліпидопептидних комплексів, які можна отримати з агоністами АроА-І винаходу. Зліва: Процес мультимеризації пептидів, є результатом взаємодії декількох пептидних спіралей і що призводить до формування олігомерів за умови певної концентрації пептиду, рН і іонної сили.

У центрі: Взаємодія пептидів (в будь-якому стані агрегації) з ліпідними об'єктами (наприклад з SUV), що призводить до реорганізації ліпідів.

Праворуч: Шляхом зміни молярного відношення ліпід:пептид можна отримати різні типи пептид-ліпідних комплексів, від ліпід-пептидних коміцел за низьких співвідношень ліпід:пептид до дископодібних часток, і нарешті, до великих мультиламелярних комплексів за дуже великих ліпід-пептидних співвідношень.

На Фіг.10В представлено загальноприйняту модель дисковидних пептид-ліпідних комплексів, що утворюється в певних межах ліпід:пептидних співвідношень. Кожний пептид, навколишній край диска, знаходиться в близькому контакті з двома своїми найближчими сусідами.

5. Докладний опис винаходу

Агоністи АроА-І винаходу мімікують функцію і активність АроА-І. Вони утворюють амфіпатичні спіралі (в присутності ліпідів), зв'язують ліпіди, утворюють пре- β -подібні або ЛПВЩ подібні комплекси, активують LCAT, збільшують сироваточну концентрацію ЛПВЩ і посилюють вихід холестерину. Біологічна функція пептидів корелює з їх спіральною структурою або з перетворенням в спіральну структуру в присутності ліпідів.

Агоністи АроА-І винаходу можуть бути отримані в стабільній масі або в дозованих формах, наприклад, ліофілізовані продукти, які можуть бути відновлені перед вживанням *in vivo* або перерформульовані. Винахід включає фармацевтичні склади і їх використання в лікуванні гіперліпідемії, гіперхолестеринемії, коронарних порушень, атеросклерозу і інших випадків, наприклад, ендотоксемії, що викликає септичний шок.

Винахід проілюстрований робочими прикладами, які показують, що АроА-агоністи винаходу високо ефективні як активатори LCAT і таким чином, посилюють ЗТХ. Застосування агоністів АроА-І винаходу *in vivo* в моделях на тваринах призводить до збільшення концентрації сироваточних ЛПВЩ.

Більш детально винахід описаний нижче в 4 розділах, які описують склад і структуру пептидних агоністів АроА-І, їх структурну і функціональну характеристику, способи отримання в обсязі і в раціональних дозах і способи застосування.

5.1. Структура і функція пептидів

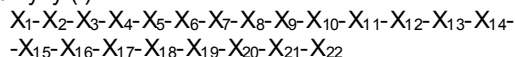
Агоністи АроА-І винаходу це в основному пептиди або їх аналоги, які здатні утворювати амфіпатичні α -спіралі в присутності ліпідів, і які мімікують риси корового пептиду, що складається з 15-29 амінокислотних залишків, переважно 22 амінокислотних залишки, або аналоги таких пептидів, у яких принаймні один амідний зв'язок в пептиді замінено заміщенням амідом, ізостером амиду або амідомиметиком.

Агоністи АроА-І винаходу засновані, зокрема, на несподіваному відкритті заявників, що зміна певних амінокислотних залишків в первинній послідовності 22-членних узгоджених послідовностях (Verikatachalapathi et al., 1991 Mol. Conformation and Biol. Interaction, Indian Acad. Sci., B: 585-596 (PVLDEFREKLNEELEALKQKLLK; SEQ ID NO:75, далі будемо називати "консенсусний 22-мір Сергеста", або "консенсусний 22-заходів", які, як вважають, є надзвичайно важливими для отримання синтетичних пептидів, що мають активність, що наближається до активності, а іноді і перевершуючу активність нативного АроА-1. Зокрема, заявники відкрили, що внаслідок заміщення трьох заряджених амінокислот в послідовності 22-міра Сергеста (Glu-5, Lys-9 і Glu-13) на гідрофобний Leu, виходять пептиди, які мімікують структурні і функціональні властивості АроА-1 із мірою, несподіваною в даній області.

Вважають, що спіраль, сформована АроА-І агоністами винаходу може сильно нагадувати структурні і функціональні властивості амфіпатичних спіральних дільниць нативного АроА-І, які важливі для ефективного скріплення з ліпідами, виходу холестерину і активації LCAT, те ж саме робить α -спіраль, сформована з пептидів-миметиків АроА-І, вже описана в літературі, але виходить, що пептиди винаходу мають значно більш високу АроА-І-подібну активність, чим вже описані інші пептиди. Насправді, багато які агоністи АроА-І винаходи наближаються до активності АроА-І і навіть перевищують її; кращим пептидом-миметиком АроА-І, описаним в літературі, є пептид 18АМ4 (EWLEAFYKKVLEKLKELF; SEQ ID NO: 246) (Corinjn et al., 1993, Biochim., Biophys. Acta 1170:8-16; Labeur et al., 1994,

Arteriosclerosis; Abstract Nos 186 and 187) і N-ацетильований, C-амідований пептид 18АМ4 (SEQ ID NO: 239) (Brasseur, 1993, Biochim., Biophys. Acta 1170:1-7), ці пептиди показали активність 4% і 7% відповідно від активності АроА-І в тесті активації LCAT, описаному тут.

У одному ілюстративному втіленні винаходу корові пептиди (або їх аналоги), які формують агоністів АроА-І винаходу, мають наступну структурну формулу (I):



де X_1 являє собою Pro (P), Ala (A), Gly (G), Gin (Q), Asn (N), Asp або D-Pro (p)

X_2 являє собою аліфатичну амінокислоту

X_3 являє собою Leu (L) або Phe (F)

X_4 являє собою Glu (E)

X_5 являє собою аліфатичну амінокислоту

X_6 являє собою Leu (L) або Phe (F)

X_7 являє собою Glu (E) або Leu (L)

X₈ являє собою Asn (E) або Gln (Q)
 X₉ являє собою Leu (L)
 X₁₀ являє собою Leu (L), Trp (W) або Gly (G)
 X₁₁ являє собою кислу амінокислоту
 X₁₂ являє собою Arg (R)
 X₁₃ являє собою Leu (L) або Glu (E)
 X₁₄ являє собою Leu (L), Phe (F) або Gly (E)
 X₁₅ являє собою Asp (D)
 X₁₆ являє собою Ala (A)
 X₁₇ являє собою Leu (L)
 X₁₈ являє собою Asn (N) або Gln (Q)
 X₁₉ являє собою основну амінокислоту
 X₂₀ являє собою основну амінокислоту
 X₂₁ являє собою Leu (L)
 X₂₂ являє собою основну амінокислоту

Корові пептиди структури (I) визначають за амінокислотами, позначених класів. Визначення різних позначених класів амінокислот представлені нижче в зв'язку з описом мутантних або змінених втілень структури (I).

У корових пептидів структури (I) символ "-" між амінокислотними залишками X_n загалом означає наявність структурного постійного зв'язку. Т.ч. символ "-" звичайно показує пептидний зв'язок, або амідний зв'язок, (C(O)NH-). Даний винахід пропонує також пептидні аналоги, в яких один або більше амідних зв'язків необов'язково заміщені не амідним зв'язком, переважно заміщеним амідом або ізостером амиду. Різні X_n залишки в структурі (I) загалом описані як амінокислоти, в переважному втіленні винаходу проілюстровані прикладами, і фахівець в цій області дізнається про ті втілення, які мають неамідні зв'язки; термін "амінокислота" або "залишок" використовується тут і для інших біфункціональних несучих груп, схожих за структурою бокових ланцюгів на амінокислоти.)

Заміщені аміди загалом включають, не обмежуючись ними, групи наступної формули: -C(O)NR-, де R являє собою (C₁-C₆) алкильну, заміщену (C₁-C₆) алкильну, (C₁-C₆) алкенильну, заміщену (C₁-C₆) алкенильну, (C₁-C₆) алкінільну, (C₁-C₆) заміщену алкінільну, (C₅-C₂₀) арильну, (C₆-C₂₆) алкарильну, заміщену (C₆-C₂₆) алкарильну, 5-20 членну гетероарильну або 6-26 членну алкгетероарильну і заміщену 6-26 членну алкгетероарильну групи.

Ізостери амиду загалом включають, не обмежуючись ними -CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH- (цис, транс), -C(O)CH₂-, -CH(OH)CH₂-, -CH₂SO-. З'єднання, що мають такі неамідні зв'язки і способи їх отримання добре відомі в даній області (Spatola, March 1983, Vega Data Vol. 1, Issue 3; Spatola 1983 "Peptide Backbone Modifications" In: Chemistry and Biochemistry of Ammo Acids, Peptides and Proteins, Weinstein, ed., Marcel Dekker, New York, 267 (загальний огляд); Morley, 1980 Trends Pharm Sci, 1: 463-468; Hudson et al., 1979, Int. J. Prot. Res, 14: 177-185 (-CH₂NH-, -CH₂CH₂-), Spatola et al., 1986, Life Sci 38: 1243-1249 (-CH₂S-,) Hann, 1982 J. Chem. Soc. Perkin Trans.I. 1: 307-314 (-CH=CH-, цис, транс), Almquist et al., 1980, J. Med. Chem 23: 1392-1398 (-COCH₂-); Jennings-White et al. Tetrahedron. Lett. 23: 2533 (-COCH₂-), European Patent Application EP 45665 (1982) CA 97:39405 (-CH(OH)CH₂-), Holladay et al., Tetrahedron. Lett

24:4401-4404 (-CH(OH)CH₂-), Hruby, 1982, Life Sci. 31:189-199 ((-CH₂S-).

Крім того, один або більше амідних зв'язків може бути заміщений пептидомиметиками або амідомиметиками, які незначно впливають на структуру або активність пептидів. Зручні частини амідомиметиків описані, наприклад, Olson et al, 1993, J. Med. Chem. 36: 3039-3049.

Надзвичайно важливою рисою корових пептидів структури (I) є їх здатність утворювати амфіпатичні α-спіралі в присутності ліпідів. Під амфіпатичністю розуміють те, що α-спіраль має протистоячі гідрофобну і гідрофільну поверхні, орієнтовані вздовж своєї довгої осі, тобто одна поверхня спіралі проектує в основному гідрофільні бокові ланцюги, а протилежна поверхня проектує в основному гідрофобні ланцюги. Фіг.1A і 1B показують два вигляди протистоячих гідрофільної і гідрофобної поверхонь на прикладі ідеальної амфіпатичної α-спіралі. Фіг.1A це діаграма спірального колеса Шиффера-Едмундсена (Schiffer & Edmundson, 1967, Biophys. J. 7:121-135). В колесі, довга вісь спіралі направлено перпендикулярно сторінці. Починаючи з N-кінців наступні один за одним амінокислотні залишки (показані кружками) радіально розходяться по периметру кола з інтервалами в 100°. Таким чином, залишок n+1 розташований на 100° від залишку n, залишок n+2 розташований на 100° від залишку n+1, і т.д. 100° розташування означає наявність 3,6 амінокислотних залишків на поворот, що звичайно і спостерігається в ідеальній α-спіралі. На Фіг.1A протистоячі гідрофільна і гідрофобна поверхні спіралі добре видно, гідрофільні амінокислоти показані незаштрихованими кружками, гідрофобні - заштрихованими кружками.

Фіг.1B показує діаграму спірального ланцюга ідеальної амфіпатичної спіралі Фіг.1A (Lim, 1978, FEBS Lett. 89:10-14). У типовій діаграмі спірального ланцюга α-спіраль представлено у вигляді циліндру, який розрізаний вздовж центру своєї гідрофільної поверхні і сплющено. Таким чином, центр гідрофобної поверхні, що визначається гідрофобним моментом спіралі (Eisenberg et al., 1982, Nature 299:371-374) лежить в центрі фігури і орієнтований таким чином, що ніби-то зростає на плані сторінки. Фігура спірального циліндру, який було розрізано і сплющено показано на Фіг.1C. Різні види однієї і тієї ж амфіпатичної спіралі можна отримати, розрізавши циліндр вздовж різних площин і таким чином отримати різну інформацію про властивості спіралі.

Амфіпатична природа α-спіралі, утвореної коровими пептидами структури (I) в присутності ліпідів, зображена на Фіг.2. Фіг.2A показує діаграму колеса спіралі Шиффера-Едмундсена, Фіг.2B показує діаграму спіральної мережі, що зображають гідрофобну поверхню, і Фіг.2C показує діаграму спірального ланцюгу, що зображають гідрофільну поверхню. На кожній фігурі 2A, 2B і 2C гідрофільні залишки показані незаштрихованими кружками, гідрофобні - заштрихованими кружками, і залишки які можуть бути і гідрофобними і гідрофільними, заштриховані не повністю. Далі будуть обговорюватися більш детально змінені або мутантні форми пептидів структури (I), визначені амінокислотні залишки можуть бути заміщені іншими амінокис-

лотними залишками так, щоб гідрофобна і гідрофільна поверхні спіралі, сформованої пептидами, не складались тільки з гідрофобних або гідрофільних амінокислот. Зрозуміло, що для амфіпатичної спіралі, утвореної коровими пептидами даного винаходу, вираз "гідрофільна поверхня" відноситься до поверхні спіралі, яка має мережу в цілому гідрофільного характеру. Вираз "гідрофобна поверхня" відноситься до поверхні спіралі, яка має мережу в цілому гідрофобного характеру.

Вважають, що певні структурні і/або фізичні властивості амфіпатичної спіралі, утвореної коровими пептидами структури (I), важливі для вияву активності. Такі властивості включають: міру амфіпатичності, загальну гідрофобність, значення гідрофобності, гідрофобний і гідрофільний кути, гідрофобний момент, значення гідрофобного моменту, заряд мережі α -спіралі.

Діаграма колеса спіралі на Фіг.2A зручна для розгляду амфіпатичної природи корових пептидів структури (I), міра амфіпатичності (міра асиметрії або гідрофобності) можна зручно виміряти за допомогою підрахунку гідрофобного моменту (μ_n) спіралі. Спосіб для підрахунку μ_n для окремої послідовності пептиду добре відомий в даній області і описаний, наприклад, Eisenberg, 1984, *Ann. Rev. Biochem.* 53: 595-623. Істинний μ_n отриманий для окремого пептиду, буде залежати від загальної кількості амінокислотних залишків, що складають пептид. Таким чином, загальною прямою порівняння μ_n для пептидів різних довжин не є інформативним.

Амфіпатичність пептидів різних довжин можна порівняти прямо за допомогою вимірювання гідрофобного моменту ($\langle \mu_n \rangle$). Значення гідрофобного моменту отримують шляхом розділення μ_n на число залишків в спіралі (тобто $\langle \mu_n \rangle = \mu_n / N$). Загалом вважають, що корові пептиди, що мають $\langle \mu_n \rangle$ в межах 0,45-0,65, що визначений за допомогою нормалізованої узгодженої шкали гідрофобності Ейзенберга (Eisenberg, 1984, *J.Mol. Biol.* 179: 125-142) знаходяться в межах даного винаходу, причому $\langle \mu_n \rangle$ в межах від 0,50 до 0,60 переважні.

Загальна або тотальна гідрофобність (H_o) пептиду зручно підрахувати, взявши алгебраїчну суму гідрофобності кожного амінокислотного залишку в

пептиді (тобто $H_o = \sum_{i=1}^N H_i$), де N є числом амінокис-

лотних залишків в пептиді і H_i являє собою гідрофобність i -того амінокислотного залишку. Значення гідрофобності $\langle H_o \rangle$ являє собою гідрофобність, ділену на кількість амінокислотних залишків ($\langle H_o \rangle = H_o / N$). Загалом вважають, що корові пептиди зі значенням гідрофобності в межах від -0,050 до -0,070, яка визначена з використанням нормалізованої шкали Ейзенберга (Eisenberg, 1984, *J.Mol. Biol.* 179:125-142), знаходяться в межах даного винаходу, і значення гідрофобності в межах від -0,030 до -0,055 переважні.

Загальна гідрофобність гідрофобної поверхні (H_o^{pho}) амфіпатичної спіралі можна отримати, взявши суму гідрофобностей гідрофобних амінокислотних залишків, які попадають в гідрофобний кут,

як визначено нижче (тобто $H_o^{pho} = \sum_{i=1}^N H_i$), де H_i така,

як вже була визначена, N_n - загальне число гідрофобних амінокислот в гідрофобній поверхні). Значення гідрофобності гідрофобної поверхні H_o^{pho} являє собою H_o^{pho} / N_n , де N_n таке, як визначено вище. Загалом вважають, що корові пептиди, що мають $\langle H_o^{pho} \rangle$ в межах від 0,90 до 1,2, визначене за допомогою шкали гідрофобності Ейзенберга (Eisenberg, 1984, *supra*; Eisenberg, 1982, *supra*) знаходяться в межах даного винаходу, і $\langle H_o^{pho} \rangle$ в межах від 0,940 до 1,10 переважно.

Гідрофобний кут (ρ о кут) загалом визначають як кут або арг покритий найдовшим розтягненням гідрофобних амінокислотних залишків, коли пептид організований в представлений спірального колеса Шиффера-Едмундсена (тобто число суміжних гідрофобних залишків колеса помножене на 20°). Гідрофільний кут (ϕ і кут) це різниця між 360° і ρ о кутом (тобто 360° - ρ о кут). Фахівці в цій області знають, що ρ о і ϕ і кути будуть залежати, зокрема, від числа амінокислотних залишків в пептиді. Наприклад, на Фіг.5A і 5B видно, що тільки 18 амінокислот заповнюють одне обертання спірального колеса Шиффера-Едмундсена. При меншій кількості амінокислот залишається пролом в колесі; при більшій кількості амінокислот виходить, що в певних положеннях колеса знаходиться більше одного амінокислотного залишок. Для пептидів, що містять більше 18 амінокислотних залишків, таку корову пептиди структури (I), суцільне витягнення гідрофобних амінокислотних залишків означає, що, принаймні, один амінокислотний залишок в положеннях вздовж колеса, зайнятий двома або більш амінокислотами, являє собою гідрофобну амінокислоту. Так на Фіг.5B ρ о кут є арг, перекритий залишками 5, 16, 9, 2, 13, 6, 17, 10, 3 і 14 всупереч наявності гідрофільного залишку в положенні 20 і залишку в положенні 2, який займає те ж положення в колесі що і залишок 20, будучи гідрофобним залишком. Типово, що корові пептиди, що мають ρ о кут в межах від 160° до 220° знаходяться в межах даного винаходу, і переважний ρ о кут знаходиться в межах від 180° до 200°.

Певні структурні і/або фізичні характеристики корових пептидів структури (I) зображені на Фіг.3 і 4. Фіг.3B показує спіральну мережеву діаграму ілюстративного корового пептиду даного винаходу, пептиду 146 (PVLELFENLLERLLDALQKKLK; SEQ ID NO:146), і показує розподіл заряду вздовж гідрофільної поверхні спіралі. На Фіг.3B спіральний циліндр розрізаний вздовж центра гідрофобної поверхні і сплющено. Три гідрофобних залишки Leu (L), які заміняють гідрофільні залишки в послідовності Сергеста (Фіг.3A) заштриховані. Як показано на Фіг.3B, позитивно заряджені амінокислотні залишки кластеризовані біля останнього С-кінцевого повороту спіралі (С-кінець знаходиться вгорі сторінки). Вважають, що цей кластер основних залишків з С-кінця (залишки 19, 20 і 22) стабілізують спіраль за допомогою зарядів (NH_3^+ сираль-дипольних електростатичних взаємодій. Також існує думка, що стабілізація здійснюється через гідрофобні взаємодії між лізином бокових ланцюгів і кором спіралі (Groebke et al., 1996, *PNAS USA*, 93: 402P 4029; Esposito et al., 1997, *Biopolymers* 41: 27-35).

За винятком позитивно-зарядженого С-кінцевого кластеру, негативні заряди поширені на гідрофільній поверхні, що залишилася, принаймні, один негативно (кислий) амінокислотний залишок на поворот, що призводить до появи безперервного тяжу з негативних зарядів вздовж гідрофільної поверхні спіралі. Один позитивний заряд розташований у залишку 12, він потенційно робить внесок в стабілізацію спіралі за допомогою формування сольового містка з кислим залишком через один поворот по спіралі.

Фіг.4В показує діаграму спірального ланцюга, зображуючи гідрофобну поверхню амфіпатичної спіралі, створеної ілюстративним коровим пептидом SEQ ID NO: 146). На Фіг.4В спіральний циліндр розрізано вздовж центру гідрофільної поверхні і сплющено. Гідрофобна поверхня корового пептиду складається з двох гідрофобних залишків на поворот, за винятком останнього С-кінцевого повороту, де переважають основні залишки. ЯМР дослідження показали, що амінокислотні залишки 3, 6, 9, 10 цього корового пептиду утворюють гідрофобний кластер біля N-кінця спіралі. Phe-6 розташовується в центрі цього кластеру і, як вважають, грає важливу роль в стабілізованні гідрофобного кластеру.

Вважають, що гідрофобний кластер, сформований залишками 3, 6, 9 і 10 має велике значення при ефективному скріпленні ліпідів і LCAT активації. Очікують, що амфіпатичні пептиди зв'язують фосфоліпіди, розташовуючи свої гідрофобні поверхні у напрямі до алкільних ланцюгів ліпідної частини. Т.ч. вважають, що цей високо гідрофобний кластер робить внесок в сильну афінність до ліпідів, яка спостерігається у корових пептидів даного винаходу. Оскільки скріплення з ліпідом є умовою активації LCAT, вважають, що гідрофобний кластер також необхідний і для активації LCAT.

Часто виявляють, що ароматичні залишки важливі в скріпленні пептидів і білків з ліпідами (De Kruijff, 1990, Biosci. Rep.10. -127-130, O'Neil De Grado, 1990, Science 250: 645-651; Blondelle et al., 1993, Biochim. Biophys. Acta 1202: 331-336). Т.ч., далі вважають, що Phe-6, який розташований в центрі гідрофобного кластеру, також може відігравати важливу роль в скріпленні корових пептидів структури (I) з ліпідами.

Взаємодія між коровими пептидами винаходу і ліпідами призводить до утворення пептид-ліпідного комплексу. На Фіг.10А показані види комплексів (коміцели, диски, везикули або мультишари), що отримуються в залежності від ліпід:пептидного молярного співвідношення, коміцели звичайно утворюються при низьких ліпід:пептидних співвідношеннях, диски, везикули і мультишарові комплекси утворюються при збільшенні ліпід:пептидного молярного співвідношення. Такі характеристики для амфіпатичних пептидів описані (Erand, The Amphipathic Helix, 1993) і для ApoA-I (Jones, Structure and Function of Apolipoproteins, Ch.8: 217-250). Ліпід:пептидне молярне співвідношення також визначає розмір і композицію комплексів (Section 5.3.1., *infra*).

Довга вісь α -спіралі, утвореної коровими пептидами структури (I) має загалом форму, що вигинається. Для типових амфіпатичних спіралей ви-

явлено, що довжини водневих зв'язків гідрофільних і гідрофобних поверхонь варіюють таким чином, що гідрофобний бік спіралі увігнутий (Barlow & Thornton, 1989, J.Mol. Biol 201: 601-619; Zhou et al., 1992, J.Am. Chem. Soc. 33: 11174-11183; Gesell et al., 1997, J.Biomol. NMR 9: 127-135). Вважають, що загальна увігнутість гідрофобної поверхні спіралі може бути важливою для скріплення дископодібних комплексів - викривлена спіраль дозволяє пептиду прилягати краще навколо кромки дисковидних часток, таким чином, посилюючи стабільність комплексу пептид-диск.

У загальноприйнятій структурній моделі ApoA-I амфіпатичні α -спіралі упаковані навколо краю дисковидного ЛПВЩ (Фіг.10В). В цій моделі передбачається, що спіралі вирівнюються своїми гідрофобними поверхнями спрямованими до ацильних ланцюгів ліпиду (Brasseur et al., 1990, Bioch. Bioph. Acta 1043: 245-252). Спіралі організовані антипаралельно і вважають, що кооперативний ефект між спіралями робить внесок в стабільність дисковидного ЛПВЩ комплексу. (Brasseur et al., *supra*). Припустили, що одним з чинників, який робить внесок в стабільність ЛПВЩ дисковидного комплексу, є наявність іонних взаємодій між кислими і основними залишками, що веде до утворення внутрішньомолекулярних сольових містків або водневих зв'язків між залишками на суміжних антипаралельних спіралях. У цій моделі вважають, що пептиди не є єдиним об'єктом, а важливі у взаємодії з принаймні двома іншими сусідніми пептидними молекулами (Фіг.10В).

Також загально прийнято, що внутрішньомолекулярні водневі зв'язки або сольові містки між кислими і основними залишками, відповідно в положеннях і та і+3 спіралі, стабілізують спіральну структуру (Marqusee et al., 1985 PNAS USA 84 (24): 8898-8902).

Крім того, додатковими важливими рисами корових пептидів структури (I) є їх здатність до утворення внутрішньомолекулярних водневих зв'язків один з одним, коли вони витягуються антипаралельним чином своїми гідрофобними поверхнями спрямованими в один бік, це буде в тому випадку, коли пептиди пов'язані з ліпідами (тобто між кислими залишками в положеннях 4 і 7 і основними залишками в положеннях 19, 20 і 22), і також їх здатність до утворення внутрішньомолекулярних водневих зв'язків або сольових містків біля N- і С-кінців спіралі.

Здатність корових пептидів структури (I) утворювати внутрішньомолекулярні водневі зв'язки показано на Фіг.6. На Фіг.6 дві ідеальні α -спіралі ілюстративного корового пептиду 146 (SEQ ID NO 146) антипаралельно витягнуті, і їх гідрофобні поверхні відповідно направлені в один бік (від поверхні сторінки). Н-зв'язуючі взаємодії можуть існувати між залишками E-7 і Q-18 (Huynh-Van et al., 1995, Biochemistry 34 (41): 13267-13271).

Крім того, при організації таким антипаралельним способом спіралі щільно упаковані, і не існує перешкод для близького контакту між спіралями. Зміни в послідовності корових пептидів, які впливають на упаковку спіралі, негативно впливають і на активність корових пептидів.

Вважають, що здатність корових пептидів структури (I) щільно упаковуватися і взаємодіяти іонним чином з утворенням всередині/і міжмолекулярних сольових містків і/або водневих зв'язків, при скріпленні з ліпідом антипаралельним чином являє собою важливу рису корових пептидів винаходу.

Також вважають, що здатність корових пептидів мати бажані внутрішньомолекулярні пептид-пептидні взаємодії доречно і при відсутності ліпідів. Корові пептиди винаходу є самоорганізуючимися завдяки високим значенням $\langle \mu_H \rangle$, $\langle H_O \rangle$ і гідрофобного кута (Табл. I, *infra*). Явище самоасоціації залежить від умов pH, концентрації пептидів і іонної сили, і призводить до декількох станів асоціації, від мономерної до декількох мультимерних форм (Fig. 10A). Гідрофобний кор пептидних агрегатів сприяє гідрофобним взаємодіям з ліпідами. Здатність пептидів агрегувати навіть при низьких концентраціях сприяє скріпленню з ліпідами. Вважають, що в корі пептидних агрегатів пептид-пептидні взаємодії також існують і можуть конкурувати з ліпід-пептидними взаємодіями.

У доповнення до вище перелічених властивостей вважають, що і інші параметри також важливі для активності, включаючи загальну кількість гідрофобних залишків, загальну кількість заряджених залишків і заряд пептидного ланцюгу.

Узагальнення переважних фізичних і структурних властивостей корових пептидів структури (I) зібрано в Таблиці I, наведеній нижче:

Таблиця I

Фізичні властивості
переважних агоністів АроА-I структури (I)

Властивість	Межі	Переважні межі
% гідрофобних амінокислот	40-70	50-60
$\langle H_O \rangle$	-0,050 - -0,070	-0,030 - -0,055
$\langle H_O^{H_2O} \rangle$	0,90-1,2	0,94-1,1
$\langle \mu_H \rangle$	0,45 -0,65	0,50 -0,60
rho кут	160°-220°	180°-200°
Кількість позитивно заряджених амінокислот	3-5	4
кількість негативно заряджених амінокислот	3-5	4
заряд ланцюга	-1 до +1	0
гідрофобний кластер	положення 3, 6, 9, 10 є гідрофобними амінокислотами	
кислий кластер	принаймні, 1 кисла амінокислота на поворот за винятком 5 C-кінцевих амінокислот	
основний кластер	принаймні, 3 основних амінокислоти останніх 5 C-кінцевих амінокислотах	

Властивості амфіпатичних α -спіралей, утворених коровими пептидами винаходу значно відрізняються від властивостей амфіпатичних α -спіралей класу А узгодженого 22-міру Сегреста. Ці відмінності показано на ілюстративному коровому пептиді 146 (SEQ ID NO: 146) на фігурах 3-5.

На Фіг.4А і 4В видно, що гідрофобна поверхня пептиду 146 має значно більше за гідрофобний характер, ніж гідрофобна поверхня 22-міру Сегреста. Зокрема, залишки 5, 9 і 13 (зафарбовані на Фіг.4В) являють собою гідрофобні залишки Leu (L) пептиду 146 в порівнянні із зарядженими залишками 22-міру (SEQ ID NO: 75). Заміщення цих

трьох заряджених залишків в 22-мірі Сегреста на гідрофобний Leu (L) приводить до значних змін в амфіпатичності, гідрофобності, rho куті і інших властивостях спіралі.

Порівняння фізичних і структурних властивостей пептиду 146 і 22-міра Сегреста наведено в Таблиці II, приведеній нижче:

Таблиця II

Порівняння властивостей ілюстративного корового пептиду 146 (SEQ ID NO: 146) і узгодженого 22-міру Сегреста (SEQ ID NO: 75)

Властивість	22-мір Сегреста	Пептид 146
кількість амінокислот	22	22
кількість гідрофільних амінокислот	13	10
кількість гідрофобних	9	12
% гідрофобних амінокислот	41	55
$\langle H_O \rangle$	-0,293	-0,013
$\langle H_O^{H_2O} \rangle$	0,960	0,990
$\langle \mu_H \rangle$	0,425	0,577
rho кут	100°	200°
кількість позитивно заряджених	5	4
кількість негативно заряджених	6	4
заряд ланцюга	-1	0

Потрібно зазначити, що корові пептиди структури (I) складаються з більшої кількості гідрофобних залишків, мають значно більші значення $\langle H_O \rangle$ і $\langle \mu_H \rangle$ і мають в два рази більший кут rho в порівнянні з 22-міром Сегреста (Fig. 5A і 5B). Ці відмінності у властивостях призводять до значних відмінностей в активності. Так 22-мір Сегреста має 10% активацію LCAT в порівнянні з нативним АроА-I в тестах, приведених тут, пептид 146 показує 86% активність порівняно з нативним АроА-I в цих же тестах. Пептид 144 (pVLELFENLLERLLDALQKCLK, SEQ ID NO:144), який відрізняється від 146 тільки наявністю D-Pro(p) в позиції X₁ показує 111% LCAT активацію в порівнянні з нативним АроА-I в цих же тестах.

Певні амінокислотні залишки в корових пептидах структури (I) можуть бути заміщені іншими амінокислотними залишками без значних втрат, а в деяких випадках навіть посилюють активність цих пептидів. Т.ч. в даний винахід також входять змінні або мутантні форми корових пептидів структури (I), де принаймні одну певну амінокислоту в структурі замінено іншим амінокислотним залишком. Вважають, що однієї з критичних рис, що впливають на активність корових пептидів винаходу, є їх здатність утворювати α -спіралі в присутності ліпідів, про що говорить їх амфіпатичність і інші властивості описані вище, також буде визначено, що в переважних втіленнях винаходу амінокислотні заміщення консервативні, тобто переважно, щоб заміняюча амінокислота мала ті же фізичні і хімічні властивості, що і заміщена амінокислота.

Для визначення консервативних амінокислотних заміщень, амінокислоти були зручно класифіковані на дві головні категорії - гідрофільні і гідрофобні - в залежності, насамперед, від фізико-хімічних характеристик бокового ланцюга амінокислоти. Ці дві головні категорії далі можуть бути розділені на субкатегорії, які більш точно визначають характеристики амінокислотного бокового ланцюга. Наприклад, клас гідрофільних амінокислот можна поділити на кислі, основні і полярні аміно-

кислоти. Клас гідрофобних амінокислот можна поділити на неполярні і ароматичні амінокислоти. Визначення різних категорій амінокислот, які визначають структуру (I), являють собою наступні:

"Гідрофільна амінокислота" стосується амінокислоти, що має гідрофобність менше за 0 за нормалізованою узгодженою шкалою Ейзенберга (Eisenberg et al., 1984, J.Mol. Biol. 179:125-142). Гідрофільні амінокислоти, що генетично кодуються включають: Thr (T), Ser (S), His (H), Glu (G), Asn (N), Gin (Q), Asp(D), Lys (K), Arg (R).

"Кисла амінокислота" стосується гідрофільної амінокислоти, що має значення pK бокового ланцюга менше за 7. Кислі амінокислоти звичайно мають негативно заряджені бокові ланцюги при фізіологічному pH завдяки нестачі іонів водню. Кислі амінокислоти, що генетично кодуються включають: Glu (G), Asp(D).

"Основна амінокислота" стосується гідрофільної амінокислоти, що має значення pK бокового ланцюга більше за 7. Основні амінокислоти звичайно мають позитивно заряджені бічні ланцюги при фізіологічному pH завдяки асоціації в іон гідронію. Кислі амінокислоти, що генетично кодуються включають: His (H), Arg (R), Lys (K).

"Полярна амінокислота" відноситься до гідрофільної амінокислоти, що має боковий ланцюг не заряджений при фізіологічному pH, але яка має принаймні один зв'язок в якому пара електронів поділена між двома атомами і зміщена до одного з атомів. Полярні амінокислоти, що Генетично кодуються включають: Gln (Q), Asn (N), Ser(S), Thr(T).

"Гідрофобна амінокислота" стосується амінокислоти, що має гідрофобність більше 0 за нормалізованою узгодженою шкалою Ейзенберга (Eisenberg et al, 1984, J.Mol. Biol. 179:125-142). Гідрофобні амінокислоти, що генетично кодуються включають: Pro (P), He (I), Phe (P), Val (V), Leu (L), Trp (W), Met (M), Ala (A), Gly(G), Tyr (Y).

"Ароматична амінокислота" стосується гідрофобної амінокислоти, чий боковий ланцюг має принаймні одне ароматичне або гетероароматичне кільце. Ароматичні або гетероароматичні кільця можуть містити один або більше заступників, таких як -BH, -SH, -CN, -F, -Cl, -BR, -I, -NO₂, -NO, -NH₂, -NHR, -NRR, -C(O)R, -C(O)OH, -C(O)OR, -C(O)NH₂, -C(O)NHR, -C(O)NRR і т.п., де кожний R являє собою незалежно (C₁-C₆) алкіл, заміщений (C₁-C₆) алкіл, (C₁-C₆) алкенил заміщений (C₁-C₆) алкенил (C₁-C₆) алкініл або заміщений (C₁-C₆) алкініл (C₁-C₆) арил заміщений (C₅-C₂₀) арил (C₆-C₂₆) алкарил заміщений (C₆-C₂₆) алкарил, 5-20 членний гетероаріл, 6-26 членний алкгетероаріл або заміщений 6-26 членний алкгетероаріл. Ароматичні амінокислоти, що генетично кодуються включають Phe (F), Tyr (Y), Trp (W).

"Неполярна амінокислота" стосується гідрофобної амінокислоти, боковий ланцюг якої не заряджено при фізіологічних значеннях pH, і який має зв'язок, в якому пара електронів об'єднана у двох атомів і загалом рівномірно розподілена між цими двома атомами (тобто боковий ланцюг не є полярним). Неполярні амінокислоти, що генетично кодуються включають Leu (L), Val (V), Ile(I), Met(M), Gly(G), Ala (A).

"Аліфатична амінокислота" стосується гідрофобної амінокислоти, що має алифатичний вуглеводневий боковий ланцюг. Алифатическі амінокислоти, що Генетично кодуються включають Leu (L), Val (V), Ile(I), Ala(A).

Амінокислотний залишок Cys (C) є незвичайним, оскільки є здатним утворювати дисульфідні містки з іншими Cys (C) залишками або іншими амінокислотами, що містять сірку. Здатність Cys (C) залишків (або інших амінокислот з -SH утримуваними боковими ланцюгами) існувати в пептиді або у відновленому вигляді у вільних -SH або в окисленому вигляді в дисульфідних містках впливає на те, що залишки Cys (C) впливають на гідрофобний або гідрофільний характер ланцюга пептиду. Cys показує гідрофобність 0,29 за шкалою Ейзенберга (Eisenberg, 1984, supra), і зрозуміле, що з метою даного винаходу Cys (C) привласнюють категорію полярної гідрофільної амінокислоти, що не входить в загальну класифікацію, описану вище.

Фахівці в цій області розуміють, що описані вище категорії не є загальним винятком. Так, амінокислоти з боковим ланцюгом, що має дві або більш фізико-хімічних властивості можуть бути включені в декілька категорій. Наприклад, амінокислоти з боковими ланцюгами, що мають ароматичні частини, які потім замінюються полярними заміниками, такі як Tyr (Y), можуть мати як ароматичні гідрофобні властивості, так і полярні гідрофільні властивості, і т.ч. можуть бути включені і в ароматичну і в полярну категорії. Відповідна категоризація будь-якої амінокислоти очевидна для фахівців в даній області, особливо в світлі детального опису, що наводиться тут.

Певні амінокислотні залишки, звані "зломщики спіралі" мають властивість порушувати структуру α-спіралі, коли займають внутрішні положення всередині спіралі. Амінокислоти, що мають такі спіраль руйнуючі властивості добре відомі в даній області (Chou & Fasman, Ann. Rev. Biochem. 47:251-276) і включають Pro (P), Gly (G) і потенційно всі D-амінокислоти (коли містяться в L-пептиді; L-амінокислоти порушують спіральну структуру, коли знаходяться в D-пептиді). Такі спіраль-порушуючі амінокислоти попадають у вище перелічені категорії за винятком Gly (G) (як вже обговорювалося, *infra*); такі залишки не можна використати для заміщення амінокислотних залишків у внутрішніх положеннях в спіралі - їх можна використати тільки для заміщення 1-3 амінокислотних залишків на N-кінці і/або C-кінці пептиду.

Вище перелічені категорії проілюстровано відносно амінокислот, що генетично кодуються, але амінокислотні замітники не обов'язково повинні бути, а в певних переважних втіленнях не повинні бути обмежені амінокислотами, що тільки генетично кодуються. Насправді, багато які переважні пептиди структури (I) містять амінокислоти, що генетично не кодуються. Так в доповненні до природно існуючих амінокислот, що генетично кодуються, амінокислотні залишки в корових пептидах структури (I) можуть бути заміщені природно існуючими амінокислотами, що не кодуються і синтетичними амінокислотами.

Певні загальновідомі амінокислоти, які являють собою зручні заступники для корових пептидів структури (I), включають, не обмежуючись ними: (β-аланін (β-Ala) і інші омега-амінокислоти, такі як 3-амінопропіонова кислота, 2,3-діамінопропіонова кислота (Dpr), 4-амінобутирова кислота і т.д., α-аміноізобутирова кислота (Aib), ε-аміногексанова кислота (Aha), δ-аміновалерова кислота (Ava), N-метилглутин або сакрозин (MeGly), орнитин (Orn), цитрулін (Cit), t-бутилаланін (t-BuA), t-бутилглутин (t-BuG), N-метилизолейцин (Melle), фенілглутин (Phg), циклогексилаланін (Cha), норлейцин (Me), нафтилаланін (Nal), 4-хлорфенілаланін (Phe (4-Cl)), 2-фторфенілаланін (Phe(2-F)), 3-фторфенілаланін (Phe(3-F)), 4-фторфенілаланін (Phe(4-F)), пеніцилламін (Pen), 1,2,3,4-тетрагідроізоквінолін-3-карбонова кислота (Tic), β-2-тіоніналланін (Thi), метіонін сульфоксид (MSO), гомоаргінін (hArg), N-ацетилізін (AcLys), 2,4-діамінобутирова кислота (Dbu), 2,3-діамінобутирова кислота (Dab), p-амінофенілаланін (Phe(pNH₂)), N-метіл валін (MeVal), гомоцистеїн (hCys), гомофенілаланін (hPhe), гомосерин (hSer), гідроксипролін (Hyp), гомопротин (hPro), N-метиліровані амінокислоти і пептоїди (N-заміщені гліцини).

Класифікація амінокислот, що не кодуються, і загальнозвживаних, що генетично кодуються, відповідно до категорій, визначених вище, підсумована в Таблиці III, показаній нижче. Зрозуміло, що Таблиця III призначена для ілюстративних цілей і не має на увазі вичерпний перелік амінокислотних залишків, які можна використати для заміщення корових пептидів, описаних тут. Інші амінокислотні залишки, не згадані тут, легко можуть бути класифіковані на основі фізичних і хімічних властивостей, що спостерігаються, в світлі визначень, даних тут.

Таблиця III

Класифікація на найбільш вживаних амінокислот

Класифікація	Що генетично кодуються	Що генетично не кодуються
Гідрофобні		
Ароматичні	F, Y, W	Phg, Nal, Thi, Tic, Phe(4-Cl), Phe(2-F), Phe(3-F), Phe(4-F), hPhe
Неполярні	L, V, I, M, G, A, P	t-BuA, t-BuG, Melle, Nie, MeVal, Cha, MeGly, Aib
Аліфатичні	A, V, L, I	b-Ala, Dpr, Aib, Aha, MeGly, t-BuA, t-BuG, Melle, Cha, Nie, MeVal
Гідрофільні		
Кислі	D, E	
Основні	H, K, R	Dpr, Orn, hArg, Phe(pNH ₂), Dbu, Dab
Полярні	З, Q, N, S, T	Cit, AcLys, MSO, bAla, hSer
Зломщики спіралі	P, G	D-Pro і інші D-амінокислоти (в L-пептиди)

У більшості випадків, амінокислоти корових пептидів структури (I) будуть заміщені L-енантомерами амінокислот, але змінники не обмежуються L-енантомерами амінокислот. У поняття "мутантні" або "змінені" форми також включені такі ситуації за яких принаймні одна L-аміно кислота заміщена ідентичною D-амінокислотою (L-Arg

на D-Arg) або D-амінокислотою з тієї ж категорії або субкатегорії (L-Arg на D-Lys) або навпаки. Насправді, в певних переважних втіленнях, які зручні для перорального застосування для тваринних об'єктів, пептиди можуть складатися з, принаймні, одного D-енантомеру амінокислоти. Вважають, що пептиди, що містять таку D-амінокислоту будуть більш стабільні від деградації при пероральним застосуванні в ротовій порожнині, кишечнику або сироватці в порівнянні з пептидами, що перебувають виключно з L-амінокислот.

Як зазначено вище, D-амінокислоти мають тенденцію порушувати структуру α-спіралей, коли розташовуються у внутрішніх положеннях α-спіралі L-пептиду. Крім того, зазначено, що певні мутантні форми корових пептидів структури (I), які повністю складаються з D-амінокислот показують значно меншу активацію LCAT в тесті, що приводиться тут, в порівнянні з ідентичними пептидами, що складаються виключно з L-амінокислот. Як наслідок, D-амінокислоти не повинні використовуватися для заміщення внутрішніх L-амінокислот, D-амінокислотні замітники повинні обмежуватися 1 - 3 амінокислотними залишками на N-кінці або/і на C-кінці пептиду.

Як вже обговорювалося, амінокислота Gly (G) загалом діє як зломщик спіралі, якщо знаходиться у внутрішніх положеннях пептиду. Разюче, заявникам вдалося відкрити, що спіральна структура корових пептидів винаходу порушується у відсутності ліпідів, якщо внутрішні амінокислотні залишки заміщені Gly (G), в присутності ж ліпідів такі Gly (G) містять пептиди показують значну міру спіральності структури, також як і активності. Наприклад, пептид 154 (PVLELFENLLERGLDALQKKLK; SEQ ID NO: 154) має тільки 13% спіральну структуру в буфері, і 76% спіральної структури спостерігається в присутності міцел. Помітимо, що декілька корових пептидів що містять внутрішній Gly (G) залишок, мають активацію LCAT рівну або навіть більше за 38%. Хоч загалом вважають, що Gly (G) залишок є зломщиком спіралі, Gly (G) можна використати для заміщення амінокислот у внутрішніх положеннях корових пептидів структури (I). Переважно, щоб внутрішні залишки розташовані тільки в межах ±1 повороту спіралі в центрі пептиду (особливо для пептидів амінокислот, що складаються з цілого ряду) були заміщені Gly (G). Крім того, переважно, щоб тільки один внутрішній амінокислотний залишок в пептиді був заміщений Gly (G). Переважні втілення агоністів ApoA-I винаходу утримуючі внутрішні гліцини описані в секції 5.1.2. *infra*.

Використання класифікацій амінокислотних залишків, описаних вище, на основі спірального колеса Шиффера-Едмундсена і діаграми спірального ланцюжка корових пептидів структури (I), а також детальний опис бажаних властивостей, що представляються тут, змінні або мутантні форми корових пептидів структури (I), які в істотній мірі залишаються амфіпатичними, і інші властивості спіралі, і все що входить в сферу даного винаходу, може бути легко отримане.

У переважному втіленні винаходу змінні або мутантні форми корових пептидів структури (I) отримують фіксуванням гідрофільних або гідро-

фобних залишків у відповідності зі структурою (I), і заміщенням принаймні одного нефіксованого залишку іншою амінокислотою, переважно консервативно, тобто іншою амінокислотою з тієї ж категорії або субкатегорії. Залишки, що складають основні або гідрофобні кластери, також можуть бути фіксовані у відповідності зі структурою (I), і, принаймні, один нефіксований залишок заміщений, переважно консервативно.

У іншому переважному втіленні змінні або мутантні форми корових пептидів структури (I) отримали шляхом фіксування гідрофільних амінокислотних залишків, розташованих в межах гідрофільної поверхні спіралі у відповідності зі структурою (I), і заміщення принаймні одного нефіксованого залишку іншою амінокислотою, переважно консервативно, тобто іншою амінокислотою з тієї ж категорії або субкатегорії. На Фіг.2А можна побачити, що залишки 1, 4, 7, 8, 11, 12, 15, 18, 19, 22, розташували в межах гідрофільної поверхні амфіпатичної спіралі, утвореної коровими пептидами структури (I). Всі ці залишки гідрофільні за винятком залишку 1, який може бути або гідрофільним або гідрофобним. Так, в переважному втіленні залишки 4, 7, 8, 11, 12, 15, 18, 19, 22 фіксовані у відповідності зі структурою (I), і принаймні один із залишків 1, 2, 3, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 16, 17, 20, 21 заміщений іншою амінокислотою з цієї ж категорії, переважно іншою амінокислотою з тієї ж субкатегорії. Інакше, залишок 1 також фіксований у відповідності зі структурою 1, і принаймні один із залишків 2, 3, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 16, 17, 20, 21 заміщений.

У особливо переважному втіленні С-кінцевий основний кластер (залишки 19, 20 і 22) також фіксований у відповідності зі структурою (I), і тільки залишки 2, 3, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 16 і/або 17 заміщені.

У іншому особливо переважному втіленні і основний і гідрофобний кластери фіксовані, і тільки залишки 2, 5, 13, 14, 16 і/або 17 заміщені.

У іншому переважному втіленні винаходу змінні або мутантні форми корових пептидів винаходу отримують шляхом фіксування гідрофобних амінокислотних залишків, розташованих в межах гідрофобної поверхні спіралі і заміщенням принаймні одного нефіксованого залишку іншою амінокислотою, переважно консервативно, тобто іншою амінокислотою з тієї ж категорії або субкатегорії.

На Фіг.2А можна побачити, що залишки 2, 3, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 16, 17, 20, 21 розташовані в межах гідрофобної поверхні. Ці залишки всі гідрофобні за винятком залишку 20, який є гідрофільним. Так в переважному втіленні залишки 2, 3, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 16, 17, 20, 21 фіксовані у відповідності зі структурою (I), і принаймні один із залишків 1, 4, 7, 8, 11, 12, 15, 18, 19, 20, 22 заміщений іншою амінокислотою з цієї ж категорії, переважно іншою амінокислотою з тієї ж субкатегорії.

У особливо переважному втіленні С-кінцевий основний кластер (залишки 19, 20 і 22) також фіксовані у відповідності зі структурою (I), і тільки залишки 1, 4, 7, 8, 11, 12 і/або 15 заміщені.

У іншому переважному втіленні винаходу змінні або мутантні форми корових пептидів струк-

тури (I) отримують фіксуванням всіх амінокислотних залишків, розташованих в межах гідрофобної або гідрофільної поверхні спіралі, і заміщенням іншим амінокислотним залишком, переважно консервативно, принаймні одного амінокислотного залишку, що знаходиться на іншій поверхні. Залишки, що складають гідрофобний кластер і/або основний кластер, можуть також бути необов'язково фіксовані у відповідності зі структурою (I), як обговорювалося раніше.

У іншому втіленні винаходу змінні або мутантні форми корових пептидів структури (I) отримують заміщенням принаймні одного амінокислотного залишку неконсервативною амінокислотою. Фахівці в даній області розуміють, що таке заміщення трохи змінює амфіпатичні і/або структурні властивості спіралі (*supra*). Так іноді бажано замінити одну або більше пар амінокислот таким чином, щоб оберігати властивості ланцюга спіралі. Подальший посібник для вибору відповідних амінокислотних замінників надане пептидними послідовностями, перерахованими в Таблиці X (Секція 8.3, *infra*).

У ще одному переважному втіленні винаходу від однієї до чотирьох амінокислотних залишків на N-кінці і/або на С кінці корових пептидів структури (I) заміщені одним або більше амінокислотними залишками або одним або більше за пептидними сегментами, для підтримки стабільності районів (Х-спіральної повторної структури (залишки або сегменти кінцевого кепу). Такі залишки або сегменти кінцевого кепу добре відомі в даній області.)(Richardson & Richardson, 1988, Science, 240:)(1648-1652;)(Harper et al., 1993, Biochem 32(30):7605-7609; Dasgupta & Bell, 1993, Int. J. Pept. Prot. Res. 41: 499-511; Seale et al., 1994, Prot. Science, 3:1741-1745; Doig & Baldwin, 1995, Prot. Science, 4:1325-1336; Odaert et al., 1995, Biochem, 34:12820-12829, Petrukhov et al., 1996, Biochem, 35:387-397; Doig et al, 1997, Prot. Science 6:147-155). Інакше, перші від одного до чотирьох амінокислотних залишків на N-кінці і/або на С-кінці корових пептидів структури (I) заміщені пептидоміметиками, які мімікрують структуру і/або властивості залишків або сегментів кінцевого кепу. Відповідні миметики кінцевого кепу добре відомі в даній області і описані, наприклад, Richardson & Richardson, 1988, Science 240:1648-1652; Harper et al., 1993, Biochem., 32 (30):7605-7609; Dasgupta & Bell, 1993, Int. J. Pept. Prot. Res. 41:499-511; Seale et al., 1994, Prot. Science, 3: 1741-1745; Doig et al., 1994, Biochem, 33:3396-3403; Zhou et al., 1994, Proteins, 18, 1-7; Doig & Baldwin, 1995, Prot. Science 4: 1325-1336; Odaert et al., 1995, Biochem, 34:12820-12829, Petrukhov et al., 1996, Biochem., 35: 387-397; Doig et al., 1997, Prot. Science 6: 147-155.

Оскільки структура (I) містить 22 специфічних положення амінокислотних залишків, зрозуміло, що корові пептиди винаходу можуть містити менше 22 амінокислотних залишків. Насправді, усічені або видалені зсередини форми структури (I), що містять всього 18 або навіть 15 амінокислотних залишків, які в істотній мірі підтримують загальні характеристики і властивості амфіпатичної спіралі,

утвореної коровими пептидами структури (I), також входять до сфери даного винаходу.

Усічені форми структури (I) отримують видаленням однієї або більше амінокислот з N- або C-кінця структури (I). Форми з діленням зсередини отримують шляхом видалення однієї або більше амінокислот з внутрішніх положень пептиду структури (I). Видалені зсередини залишки амінокислот можуть стояти один за одним, а можуть і не стояти.

Фахівцям в цій області буде зрозуміло, що видалення внутрішніх амінокислотних залишків з корових пептидів структури (I) приведе до випрямлення гідрофільно-гідрофобної поверхні спіралі і повороту на 100° в точці делеції. Оскільки таке обертання може значно змінити амфіпатичні властивості спіралі, що вийшла, в переважному втіленні винаходу амінокислотні залишки віддаляються таким чином, щоб в значній мірі зберегти вирівнювання площини гідрофобно-гідрофільної поверхні вздовж головної довгої осі спіралі.

Це досягається за допомогою видалення значного числа послідовних або непослідовних амінокислотних залишків, наприклад, вилучаючи повний поворот спіралі. Ідеальна α -спіраль містить 3,6 залишки на поворот. Тому, в переважному втіленні видаляють групи з 3-4 послідовних або непослідовних амінокислотних залишків. Чи видаляти 3 або 4 амінокислоти залежить від положення першого залишку, який буде видалено, всередині спіралі. Визначення відповідної кількості послідовних або непослідовних амінокислотних залишків, які складають один повний оборот спіралі з будь-якої стартової точки в межах аліфатичної спіралі, знаходиться в межах можливостей фахівців в даній області.

Оскільки припускається, що основний кластер на C-кінцях корових пептидів структури (I) важливий для стабілізування спіралі, і гідрофобний кластер важливий в ефективності скріплення ліпідів і активації LCAT, в переважних втіленнях винаходу, залишки, що складають основний і гідрофобний кластери не видаляють. Так, в переважних втіленнях, залишки 19, 20 і 22 (основний кластер) і залишки 3, 6, 9 і 10 (гідрофобний кластер) не видаляють.

Корові пептиди структури (I) також можна розширити з одного або обох кінців, або шляхом введення додаткових амінокислотних залишків, які не значно впливають на, а в деяких втіленнях навіть посилюють, структурні і функціональні властивості пептидів. Насправді вважають, що розширені корові пептиди, що містять 23, 25, 26, 29 або навіть більше амінокислот, входять до сфери даного винаходу. Переважно, щоб такі розширені пептиди значною мірою зберігали амфіпатичність ланцюгу і інші властивості пептидів структури (I). Звичайно, про це дізнаються, коли додані у внутрішні положення амінокислоти будуть обертати площину гідрофобно-гідрофільної поверхні в точці введення у спосіб, схожий на описаний вище для внутрішніх делецій. Тому, положення, описані вище у відношенні внутрішніх делецій, також підходять і для внутрішніх додатків.

В одному з втілень, корові пептиди розширені з N- або C-кінця на, принаймні, один оберт спіра-

лі, такі розширення стабілізують спіральну повторну структуру в присутності ліпідів, наприклад, амінокислоти кінцевого кепу і сегменти, описані раніше.

В особливо переважному втіленні, корові пептиди структури (I) розширені з C-кінця єдиним основним амінокислотним залишком, переважно Lys (K).

До сфери даного винаходу також входять "блоковані" форми агоніста ApoA-I, тобто форми ApoA-I агоністів, в яких N- і/або C-кінці блоковані мотивом, здатним реагувати з N-кінцевий $-NH_2$ або C-кінцевий $-C(O)OH$ групою. Виявили, що видалення N- і/або C-кінцевих зарядів у агоністів ApoA-I винаходу, що містять 18 або менш амінокислотних залишків (шляхом синтезування N-ацильованих амідів пептидів/ефіру/гідразидів/спирту або їх заміщень) приводить до отримання агоністів, які наближаються, а в деяких втіленнях навіть перевершують, активність неблокованих форм агоністів. У деяких втіленнях, що містять 22 або більше амінокислот, блокування N-або C-кінців приводить до появи ApoA-I агоністів, які мають більш низьку активність, ніж неблоковані форми. Чекають, що блокування і N-, і C-кінця агоністів ApoA-I, що складаються з 22 або більше амінокислот, відновить активність. Так, в переважному втіленні винаходу, або N- і/або C-кінець (переважно обидва) корових пептидів, що містять 18 або менше амінокислот блоковані, а N- і C-кінці пептидів, що містять 22 і більше амінокислот або обидва блоковані або обидва неблоковані. Типові групи, ті, що блокують N-кінець включають RC(O)-групу, де R являє собою -H, (C₁-C₆) алкильну, (C₁-C₆) алкенильну, (C₁-C₆) алкінільну, (C₅-C₂₀) арильну, (C₆-C₂₆) алкарильну групи, 5-20 членну гетероарильну або 6-26 членну алкгетероарильну групу. Переважні N-кінцеві блокуючі групи включають: ацетильну, формильну і дансильну групи. Типові C-кінцеві блокуючі групи включають -C(O)NRR' і -C(O)OR' групи, де кожний R незалежно визначений, як вище. Переважні C-кінцеві блокуючі групи включають такі, де кожний R являє собою незалежно металну групу. Вважають, що такі кінцеві блокуючі групи стабілізують α -спіраль в присутності ліпідів. (Venkatachelapathi et al., 1993, PROTEINS: Structure, Function and Genetics 15:349-359).

Нативна структура ApoA-I містить вісім спіральних одиниць, які, як вважають, узгоджено діють для скріплення з ліпідами (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., 1996, Arterioscler. Thromb. Vase. Biol. 16:328-338; Demoor et al., 1996, Eur. J.Biochem. 239:74-84). Таким чином, також включені до даного винаходу агоністи ApoA-I, складають димери, тримери, тетрамери і навіть полімери більш високого порядку ("мультимери") корових пептидів, описаних тут. Такі мультимери можуть знаходитися в формі тандемічних повторів, розгалуженій мережі або їх комбінацій. Корові пептиди можуть бути прямо приєднані один до одного або за допомогою одного або більше лінкерів.

Корові пептиди, що включають мультимери, можуть бути пептидами структури (I), аналогами

структури (I), мутантними формами структури (I), усіченими або з внутрішніми діленнями формами структури (I), розширеними формами структури (I) і/або їх комбінаціями. Корові пептиди можна з'єднувати способом голова-хвіст (N-кінець з C-кінцем), голова-голова (N-кінець з N-кінцем), хвіст-хвіст (C-кінець з C-кінцем) або їх комбінаціями.

В одному з втілень винаходу, мультимери являють собою тандемні повтори з двох, трьох, чотирьох і т.д. до десяти корових пептидів. Переважно, щоб мультимери являли собою тандемні повтори з 2-8 корових пептидів. Так, в одному з втілень агоністи ApoA-I винаходи включають мультимери, що мають наступну структурну формулу:



де:

кожний m являє собою незалежно ціле число від 0 до 1;

n являє собою ціле число від 0 до 10, переважно від 0 до 8;

кожний "NH" являє собою незалежно коровий пептид або пептидний аналог структури (I) або мутантну, усічену, з внутрішніми діленнями або розширену його форму, як описано тут;

кожний "LL" являє собою незалежно лінкер і кожну "-" незалежно означає ковалентний зв'язок.

У структурі (II) лінкер LL може бути будь-якою біфункціональною молекулою, здатною ковалентно зв'язувати два пептиди між собою. Так, відповідні лінкери являють собою біфункціональні молекули, в яких функціональні групи здатні бути ковалентно приєднані до N і/або C-кінця пептиду. Функціональні групи, відповідні для скріплення з N- або C-кінцем пептидів добре відомі в даній області, і існують відповідні способи для підвищення ефективності утворення таких ковалентних зв'язків.

Лінкери можуть бути жвакими, твердими або напівтвердими в залежності від бажаних властивостей мультимеру. Відповідні лінкери включають, наприклад, амінокислотні залишки, такі як Pro або Gly або сегменти пептиду, що містять від 2 до 5, 10, 15 або 20 і навіть більше амінокислот, біфункціональні органічні речовини, такі як $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ де n являє собою ціле число від 1 до 12 і т.п. Приклади таких лінкерів, а також способи їх створення, і пептиди, що включають такий лінкер, добре відомі в даній області (Hunig et al., 1974, Chem. Ber. 100:3039-3044; Basak et al., 1994, Bioconjug. Chem. 5(4): 301-305).

У переважному втіленні винаходу, тандемні повтори являють собою внутрішні вставки єдиного залишку проліну. У тих випадках, коли корові пептиди закінчуються на N-кінці або C-кінці проліном, наприклад, де X_1 в структурі (I) являє собою Pro (P) або D-Pro (p), m в структурі (I) являє собою переважно 0. В випадках, коли корові пептиди не містять N- або C-кінцевого проліну, LL-переважно являє собою Pro (P) або D-Pro (p), і m переважно є 1.

У певних втіленнях винаходу може бути бажаним використання лінкерів, що розщеплюються, що дають можливість виходу одного або більше спіральних сегментів (NH) за певних умов. Відповідні лінкери, що розщеплюються включають: пептиди, що мають амінокислотні послідовності, що

розрізняються протеазами, олігонуклеотиди, які розщеплюються ендонуклеазами, і органічні речовини, які можна розщепити хімічними способами в кислих, основних або інших умовах. Переважно, щоб умови розщеплення були відносно м'якими, щоб не викликати денатурації або деградації іншим способом спіральних сегментів і/або лінкерів, що не розщеплюються, що входять до складу мультимерних агоністів ApoA-I.

Пептидні і олігонуклеотидні лінкери можуть бути селективно розщеплені добре відомими способами для розщеплення лінкерів, і фахівці в даній області легко знайдуть їх. Відповідні органічні речовини лінкери, які можна селективно розщепити, доступні для фахівців в даній області і включають, наприклад ті, що описані в WO94/08051 а також в посиланнях, наведених тут.

У переважному втіленні, лінкери, що використовуються являють собою пептиди, які є субстратами для ендогенних циркуляторних ферментів, що дозволяє мультимерним агоністам ApoA-I бути селективно розщепленими *in vivo*. Ендогенні ферменти, відповідні для розщеплення лінкерів, включають, наприклад, проаполіпопротеїн A-I пропептидази. Відповідні ферменти а також пептидні сегменти, які виступають в ролі субстратів для кожного ферменту, добре відомі в даній області (Edelstein et al., 1983, J.Biol.Chem 258: 11430-11433; Zanis 1983 PNAS USA 80: 2574-2578).

Як описано вище, ключовою рисою корових пептидів винаходу є їх здатність формувати внутрішньомолекулярні водневі зв'язки або сольові містки, при організації антипаралельним образом. Так, в переважному втіленні винаходу, лінкери значної довжини і рухливості використовують так, що вони дозволяють, спіральним сегментам (NH) структури (II) лягти антипаралельно і утворити внутрішньомолекулярні водневі зв'язки або сольові містки в присутності ліпідів.

Лінкер значної довжини і рухливості включають, не обмежуючись ними: Pro (P), Gly (G), Cys-Cys, $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_n-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, де n від 1 до 12, переважно від 4 до 6, H_2N -арил- $\text{C}(\text{O})\text{OH}$ і вуглеводні.

Інакше, оскільки нативні аполіпопротеїни дають можливість кооперативного скріплення між антипаралельними спіральними сегментами, пептидні лінкери, які за первинною структурою відповідають пептидним сегментам, зв'язуючим сусідні спіралі в нативних аполіпопротеїнах, включаючи, наприклад, ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III, ApoD, ApoE і ApoJ можна використати відповідним чином для скріплення корових пептидів. Ці послідовності добре відомі в цій області (Rosseneu 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).

Інші лінкери, які дають можливість утворення внутрішньомолекулярних водневих зв'язків або сольових містків між тандемними повторами антипаралельних спіральних повторів, включають зворотні оберти пептиду, оскільки β -повороти і γ -повороти, а також органічні молекули, які мімікують структури пептидних β -поворотів і/або γ -поворотів. Загалом, зворотні повороти являють собою сегменти пептиду, які повертають напрям

поліпептидного ланцюга таким чином, щоб дозволити одиночному поліпептидному ланцюгу вибирати дільниці антипаралельних β -смуг або антипаралельної α -спіральної структури, β -повороти загалом складаються з чотирьох амінокислотних залишків і γ -повороти загалом складаються з трьох амінокислотних залишків.

Конформації і послідовності безлічі пептидних ρ -поворотів добре описані в даній області і включають, наприклад без обмежень, тип-I, тип-I', тип-II, тип-I'', тип-III, тип-III', тип-IV, тип-V, тип-V, тип-VIa, тип-VIb, тип-VII і тип-VIII (Richardson, 1981 *Adv. Protein. Chem.* 34:167-339; Rose et al., 1985, *Adv. Protein Chem.* 37:1-109, Wilmot et al., 1988, *J.Mol. Biol.* 203:221-232; Tramontano et al., 1989, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 6:382-394). Sibanda et al., 1989, *J.Mol. Biol.* 206:759-777;

Специфічні конформації коротких пептидних поворотів, наприклад β -поворотів, залежить насамперед, від положень певних амінокислотних залишків в повороті (звичайне Gly, Asn Pro). Загалом β -поворот типу I суміσιμο з будь-яким амінокислотним залишком в положеннях від 1 до 4 повороту, за винятком Pro, який не може знаходитись в положенні 3. Gly переважає в положенні 4 і Pro переважає в положенні 2 поворотів типу 1 і типу 11. Залишки Asp, Asn, Ser і Cys часто розташовуються в положенні 1, де їх бічні ланцюги часто утворюють водневий зв'язок з NH залишку 3.

У поворотах типу II, Gly і Asn найчастіше існують в положенні 3, оскільки вони сприймають необхідні кути кистяка найбільш легко. У ідеалі, повороти типу I' мають Gly в положеннях 2 і 3 і повороти типу II' мають Gly в положенні 2. Повороти типу-III звичайно можуть мати найбільшу кількість амінокислотних залишків, а повороти типу III' вимагають Gly в положеннях 2 і 3. Повороти VIa VIb типів звичайно мають циспептидний зв'язок і Pro як внутрішній залишок. Огляд різних типів і послідовностей β -поворотів в білках і пептидах можна прочитати у Wilmot et al., 1988, *J.Mol. Biol.* 203:221-232

Конформації і послідовності багатьох пептидних γ -поворотів також добре описані в даній області (Rose et al., 1985 *Adv. Protein. Chem.* 37:1-109; Wilmer-White et al., 1987, *Trends Biochem. Sci.* 12:189-192, Wilmot et al., 1988, *J.Mol. Biol.* 203:221-232, Sibanda et al., 1989, *J.Mol. Biol.* 206:759-777; Tramontane et al., 1989 *Proteins: Struct. Fund Genet.* 6: 382-394). Всі ці типи структур β -поворотів і γ -поворотів і їх відповідних послідовностей, а так само пізніше відкриті структури пептидних β -поворотів і γ -поворотів і послідовностей, також специфічно очікуються у винаході.

Інакше, лінкер (LL) може включати органічну молекулу або мотив, який мімікрує структуру β -повороту пептиду або γ -повороту пептиди. Такі мотиви-миметики β - і/або γ -поворотів, а також способи синтезування пептидів, що містять такі мотиви, добре відомі в даній області, і серед інших включають ті, які описані Giannis & Kolter, 1993, *Angew. Chem. Intl. Ed. Eng.* 32:1244-1267; Kahn et al., 1988, *J.Molecular. Recognition.* 1:75-79; Kahn et al., 1987, *Tetrahedron Lett.*, 28:1623-1626.

У ще одному втіленні винаходу, мультимери знаходяться в формі розгалуженої мережі (Фіг.7).

Такі мережі зручно отримувати з використанням мультифункціональних зв'язуючих дільниць, які дають можливість більше двох спіральних одиниць приєднатися до єдиної зв'язуючої частини. Т.ч. в розгалужених мережах використовують молекули, що мають три, чотири і навіть більш функціональних груп, які здатні ковалентно зв'язуватися з N- або C-кінцем пептиду. Відповідні зв'язуючі дільниці включають, наприклад, амінокислотні залишки, що мають бокові частини, несучі гідроксильні, сульфанільні, аміно, карбоксильні, амідні і/або ефірні функціональності, наприклад, Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gin (Q), Lys (K), Arg (R), Orn, Asp (D) і Glu (E) або інші органічні молекули, що містять такі функціональні групи.

Спіральні сегменти, приєднані до єдиної зв'язуючої дільниці, не обов'язково повинні бути приєднані по кінцю. Насправді, в деяких втіленнях спіральні сегменти прикріплені до єдиної зв'язуючої дільниці так, що вони організовані антипаралельним чином, тобто деякі спіралі прикріплені через N-кінці, інші через C-кінці.

Спіральні сегменти можуть бути приєднані прямо до зв'язуючої дільниці або можуть бути просторово відділені від зв'язуючої дільниці одним або більш біфункціональними лінкером (LL), як описано раніше.

На Фіг.7A і 7B видно, що розгалужений ланцюг можна описати за числу "вузлів", включених в цю мережу, де кожна мультифункціональна зв'язуюча дільниця складає вузол. На Фіг.7A і 7B спіральні сегменти (тобто корові пептиди винаходу) зображені у вигляді циліндрів, і мультифункціональні зв'язуючі дільниці (або вузли) у вигляді кружків (*), і кількість, що виходять з кружка означає порядок (число функціональних груп) мультифункціональної зв'язуючої дільниці.

Число вузлів в ланцюгу звичайно залежить від загальної бажаної кількості спіральних сегментів, і звичайно складає від 1 до 2.

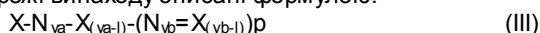
Зрозуміло, за даної кількості бажаних спіральних сегментів, мережа зі зв'язуючими дільницями високого порядку буде мати меншу кількість вузлів. Наприклад, на Фіг.7A і 7B мережа третинного порядку (тобто мережа, що має трифункціональну зв'язуючу дільницю) з семи спіральних одиниць має три вузли (Фіг.7A), і ланцюг з четвертичним порядком (тобто ланцюг, що має чотирифункціональну зв'язуючу дільницю) з семи спіральних одиниць має тільки два вузли. (Фіг.7B).

Мережі можуть бути єдиного порядку, тобто мережі, в яких всі вузли являють собою, наприклад, трифункціональні або чотирифункціональні зв'язуючі дільниці, або може бути змішаного порядку, наприклад мережі, в яких вузли являють собою суміш, наприклад, трифункціональних і чотирифункціональних зв'язуючих дільниць). Зрозуміло, що навіть в ланцюгу єдиного порядку зв'язуючі дільниці не зобов'язані бути однаковими. У мережі четвертичного порядку можуть бути використані, наприклад, два, три, чотири і навіть більш різних трифункціональних зв'язуючих дільниць.

Подібно до лінійних мультимерів, спіральні сегменти, включені до розгалуженої мережі, можливо, а можуть і не бути однаковими.

Приклад такої розгалуженої мережі змішаного порядку приведений на Фіг.7С. На Фіг.7С спіральні сегменти (тобто корові пептиди винаходу) зображені у вигляді циліндрів і мультифункціональні зв'язуючі частини у вигляді кружків (*), де кількість ліній, що виходять з кружка визначає "порядок" (або кількість функціональних груп) мультифункціональної зв'язуючої ділянки. Лінії, що з'єднують спіральні сегменти, представляють біфункціональний лінкер LL, як було описано раніше. Спіральні сегменти, включені до розгалуженої мережі можуть бути тандемними повторами корових пептидів, як описано раніше.

У одному ілюстративному втіленні розгалужені мережі винаходу описані формулою:



де:

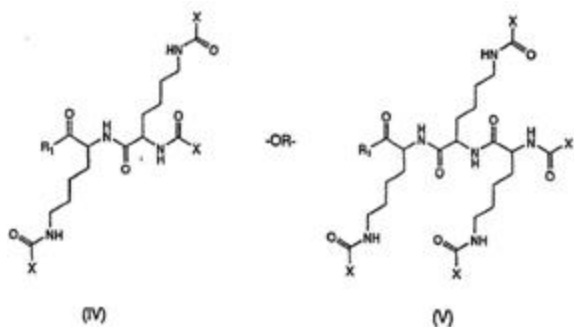
кожний X являє собою незалежно $HN-[LL]_m-HN$ або $HN-[LL]_m-HN$ кожний "HN" являє собою незалежно коровий пептид структури (I) або його аналог, або мутантну, скорочену, з внутрішніми діленнями або розширену форму його, як описано тут; кожний "LL" являє собою незалежно біфункціональний лінкер; і кожний m являє собою незалежно ціле число від 0 до 1; n представляє ціле число від 6 до 8;

N_{ya} і N_{yb} являють собою незалежно мультифункціональний зв'язуючий мотив, де Y_a і Y_b представляють число функціональних груп на N_{ya} і N_{yb} відповідно;

кожний Y_a і Y_b являють собою незалежно ціле число від 3 до 8;

r являє собою незалежно цілі числа від 0 до 7; кожна "-" незалежно означає ковалентний зв'язок. У переважному втіленні, розгалужена мережа, включає "Lys-дерево", тобто мережа, де мультифункціональна частин являє собою один або більше за Lys (K) залишків (див. Фіг.7D).

У одному ілюстративному втіленні, "Lys-дерево" розгалужена мережа винаходу описана формулами (IV) і (V):



в яких:

кожний X являє собою незалежно $HN-[LL]_m-HN$ або $HN-[LL]_m-HN$ кожний "HN" являє собою незалежно коровий пептид структури (I) або його аналог, або мутантну, скорочену, з внутрішніми діленнями або розширену його форму, як описано тут;

кожний "LL" являє собою незалежно біфункціональний лінкер; і

кожний m являє собою незалежно ціле число від 0 до 1;

n являє собою ціле число від 0 до 8;

RI являє собою -OR або -NRR; і

кожний R являє собою незалежно -H, (C_1-C_6) алкільну, (C_1-C_6) алкенильну, (C_1-C_6) алкінільну, (C_5-C_{20}) арильну, (C_6-C_{26}) алкарильну групи, 5-20 членну гетероарильну або 6-26 членну алкгетероарильну групу.

5.1.1. Аналіз структури і функції

Структуру і функцію корових пептидів або пептидних аналогів, а також агоністів АроА-I, що складаються з цих корових пептидів, включаючи мультимерні форми, описані вище, можна проаналізувати, щоб вибрати активні агоністи або миметики АроА-I. Наприклад, корові пептиди або пептидні аналоги можна перевірити на їх здатність формувати α -спіралі в присутності ліпідів, зв'язувати ліпіди, формувати комплекси з ліпідами, активувати LCAT, запускати вихід холестерину і т.д.

Способи і тести для аналізу структури і/або функції пептидів добре відомі в даній області. Переважні способи надані в робочих прикладах, *infra*. Наприклад, тести круговий дихроїзм (CD) і ядерний магнітний резонанс (ЯМР), описані в Секції 7., *infra*, можуть бути використані для аналізу структури пептидів або пептидних аналогів - особливо міри спіральності в присутності ліпідів. Здібність до скріплення з ліпідами можна визначити за допомогою методу флуоресцентної спектроскопії, описаного в Секції 7, *infra*. Здатність пептидів або пептидних аналогів активувати LCAT можна визначити за допомогою тесту LCAT активації, описаного в Секції 8, *infra*. Тести *in vivo in vitro*, описані в Секції 9, 10 і 11, *infra*, можна використати для визначення часу напів-життя, розподілу, виходу холестерину і ефектів на ЗТХ.

Загалом вважають, що корові пептиди і/або пептидні аналоги даного винаходу, які мають властивості, перераховані в Таблиці IV *infra*, є активними.

Таблиця IV

Властивості активних пептидів

Властивість	Межі	Переважні межі
% спіральності в присутності ліпідів ($R_i=30$) (неблоковані пептиди з 22 амінокислотних залишків)	$\geq 60\%$	$\geq 80\%$
% спіральності в присутності ліпідів ($R_i=30$) (неблоковані пептиди з 18 амінокислотних залишків)	$\geq 40\%$	$\geq 60\%$
% спіральності в присутності ліпідів ($R_i=30$) (блоковані пептиди з 18 амінокислотних залишків або ще більш короткі пептиди)	$\geq 60\%$	$\geq 80\%$
Скріплення з ліпідами (в присутності SUVs)	0,5- μ M пептиду $R_i=1-50$	
Активність LCAT	$\geq 38\%$	$\geq 80\%$

R_i являє собою ліпід: пептид молярне співвідношення.

Як показано в робочих прикладах, *infra*, корові пептиди, які мають високу міру активації LCAT ($>38\%$) загалом володіють значною α -спіральною структурою в присутності ліпідних малих уніламельних везикул (SUVs) ($>60\%$ спіральності структури у разі неблокованих пептидів, що складаються з 22 і більше амінокислот і блокованих пептидів, що містять 18 і менш амінокислотних залишків; $>40\%$ спіральності структури у разі неблокованих пептидів,

що містять 18 і менше амінокислот), ті пептиди, які мають малу або не мають взагалі здібності до активації LCAT, володіють меншою α -спіральною структурою. Але в певних випадках, пептиди, що володіють значною спіральною структурою в присутності ліпідів, не значно впливають на LCAT.

Схожим чином, корові пептиди, які мають значну активацію LCAT, звичайно зв'язують ліпіди, але в певних випадках пептиди, що зв'язують ліпіди, не впливають значно на активацію LCAT.

Внаслідок цього, як розуміють фахівці в даній області, здатність корових пептидів, описаних тут, утворювати α -спіралі (в присутності ліпідів) і зв'язувати ліпіди є критичною для вияву активності, хоч в багатьох випадках ці властивості і не є значущими. Т.ч., в переважному втіленні корові пептиди винаходу піддавали серії випробувань для вибору корових пептидів, що мають значну фармакологічну активність.

На першому етапі, корові пептиди перевіряли на їх здатність утворювати α -спіралі в присутності ліпідів, використовуючи метод CD, описаний в Секції 7, *infra*. Ті пептиди, що мали принаймні 40% спіральності (неблоковані пептиди, що містять 18 або менше амінокислот) або 60% спіральності (блоковані пептиди, що містять 18 або менше амінокислот, і неблоковані пептиди, що містять 22 і більше амінокислот) в присутності ліпідів (в концентрації приблизно 5мМ і при ліпід:пептид молярному співвідношенні біля 30) потім перевіряли на їх здатність до скріплення з ліпідами, використовуючи флуоресцентний метод, описаний в Секції 7, *infra*. Звичайно, тільки ті корові пептиди, які містили залишки флуоресцентного Trp (W) або Nal перевіряли на скріплення з ліпідами за допомогою флуоресценції. Але, для тих пептидів, які не містять флуоресцентних залишків, скріплення з ліпідами вважається значущим, якщо їх спіральність зростає в присутності ліпідів.

Корові пептиди, що показують скріплення з ліпідами в присутності SUVs (0,5-10мМ пептиду; ліпід:пептид молярне співвідношення в межах від 1 до 50) потім перевіряли на фармакологічну активність. Звичайно, фармакологічна активність буде залежати від бажаного використання агоністів АроА-I. У переважному втіленні, корові пептиди перевіряли на їх здатність до активації LCAT, оскільки пептиди, які здатні активувати LCAT, знаходять найбільше застосування в способі, описаному тут. Корові пептиди, що мають, принаймні, біля 38% активації LCAT в порівнянні з нативним людським АроА-I (що визначено в тесті активації LCAT, описаному в Секції 8, *infra*) є переважними, і корові пептиди, що мають 50%, 60%, 70%, 80% або навіть 90% або більш, особливо переважні.

5.1.2. Переважні втілення

Агоністи АроА-I винаходу далі можуть бути визначені за допомогою переважних втілень.

В одному переважному втіленні, агоністи АроА-I являють собою пептиди з 22 амінокислотних залишків, в

відповідності до структури (I), або їх форми, ацильовані по N-кінцю і/або амідовані або естерифіювані по C-кінцю.

В іншому переважному втіленні, агоністи АроА-I являють собою пептиди з 22 ацильованих

залишків, у відповідності зі структурою (I) або їх форми, ацильовані по N-кінцю і/або амідовані або естерифіювані по C-кінцю, в яких:

X₁ являє собою Pro (P), Ala (A), D-Pro (p), Gly (G), Asn (N),

X₂ являє собою Ala (A), Leu (L) або Val (V);

X₅ являє собою Leu (L);

X₆ являє собою Phe (F);

X₁₁ являє собою Glu (E);

X₁₉ являє собою Lys (K);

X₂₀ являє собою Lys (K); і/або

X₂₂ являє собою Lys (K);

і кожний з X₃, X₄, X₇, X₈, X₉, X₁₀, X₁₂, X₁₃, X₁₄, X₁₅, X₁₆, X₁₇, X₁₈, X₂₁ такі, як були раніше визначені для структури (I).

Особливо переважні агоністи АроА-I по цьому пункту винаходу, в яких X₂ являє собою Val (V) і/або X₁₈ являє собою Gin (Q).

У ще одному переважному втіленні агоністи АроА-I являють собою пептиди з 22 амінокислотних залишків за формулою (I) або їх форми, ацильовані по N-кінцю і/або амідовані або естерифіювані по C-кінцю, в яких: один з X₁₀, X₁₁, X₁₄ являє собою Gly (G), а інші залишки крім X₁₀, X₁₁ і X₁₄ є іншими, ніж Gly (G). Якщо X₁₀ являє собою Gly (G), переважно, щоб X₇ являв собою Glu (E).

Особливо переважними агоністами АроА-I за цим аспектом винаходу є пептиди, вибрані з групи, що складається з

148: FVLELFENLLERLGDALQKKLK (SEQ ID NO:148);

151: FVLELFENLGERLLDALQKKLK (SEQ ID NO:151);

154: FVLELFENLLERGLDALQKKLK (SEQ ID NO:154);

або їх форми, ацильовані по N-кінцю і/або амідовані або естерифіювані по C-кінцю.

Втілення, що містять внутрішні залишки гліцину, можуть бути синтезовані з високим виходом шляхом конденсації сегментів, таким чином представляючи значні переваги для виробництва у великих кількостях. Конденсація сегментів, тобто з'єднання разом малих складових пептидиних ланцюгів для утворення великого пептидного ланцюга, використовують для отримання великої біологічно активних пептидів, включаючи 44 амінокислотні миметики АроА-I (Nakagawa et al., 1985, J. Am. Chem. Soc. 107:7087-7083; Nokihara et al., 1989, Peptides 1988:166-168; Kneib-Cordoinier et al., 1990, Int. J. Pept. Protein Res. 35:527-538), вважають, що це найбільш оптимальний спосіб у відношенні ціна:ефективність для синтезу великого об'єму продукту з великим виходом для пептидів винаходу.

Переваги синтезу за допомогою конденсації сегментів включають доступність конденсованих преформованих сегментів в розчинній фазі і простоту очищення кінцевого продукту. Недоліки способу включають низьку ефективність скріплення і виходу на стадії конденсації і низьку розчинність певних пептидних послідовностей.

Ефективність приєднання на стадії конденсації може бути значно збільшена шляхом збільшення часу приєднання. Звичайно, збільшення часу приєднання приводить до підвищення рацемізації продукту. (Seiber et al., 1970, Helv. Chim. Acta 53:2135-2150). Але, так як гліцин не має хирального центру, він не зазнає рацемізації (пролінові залишки завдяки стеричному зв'язку також слабо

або взагалі не рацемізуються при тривалому часі приєднання). Тому, втілення, що містять внутрішні залишки гліцину також можна синтезувати у великому об'ємі і з великим виходом за допомогою конденсації сегментів, шляхом синтезування, складових сегментів, які мають перевагу завдяки факту наявності залишку гліцину, який не зазнає рацемізації. Т.ч., втілення, що містять залишки гліцину, представляють значні переваги в синтезі для отримання великих об'ємів продукту.

У ще одному втіленні, агоністи АроА-I являють собою пептиди з 22 амінокислотними залишками по структурі (I) або їх форми, ацильовані по N-кінцю і/або амідовані або естерифіювані по C-кінцю, де кожний X_{10} , X_{13} і X_{14} не є Gly(G).

У ще одному переважному втіленні, агоністи АроА-I являють собою змінні або мутантні форми пептидів, у відповідності зі структурою (I) або їх форми, ацильовані по N-кінцю і/або амідовані або естерифіювані по C-кінцю, в яких:

- X_4 не є Asp (D);
- X_5 не є Phe (F);
- X_6 не є Trp (W);
- X_7 не є Leu (L) або Asp (D);
- X_9 не являє собою Gly (G) або Trp (W);
- X_{12} не є Lys (K);
- X_{13} не є Trp (W);
- X_{14} не є Trp (W);
- X_{15} не є Glu (E);
- X_{16} не є Trp (W) або Leu (L); і/або
- X_{17} не є Tir (W).

У ще одному переважному втіленні, агоністи АроА-I являють собою пептиди, що складаються з 22 амінокислот, у відповідності до структури (I) або їх форми, ацильовані по N-кінцю і/або амідовані або естерифіювані по C-кінцю, в яких X_7 являє собою Leu (L), X_{10} являє собою Tir (W), X_{11} не є Gly (G) і/або X_{14} не є Gly (G). Особливо переважний пептид по цьому аспекту винаходу являє собою пептид 155 (PVLEFLNLWERRLLDALQKKLK, SEQ ID NO: 155)

У ще одному переважному втіленні агоністи АроА-I являють собою пептиди з 22 амінокислотних залишків за формулою (I) або їх форми, ацильовані по N-кінцю і/або амідовані або естерифіювані по C-кінцю, в яких жоден з X_{19} , X_{20} або X_{22} не є Orn. Більш переважно, щоб принаймні два з X_{19} , X_{20} або X_{22} не був Orn. Найбільш переважно, щоб кожний з X_{19} , X_{20} або X_{22} не був Orn.

У ще одному переважному втіленні агоністи АроА-I вибрані з групи пептидів, наведених нижче:

- 144: PVLELFENLLERLLDALQKKLK (SEQ ID NO:144);
- 145: GVLELFENLLERLLDALQKKLK (SEQ ID NO:145);
- 146: PVLELFENLLERLLDALQKKLK (SEQ ID NO:146);
- 147: PVLELFENLLERLFDALQKKLK (SEQ ID NO:147);
- 148: PVLELFENLLERLGDALQKKLK (SEQ ID NO:148);
- 149: PVLELFENLWERRLLDALQKKLK (SEQ ID NO:149);
- 150: PLLELFENLLERLLDALQKKLK (SEQ ID NO:150);
- 151: PVLELFENLGERLLDALQKKLK (SEQ ID NO:151);
- 152: PVFELFENLLERLLDALQKKLK (SEQ ID NO:152);
- 153: AVLELFENLLERLLDALQKKLK (SEQ ID NO:153);
- 154: PVLELFENLLERGLDALQKKLK (SEQ ID NO:154);
- 155: PVLELFNLWERRLLDALQKKLK (SEQ ID NO:155);
- 186: PVLELFQQLERLLDALQKKLK (SEQ ID NO:186);
- 187: PVLELFENLLERLLDALNKKLK (SEQ ID NO:187);
- 188: PVLELFENLLDRLLDALQKKLK (SEQ ID NO:188);
- 189: DVLELFENLLERLLDALQKKLK (SEQ ID NO:189);

та їх форми, ацильовані по N-кінцю і/або амідовані або естерифіювані по C-кінцю.

У ще одному переважному втіленні агоністи АроА-I вибрані з групи пептидів, наведених нижче:

- 144: PVLELFENLLERLLDALQKKLK (SEQ ID NO:144);
- 145: GVLELFENLLERLLDALQKKLK (SEQ ID NO:145);
- 146: PVLELFENLLERLLDALQKKLK (SEQ ID NO:146);
- 147: PVLELFENLLERLFDALQKKLK (SEQ ID NO:147);
- 148: PVLELFENLLERLGDALQKKLK (SEQ ID NO:148);
- 149: PVLELFENLWERRLLDALQKKLK (SEQ ID NO:149);
- 150: PLLELFENLLERLLDALQKKLK (SEQ ID NO:150);
- 151: PVLELFENLGERLLDALQKKLK (SEQ ID NO:151);
- 152: PVFELFENLLERLLDALQKKLK (SEQ ID NO:152);
- 153: AVLELFENLLERLLDALQKKLK (SEQ ID NO:153);
- 154: PVLELFENLLERGLDALQKKLK (SEQ ID NO:154);
- 155: PVLELFNLWERRLLDALQKKLK (SEQ ID NO:155);

та їх форми, ацильовані по N-кінцю і/або амідовані або естерифіювані по C-кінцю.

У ще одному переважному втіленні, агоністи АроА-I являють собою мультимерні форми у відповідності до структур II, III і/або IV, в яких кожний NH незалежно являє собою пептид за формулою (I) або його форми, ацильовані по N-кінцю і/або амідовані або естерифіювані по C-кінцю, або будь-який з переважних пептидів за структурою (I), описаних тут.

У ще одному переважному втіленні, корові пептиди, що складають агоністи АроА-1, не є будь-яким з наступних пептидів

- 75: PVLDEFREKLNEELEALKQKKLK (SEQ ID NO:75);
- 94: PVLDEFREKLNEALEALKQKKLK (SEQ ID NO:94);
- 109: PVLDEFREKLNERLEALKQKKLK (SEQ ID NO:109);
- 237: LDDLLQKWAEAFNQLLKK (SEQ ID NO:237);
- 238: EWLKAFYEKVLKELKELF* (SEQ ID NO:238);
- 241: DWFKAFYDKVFEKFEFF (SEQ ID NO:241);
- 242: GIKKFLGSIWFIKAFVG (SEQ ID NO:242);
- 243: DWFKAFYDKVAEKFEAF (SEQ ID NO:243);
- 244: DWLKAIFYDKVAEKLEAF (SEQ ID NO:244);
- 245: DWLKAIFYDKVFEKFEFF (SEQ ID NO:245);
- 246: EWLEAFYKKVLEKLEKELF (SEQ ID NO:246);
- 247: DWFKAFYDKFFEKFEFF (SEQ ID NO:247);
- 248: EWLKAFYEKVLKELKELF (SEQ ID NO:248);
- 249: EWLKAEYEKVEEKLEKELF* (SEQ ID NO:249);
- 250: EWLKAEYEKVLKELKELF* (SEQ ID NO:250);
- 251: EWLKAFYKKVLEKLEKELF* (SEQ ID NO:251).

У остаточному переважному втіленні, агоністи АроА-I не є будь-яким з пептидів, перелічених в Таблиці X (Секція 8.3. *infra*), який має активність при активації LCAT менш ніж 38% порівняно з нативним людським АроА-I.

5.2. Синтез і очищення пептидів-агоністів АроА-I

Корові пептиди винаходу можна отримати, використовуючи будь-яку відому в даній області методику для отримання пептидів. Наприклад, пептиди можна отримати, використовуючи загальноприйняті синтези пептидів в рідкій фазі або твердій фазі або методики рекомбінантних ДНК.

5.2.1. Хімічний синтез

Корові пептиди можна отримати використовуючи загальноприйняті синтези в розчині і в твердій фазі (Chemical Approaches to the Synthesis of

Peptides and Proteins, Williams et al., Eds., 1997, CRC Press, Boca Raton Florida, і посилання, наведені тут; Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach, Atherton & Sheppard, Eds., 1989, IRL Press, Oxford, England, і посилання, наведені тут).

Інакше, пептиди винаходу можна отримати шляхом конденсації сегментів, як описано, наприклад, Liu et al., 1996, Tetrahedron Lett. 37(7): 933-936; Baca, et al., 1995, J. Am. Chem. Soc. 117:1881-1887; Tarn et al., 1995, Int. J. Peptide Protein Res. 45:209-216; Schnolzer and Kent, 1992, Science 256:221-225; Liu and Tarn, 1994, J. Am. Chem. Soc. 116(10):4149-4153; Liu and Tarn, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:6584-6588; Yamashiro and Li, 1988, Int. J. Peptide Protein Res. 31:322-334).

Конденсація сегментів особливо зручний спосіб для синтезування втілень, що містять внутрішні залишки гліцину. Інші способи, придатні для синтезування пептидів винаходу описані Nakagawa et al., 1965, J. Am. Chem. Soc. 107:7087-7092.

Агоністи ApoA-I, що містять N- і C-кінцеві блокуючі групи, можна отримати, використовуючи стандартні методики органічної хімії. Наприклад, способи для ацилювання N-кінців пептиду або амідування або естерифікування C-кінців пептидів добре відомі в даній області. Способи проведення інших модифікацій по N- і C-кінцям буде очевидні для фахівців в даній області, а також способи захисту будь-якої бокової функціональності при необхідності приєднати кінцеву блокуючу групи.

Фармацевтично прийнятні солі (квантер іони) можна отримати загальноприйнятими способами з допомогою іон обмінної хроматографії або інших способів, які добре відомі в даній області.

Речовини винаходу, які знаходяться в формі тандемних мультимерів можуть бути синтезовані загальноприйнятими способами шляхом додання лінкеру(ів) до пептидного ланцюгу на відповідному етапі синтезу. Інакше, можна синтезувати спіральні сегменти, і кожний сегмент з'єднати з лінкером. Звичайно, актуальний спосіб синтезу буде залежати від композиції лінкеру. Відповідні схеми захисту і їх хімія добре відомі, і фахівці в даній області знайдуть їх.

Речовини винаходу, які знаходяться в формі розгалуженої мережі, можна синтезувати загальноприйнятими способами, використовуючи гримувальні або тетрамерні смоли і хімізм, описану Tarn, 1988, PNAS USA 85:5409-5413, Demoor et al., 1996, Eur. J. Biochem. 139:74-84. Зміни синтетичних смол і стратегію синтезування розгалуженої мережі більш високого і більш низького порядків, а також той, який містить комбінації різних спіральних сегментів корових пептидів знаходяться в межах знань фахівців в даній області пептидної хімії і/або органічної хімії.

Утворення дисульфідних зв'язків, при необхідності, загалом проводять в присутності м'яких окислювачів. Можна використати хімічні окислювачі, або речовини можна надавати атмосферному кисню для посилення цих зв'язків. У даній області відомі різні способи, включаючи описані наприклад, Tarn et al., 1979, Synthesis 955-957; Stewart et al., 1984, Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd Ed., Pierce Chemical Company Rockford, IL; Ahmed et al., 1975, J. Biol. Chem. 250:8477-8482; Pennington et

al., 1991 Peptides 1990 164-166, Giralt and Andreu, Eds, ESCOM Leiden, The Netherlands. Додаткова альтернатива описана Kamber et al., 1980, Helv. Chim. Acta 63:899-915. Спосіб, що проводиться на твердих носіях, описаний Albericio, 1985, Int. J. Peptide Protein Res. 26:92-97. Будь-який з цих способів можна використати для утворення дисульфідних зв'язків в пептидах винаходу.

5.2.2. Рекомбінантний синтез

Якщо пептид складається повністю з амінокислот, що кодується, або якщо тільки його частина складається з таких амінокислот, то частину, що залишилася можна синтезувати за допомогою загальноприйнятих методик рекомбінантної генної інженерії.

Для рекомбінантного отримання, полінуклеотидну послідовність, що кодує пептид, вбудовують у відповідний носій що експресується, наприклад, у вектор, який містить всі необхідні елементи для транскрипції і трансляції вбудованої послідовності, що кодується, або, у разі РНК вірусного вектору, необхідні елементи для реплікації і трансляції. Носій, що експресується потім переносять у відповідну клітку-мішень, яка буде експресувати пептид. У залежності від системи експресії, що використовується, пептид, що експресується потім ізолюють за допомогою методик, що використовуються в цій області. Способи продукції рекомбінантних білків і пептидів також добре відомі в цій області (Sambrook et al., 1989 Molecular Cloning a Laboratory Manual, Gold Spring Harbor Laboratory, N.Y. Ausubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. кожний з яких наведено тут у вигляді посилань).

Для підвищення ефективності отримання може бути створений полінуклеотид для кодування множинних одиниць пептиду, розділених ділянками ферментативного розщеплення - таким чином можуть бути сконструйовані або гомополімери (пептидні одиниці, що повторюються) або гетерополімери (різні пептиди, пов'язані один з одним). Отриманий пептид може бути розщеплений (наприклад, шляхом обробки відповідним ферментом) для відновлення пептидних одиниць. Це може збільшити вихід пептидів, керованих одним промотором. У переважному втіленні поліцистронний полінуклеотид можна створити таким чином, щоб транскрибувалася єдина мРНК, яка кодує безліч пептидів (наприклад, гомополімери або гетерополімери), кожна кодує ділянку операивно приєднана до кеп-незалежної послідовності, контролюючої трансляцію; наприклад, внутрішній сайт входження рибосоми (IRES). При використанні відповідної вірусної системи експресії, трансляція кожного пептиду закодованого в мРНК, спрямовується прямо до транскрипту, наприклад, IRES. Так, поліцистронна конструкція спрямовує транскрипцію єдиної великої поліцистронної мРНК, яка, в свою чергу, спрямовує трансляцію безлічі індивідуальних пептидів. Такий підхід усуває отримання і ферментативний процесінг поліпротеїнів і може значно збільшити вихід пептидів, керованих єдиним промотором.

Для експресії пептидів, описаних тут можна використовувати різних господарів для експресії

векторних систем. Вони включають, не обмежуючись ними: мікроорганізми, такі як бактерії, трансформовані рекомбінантною ДНК бактеріофагу або векторами, що експресуються плазмідною ДНК, що містять відповідну кодуючу послідовність; дріжджі або філаментозні гриби, трансформовані рекомбінантними векторами, що експресуються, дріжджів або грибів, що містять відповідну кодуючу послідовність; системи клітин комах, інфіковані рекомбінантними вірусними векторами, що експресуються (бакуловірус), що містять відповідну кодуючу послідовність; системи рослинних клітин, інфіковані рекомбінантними вірусними векторами, що експресуються (мозаїчний вірус цвітної капусти або мозаїчний вірус тютюну) або трансформованими рекомбінантними плазмідними векторами, що експресуються (Ті плазмід), що містять відповідну кодуючу послідовність або клітинні системи тварин.

Елементи, систем експресії, що експресуються, розрізняються за своєю силою і специфічністю. В залежності від системи, що використовується господар/ вектор, будь-який з ряду відповідних транскрипційних і трансляційних елементів, включаючи конститутивні і індукційні промотори, може бути використаний для експресії вектору. Наприклад, при клонуванні в бактерійних системах, індукційні промотори, такі як рL або промотор бактеріофагу лямбда, рlac, рtrp, рtac (рtrp-lac гібридний промотор) і т.п. можуть бути використані; при клонуванні систем клітин комах можуть бути використані такі промотори як поліедрон промотор бакуловірусу; при клонуванні систем клітин рослин можуть бути використані промотори, отримані з геному рослинних клітин (наприклад, білок теплового шоку; промотор для малої суб'єдиниці RUBISCO; промотор для хлорофіл а/в зв'язуючого білка) або з рослинних вірусів (35S PHK промотор CaMV, поверхневий білок, промотор TMV) можна використовувати; при клонуванні в системах клітин ссавців, можна використати промотори, що отримують з геному клітин ссавців (промотор металлопротеїну) або з вірусів ссавців (пізній промотор аденовірусу, вакцина вірус 7.5.K промотор), при запуску клітинних ліній, які містять множинні копії продукту, що експресується можна використати SV40-, BPV- EBV-засновані віруси в якості зручного селективного маркера.

При використанні векторів з експресією в рослинах, експресія послідовності, що кодує пептиди винаходу, може керуватися будь-ким з ряду промоторів. Наприклад, можна використати вірусні промотори, такі як 35S PHK і 19S PHK промотори CaMV (Brisson et al., 1984 Nature 310:511-514), або промотор поверхневого білку TMV (Takamatsu et al., 1987 EMBO J. 6: 307-311); ще можна використати рослинні промотори, такі як мала суб'єдиниця RUBISCO (Coruzzi et al., 1984, EMBO J. 3: 1671-1680; Broglie et al., 1984, Science, 224: 838-843) або промотор білка теплового шоку, наприклад, соєвий hsp17.5-E або hsp17.3-B (Gurley et al., 1986, Mol. Cell.Biol. 6: 559-565). Ці конструкти можна ввести до рослинної клітини, використовуючи Ті плазмід, Rі плазмід, вірусні вектори рослин, пряму трансформацію ДНК, мікроін'єкцію, електропорацію і т.д. Огляди з такими методиками див.

Weissbach & Weissbach, 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, 421-463; Grierson & Corey, 1988, Plant Molecular Biology, 2d Ed., Blackie, London, Ch.7-9.

В одній з систем експресії у комах, яка може бути використана для отримання пептидів винаходу, Autographs californica, вірус ядерного поліедру (AcNPV) використовується як вектор для експресії чужинних генів. Вірус росте в клітинах Spodoptera frugiperda. Кодуюча послідовність може бути клонована до неосновних дільниць (наприклад, ген поліедру) вірусу і вміщена під контроль FcNPV промотору (наприклад, промотор гену поліедру). Вдала вставка кодуючої послідовності призводить до інактивації гену поліедру і продукції непокритого рекомбінантного вірусу (тобто, вірусу, що втратив білкове покриття, яке кодується геном поліедру). Такі рекомбінантні віруси потім використовують для інфікування клітин Spodoptera frugiperda, в яких експресуються вбудовані гени (Smith et al., 1983, 584, Smith, U.S., Patent No.4,215,051). Подальші приклади систем експресії можна знайти в Current Protocols in Molecular Biology, Vol 2 Ausubel et al., eds.. Green Publish. Assoc. & Wiley Interscience.

В клітинах ссавців як господарів може бути використаний ряд експресуючих систем, заснованих на вірусах. Коли використовується аденовірус в якості вектору, що експресується, що кодує послідовність, можна приєднати до аденовірусного контрольного комплексу транскрипції/ трансляції, тобто до пізнього промотору і лідерної послідовності, що складається з трьох частин. Цей химерний ген потім можна вбудувати в геном аденовірусу за допомогою рекомбінації in vivo або in vitro. Вставка в неосновну дільницю вірусного геному (район E1 або E3) призведе до появи рекомбінантного вірусу, який є життєздатним і здатним експресувати пептид в інфікованих господарях (Logan Shenk, 1984, PNAS USA, 81; 3655-3659). Інакше, можна використати промотор вакцина 7.5K (McKkett et al., 1984, J Virol. 49:857-864; PamcaU et al., 1982, PNAS, 79: 4927-4931). Фахівці в даній області знайдуть і інші системи експресії для отримання пептидів винаходу.

5.2.3. Очищення пептидів

Пептиди винаходу можуть бути очищені відомими в даній області методами, такими як хроматографія із зверненою фазою, високорозрішаюча ліпідна хроматографія, іонообмінна хроматографія, гель-електрофорез, афінна хроматографія і т.п. Необхідні умови, що використовуються для очищення окремого пептиду, будуть залежати, зокрема, від стратегії синтезу, і від таких чинників, як заряд ланцюга, гідрофобність, гідрофільність і т.д. фахівці в даній області виявлять їх. Мультимерні розгалужені пептиди можна очистити, наприклад, за допомогою іонообмінної хроматографії або хроматографії за розміром.

Для очищення з допомогою афінної хроматографії можна використати будь-яке антитіло, яке специфічно зв'язує пептид. Для отримання антитіл, різні тваринні господарі можуть бути імунізовані шляхом введення пептиду, включаючи але не обмежуючись ними: кролики, миші, пацюки і т.д. Пептид можна приєднати до відповідного носія,

наприклад, BSA, за допомогою бокової функціональної групи або лінкер, прикладеного до бокової функціональної групи. Можна використати різні ад'юванти для збільшення імунної відповіді, в залежності від вигляду тваринного господаря, включаючи але не обмежуючись ними: ад'ювант Фрейнда (повний і неповний), мінеральні гелі, такі як гідроксид алюмінію, поверхово активні речовини, такі як лізолецитин, багатотомні спирти Pluronic, поліаніони, пептиди, масляні емульсії, KLH, динітрофенол і людські ад'юванти, що потенційно використовуються такі як BCG і Corynebacterium parvum.

Багатоклональні антитіла до пептиду можна отримати за допомогою будь-якої методики для отримання молекул антитіл шляхом ведення клітинної лінії в культурі. Ці методики включають, не обмежуючись ними: гібридомні технології, спочатку описані Kohler & Milstein, 1975 Nature, 256: 495-497, Karpowakski, U.S. Patent No.4, 376, 110 які наведено тут в посиланнях, гібридомні технології людських В-клітин (Kosbor et al., 1983, Immunology Today, 4: 72; Cote et al., 1983, PNAS USA, 80: 2026-2030) і EBV-гібридомні методики (Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc, 77-96 (1985)). Крім того, можуть бути використані методики, розроблені для отримання "химерних антитіл" 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, US Patent No.4 816 397; Cabilly, US Patent No.4816 567, які наведено тут посиланнями) шляхом сплайсінгу генів з молекули антитіла миші до відповідної антигенної специфічності з генами молекули антитіла людини, відповідної біологічної активності. Або можна отримати "гуманізовані" антитіла (Queen, U.S. Patent No.5 585 089 які наведено тут у вигляді посилань). Інакше, методики, що описують отримання одиничного ланцюгу антитіл (U.S. Patent No.4 946 778) можна адаптувати для отримання пептид специфічних антитіл, специфічних до пептидів, з єдиним ланцюгом.

Фрагменти антитіл, що містять делеції специфічних зв'язуючих сайтів, можна отримати за допомогою відомих методик. Наприклад, такі фрагменти включають, не обмежуючись ними: F(ab')₂ фрагменти, які можна отримати розщепленням молекули антитіла пепсином і Fab фрагменти, які можна отримати видаленням дисульфідних містків F(ab')₂ фрагментів. Інакше, можна сконструювати Fab експресуючі бібліотеки (Huse et al., 1989, Science, 246: 1275-1281), для швидкої і легкої ідентифікації багатоклональних Fab фрагментів, створених специфічно для цікавлячих пептидів.

Антитіла або фрагменти антитіл, специфічні до бажаного пептиду можна ввести, наприклад, до агарози, і антитіло-агарозний комплекс можна використати для імунохроматографії для очищення пептидів винаходу. (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).

5.3. Фармацевтичні складки і способи лікування

Агоністи АроА-I винаходу можна використати для лікування будь-якого порушення у тварин, особливо ссавців, включаючи людину, для яких збільшення концентрації сироваточного ЛПВЩ, активації LCAT і посилення виходу холестерола і ЗТХ є корисним. Такі умови включають не обмежуючись ними: гіперліпідемію, і особливо, гіперхолестеринемію і серцево судинні хвороби, такі як, атеросклероз (включаючи лікування і профілактику атеросклерозу), рестеноз (наприклад, профілактика або лікування атеросклеротичних бляшок, які розвиваються внаслідок медичних процедур, таких як балона ангіопластика), і інших порушень, таких як ендотоксемія, яка часто переходить в септичний шок.

Агоністи АроА-I можна використати самі по собі або в комбінаційній терапії з іншими ліками для лікування згаданих вище порушень. Така терапія включає, не обмежуючись: одночасне або послідовне застосування ліків.

Наприклад, при лікуванні гіперхолестеринемії або атеросклерозу складки агоністу АроА-I можуть вживатися з будь-якою іншою або іншими холестеринпонижаючими терапіями, які застосовуються в даний момент, наприклад, жовчнокислими смолами, ніацином, і/або статинами. Така комбінована терапія може викликати особливо корисні терапевтичні ефекти, так як кожні ліки діють на різні мішені холестеринового синтезу і транспорту, наприклад, жовчнокислі смоли впливають на розпад холестерину на хіломікроніву і ЛПНЩ популяції, ніацин переважно впливає на ЛПДНЩ і ЛПНЩ популяції, статини інгібують синтез холестерину, знижуючи популяцію ЛПНЩ (і можливо підвищуючи експресію рецептору ЛПНЩ), а агоністи АроА-I діють на ЗТХ, збільшення популяції ЛПВЩ, збільшення активності LCAT і посилення виходу холестерину.

В іншому втіленні агоністи АроА-I можна використати разом з фібратами для лікування гіперліпідемії, гіперхолестеринемії і/або серцево-судинних захворювань, таких як атеросклероз.

У ще одному втіленні агоністи АроА-I винаходу можна використати в комбінації з антимікробними і антизапальними агентами для лікування септичного шоку, індукованого ендотоксином.

Агоністи АроА-I винаходу можуть бути складені як пептиди або пептид-ліпідні комплекси, при прийомі яких використовуються різноманітні шляхи надходження агоністу АроА-I до кровотоку. Зразкові складки і режим лікування описані нижче.

5.3.1. Агоністи АроА-I і пептид/ліпідні комплекси як активний інгредієнт

Пептиди агоністи АроА-I можна синтезувати або зробити за допомогою будь-якої технології, описаної в Секції 5.2. і її підпунктах. Стабільні похідні, що мають довгий термін життя, можна отримати за допомогою ліофілізації пептидів - або для отримання великого об'єму для подальшого перескладання або для отримання індивідуальних аліквот або одиниць дози, які можна відновити регідратацією стерильною водою або відповідним стерильним буферним розчином перед застосуванням.

У певних втіленнях можливо є переважним складати і приймати агоніст АроА-I у вигляді пеп-

тид-ліпідного комплексу. Такий підхід має декілька переваг, оскільки комплекс збільшує час напівжиття в системі кровообігу, зокрема, коли комплекс має такі ж розміри і щільність як ЛПВЩ, і особливо як пре- β -1 або пре- β -2 ЛПВЩ популяції. Пептид-ліпідні комплекси можна зручно отримати будь-яким з цілого ряду способів, описаних нижче. Стабільні похідні, що мають довгий термін життя, можна отримати за допомогою ліофілізації або ліофілізації, які описані нижче і є переважним підходом. Ліофілізовані пептид-ліпідні комплекси можна використати для отримання об'єму для фармацевтичного перескладання або для отримання індивідуальних аліквот або дозових одиниць, які можуть бути відновлені регідратацією, стерильною водою або відповідним буферним розчином перед застосуванням.

Різноманітні способи, добре відомі фахівцям в даній області, можна використати для отримання пептид-ліпідних везикул або комплексів. Для цього можна використати цілий ряд доступних способів для отримання ліпосом або протеоліпосом. Наприклад, пептид можна озвучити (використовуючи сонікатор) разом з відповідним ліпідом для формування комплексу. Ще пептид можна об'єднати з преформованими ліпідними везикулами, що призводить до спонтанного формування пептид-ліпідних комплексів. Ще пептид-ліпідні комплекси можуть бути утворені з допомогою діалізу в детергенті, наприклад, суміш пептиду, ліпиду і детергенту діалізується для видалення детергенту і відновлення або утворення пептид-ліпідних комплексів. (Jonas et al., 1986, *Methods in Enzy-mol.* 128: 553-582).

Всі вищезазначені способи можуть бути здійсненими, кожний спосіб має свої труднощі отримання відносно ціни, виходу, продуктивності і збереження. Заявники розробили простий спосіб для отримання пептиду або пептид-фосфоліпідних комплексів, що мають характеристики, схожі з ЛПВЩ. Цей спосіб можна використати для отримання ApoA-I пептид-ліпідних комплексів, він має наступні переваги:

1) більшість всіх включених інгредієнтів використовуються для створення бажаного комплексу, що запобігає марному використанню стартових матеріалів, які є загальними і для інших способів;

2) створюються ліофілізовані компоненти які є вельми стабільними під час зберігання. Отримані комплекси можна відновити негайно перед застосуванням;

3) Отримані комплекси звичайно не потребують подальшого очищення після отримання і перед використанням;

4) Уникають токсичних складових, включаючи детергенти, такі як холати. Крім того, способом отримання легко оволодіти і застосовувати його для отримання GMP (наприклад, в ендотоксин вільному оточенні).

Відповідно до переважного способу, пептид і ліпід об'єднують в системі розчинники, яка розчиняє кожний інгредієнт і може бути повністю видалена з допомогою ліофілізації. Тому розчини повинні бути ретельно підібрані таким чином, щоб бути впевненим в корозчинності і амфіпатичного пептиду і ліпиду. У одному з втілень білок(ки) або

пептид(и), які будуть включені в частки, можна розчинити у водному або органічному розчиннику або суміші розчинників (розчинник 1) (Фосфо)ліпідний компонент розчиняють у водному або органічному розчиннику або суміші розчинників (розчинник 2) який може змішуватися з розчинником 1, і два розчини змішують. Інший спосіб: пептид і ліпід можна ввести в корозчинну систему: суміш розчинників, що змішуються. Відповідна пропорція пептиду (білку) до ліпиду спочатку визначається емпірично, щоб комплекси, що утворюються володіли відповідними фізичними і хімічними властивостями, наприклад, звичайно (але не обов'язково) розміром, схожим з ЛПВЩ. Отриману суміш заморожують і ліофілізують до зневоднення. Іноді додатковий розчинник необхідно додати до суміші для полегшення ліофілізації. Цей ліофілізований продукт можна зберігати протягом довгого періоду, і він залишиться стабільним.

У робочих прикладах, описаних *infra*, пептид 146 (SEQ ID NO: 146) і фосфоліпід розчиняли в метанолі, об'єднували, і потім змішували з ксиліолом перед ліофілізацією. Пептид і ліпід обидва можуть бути додані до суміші двох розчинників. Ще розчин пептиду, розчиненого в метанолі, можна змішати з розчином ліпиду, розчиненого в ксиліолі. Обережно видаляють сіль їх системи розчинників, щоб уникнути висолювання пептиду. Отриманий розчин, що містить пептид і ліпід, корозчинені в метанолі/ксиліолі ліофілізують, отримуючи порошок.

Ліофілізований продукт можна відновити для отримання розчину або суспензії пептид-ліпідного комплексу. Для цього ліофілізований порошок дегідратують водним розчином до відповідного об'єму (часто 5мг пептиду на мл, що зручно для внутрішньовенного введення). У переважному втіленні ліофілізований порошок регідратують фосфатним буфером або фізіологічним розчином. Суміш можна струсити для полегшення регідратації, в більшості випадків відновний етап можна провести при температурі, що дорівнює або вище температури фазового переходу ліпідного компоненту комплексу. Протягом декількох хвилин ясно видно відновлення ліпід-білкових комплексів.

Аліквоту отриманого відновленого похідного можна охарактеризувати для підтвердження, що комплекси в похідному мають бажаний розподіл розміру, наприклад, розподіл розміру ЛПВЩ. Можна використати гель-фільтрацію. У робочих прикладах, описаних *infra*, використали систему гель-фільтрації Pharmacia Superose 6 PLCL. Буфер, що використовується містив 150мМ NaCl в 50мМ фосфатному буфері pH7,4 Звичайний об'єм зразка 20-200мкл комплексів, що містять 5мг пептиду/мл. Швидкість проходження по колонці 0,5 мл/хв. Серії білків відомої молекулярної ваги і діаметру Стокса, а також людські ЛПВЩ використовують як стандарти для калібрування колонки. Білки і ліпопротеїнові комплекси спостерігають за поглинанням або світлорозсіюванням при довжині хвилі 254 або 280нм.

Агоністи ApoA-I винаходу можуть утворювати комплекси з безліччю ліпідів, включаючи насичені, ненасичені, природні і синтетичні ліпіди і/або фосфоліпіди. Відповідні ліпіди включають, не обме-

жуючись ними: малі з алкільним ланцюгом фосфоліпіди, яєчний фосфатиділхолін, соєвий фосфатиділхолін, дипалмітоїл фосфатиділхолін, димерістоїл фосфатиділхолін, дістероїл фосфатиділхолін, 1-міристоїл-2-палмітоїл фосфатиділхолін, 1-палмітоїл-2-міристоїл фосфатиділхолін, 1-палмітоїл-2-стероїл фосфатиділхолін, 1-палмітоїл-2-стероїл фосфатиділхолін, 1-стероїл-2-палмітоїл фосфатиділхолін, діолеоїл фосфатиділхолін, діолео фосфатиді-летаноламін, ділауроїл фосфатиділгліцерин фосфатиділхолін, фосфатиділсерин, фосфатиділетаноламін, фосфатиділінозитол, сфингомієлін, сфинголіпіди, фосфатиділгліцерин, дифосфатиділгліцерин, димерістоїл фосфатиділгліцерин, дипалмітоїл фосфатиділгліцерин, дистероїл фосфатиділгліцерин, діолеоїл фосфатиділгліцерин, димерістоїлфосфатидіова кислота, дипалмітоїл фосфатидіова кислота, димерістоїлфосфатиділетаноламін, дипалмітоїл фосфатиділетаноламін, димерістоїл фосфатиділсерин, дипалмітоїл фосфатиділсерин, фосфатиділсерин мозку, сфингомієлін мозку, дипалмітоїл сфингомієлін, дистероїл сфингомієлін, фосфатидная кислота, галактоцеребозид, гангліозиди, церебозиди, дилаурілфосфатиділхолін, (1,3)-D-маннозил-(1,3) дигліцерид, аміно-фенілглікозид, 3-холестеріл-6'-глікозидіо-гексил ефір гліколіпідів і холестерин і його похідні.

Заявники відкрили, що коли агоністи АроА-I винаходу утворюють комплекс із сфингомієліном, всі ЛПВЩ трє- β -подібні частки видалено. Відповідно до цього в переважному втіленні винаходу, агоністи АроА-I приймають в комплексі зі сфингомієліном.

5.3.2. Способи лікування

Пептиди-агоністи АроА-I або пептид-ліпідні комплекси винаходу можна приймати будь-яким шляхом, який веде до біодоступності в циркуляції. Це найкращим образом може бути досягнуто парентеральним введенням, включаючи внутрішньовенне (ВВ), внутрішньом'язове (ВМ), внутрішньошкірне, підшкірне (ПШ) і інтраперітональне (ІП) введення. Але можуть бути використані і інші способи введення. Наприклад, всмоктування в шлунково-кишковому тракту може бути досягнуто при пероральному застосуванні (включаючи але не обмежуючись: ковтання, і підязичне застосування), за умови, що для уникнення або мінімізації руйнування активного інгредієнту, наприклад, в кислому оточенні слизової ротової порожнини, шлунку і/або малого кишечника застосовують відповідні складки (наприклад, ентеросолюбільні покриття). Ще можна використати введення через слизові оболонки, наприклад, вагінальним або ректальним шляхом для уникнення або зменшення руйнування в ШКТ. Ще, складки винаходу можна застосовувати черезшкірно (трансдермально) або за допомогою інгаляції. Треба зазначити, що переважне застосування можна змінювати в залежності від умов, віку і складності стану пацієнта.

Дійсну дозу агоністів АроА-I або пептид-ліпідних комплексів можна змінювати в залежності від способу введення, вона має бути доведена таким чином, щоб концентрація, що досягається в плазмі крові була від 100мг/л до 2г/л. Результати на тваринах, описані тут, показали, що агоністи

АроА-I винаходу, пов'язані з ЛПВЩ компонентом, мають передбачуване напівжиття в організмі людини приблизно 5 днів. Таким чином, в одному з втілень агоністи АроА-I вводять за допомогою ін'єкції в дозі від 0,5мг/кг до 100мг/кг раз на тиждень. У іншому втіленні бажаний рівень в сироватці можна досягти постійним введенням або переривистим введенням, приблизно від 0,5мг/кг/годину до 100мг/кг/годину.

Токсичність і терапевтична ефективність різних агоністів АроА-I може бути визначено за допомогою стандартних фармацевтичних методик в клітинній культурі або на експериментальних тваринах для визначення LD 50 (доза, летальна для 50% популяції) і ED 50 (доза, терапевтично ефективна для 50% популяції). Відношення доз між токсичним і терапевтичним ефектом являє собою терапевтичний індекс і може бути виражене як відношення LD50/ED50. Пептиди-агоністи АроА-I, що показують високі терапевтичні індекси, переважні.

5.3.3. Фармацевтичні складки

Фармацевтичні складки винаходу, що містять агоніст АроА-I пептиду або пептид-ліпідний комплекс в якості активного інгредієнту в фармацевтично прийнятному носії, відповідним для застосування і доставки *in vivo*. Так як пептиди можуть містити кислотні і/або основні кінцеві і/або бічні ланцюги, пептиди можна включати до складу або в формі вільних кислот або основ, або в формі фармацевтично прийнятних солей.

Похідні для ін'єкцій включають стерильні суспензії, розчини або емульсії активного інгредієнту у воді або масляних носіях. Складки також можуть включати складаючі агенти, такі як суспендуючі, що стабілізують і/або диспергуючі агенти. Складки для ін'єкцій можуть бути в формі одиниці дози, наприклад, в ампулах або мультидозових контейнерах, і можуть містити додані запобіжники.

Крім того, складки для ін'єкцій можуть бути у вигляді порошку для відновлення перед застосуванням у відповідному носії, включаючи, але не обмежуючись: стерильну, вільну від пірогенів воду, буфер, розчин декстрану і т.д. Тоді агоніст АроА-I можна ліофілізувати або отримати ліофілізований пептид-ліпідний комплекс. Похідні, що зберігаються можна представити в формі одниничної дози і відновити перед використанням *in vivo*.

Для пролонгованої доставки активний інгредієнт можна скласти у вигляді базового запасу, для застосування у вигляді імплантату, наприклад, підшкірна, внутрішньошкірна або внутрішньом'язова ін'єкція. Так, наприклад, активний інгредієнт може бути складений з відповідними полімерними або гідрофобними матеріалами (наприклад, емульсії в маслі), або іонообмінними смолами, або у вигляді помірно розчинних похідних, наприклад, в формі помірно розчинної солі агоністу АроА-I.

Крім того, можна використовувати системи трансдермальної доставки, вироблені у вигляді адгезивних дисків або петчів, які повільно виділяють активний інгредієнт для черезшкірної адсорбції. У цьому випадку можна використати підсилювачі проникнення для полегшення трансдермального проникнення активного інгредієнту. Особливо вдалий ефект можна отримати

шляхом включення агоністів АроА-I винаходу або пептид-ліпідного комплексу в нітрогліцеринові накладки для пацієнтів з ішемічною хворобою серця і гіперхолестеринемією.

При пероральному застосуванні фармацевтичні складки можуть мати форму наприклад, таблеток або капсул, отриманих загальноприйнятими способами з фармацевтично прийнятними наповнювачами, такими як: зв'язуючі агенти (наприклад, прежелатинізований крохмаль кукурудзи, полівінілпіралідон або гідроксіпропілметил целюлоза), наповнювачі (лактоза, мікрокристалічна целюлоза або гідрогенфосфат кальцію), мастильні матеріали (стеарат магнію, тальк або кремній), дезінтегранти (картопляний крохмаль або крохмаль гликолат натрію), що зволожують агенти (лаурілсульфат натрію). Таблетки можна покрити за допомогою способів, добре відомих в даній області. Рідкі форми для перорального застосування можуть мати форму розчинів, сиропів або суспензій, або форму сухого продукту для відновлення водою або іншими відповідними носіями перед застосуванням. Такі рідкі форми отримують з фармацевтично допустимими добавками, такими як суспендуєчі агенти (сироп сорбітолу, похідна целюлоза або гідрогеновані їстівні жири), емульгуючі агенти (лецитин або акація), неводні носії (мигдалеве масло, масляний ефір, етиловий спирт або фракціоновані рослинні масла) і запобіжники (метил або пропіл-β-гідроксibenзоати або горобинова кислота). Форми також можуть містити відповідні буферні солі, віддушки, що підфарбовують і підсолоджують агенти. Форми для перорального застосування можуть бути складені таким чином, що дають вихід, що контролюється до активного складового.

Для буккального застосування складки можуть мати форму таблеток або коржиків, складених належним чином. Для ректального і вагінального застосування активний інгредієнт можна складати у вигляді розчинів (клізми), супозиторіїв або мазей.

Для застосування шляхом інгаляцій активний інгредієнт можна доставляти в формі аерозольного спрею в упаковці з клапаном під тиском або розпилювача з використанням відповідного пропеланту, наприклад, діхлордифторметану, трихлорфторметану, дихлортетрафторметану, діоксиду вуглеводу або іншого відповідного газу. У разі аерозолів під тиском, одиницю дози можна визначити, забезпечивши об'єм для доставки відміреної кількості. Капсули і картриджі, наприклад, желатин для використання в інгаляторі або інсуфляторі можна скласти із вмістом порошку, змішаного із складовим, відповідною порошковою основою є лактоза або крохмаль.

При бажанні складки можуть бути представлені в упаковці або диспергуючим приладі, який може містити одну або більше форм одиниці дози, що містить активний інгредієнт. Упаковка може, наприклад, містити металеву або пластикову фольгу, таку як бластерна упаковка. Упаковка або диспергуючий пристрій можна супроводити інструкціями по застосуванню.

5.4. Інше використання

Агоністи АроА-I винаходу можна використати в тестах *in vitro* для вимірювання сироваточних ЛПВЩ, наприклад для діагностичних цілей. Так як

агоністи АроА-I зв'язуються з ЛПВЩ компонентом сироватки, агоністи можна використати як маркери для ЛПВЩ популяції. Крім цього, агоністи можна використати як маркери для субпопуляції ЛПВЩ, ефективною в ЗТХ. Для цього агоніст додають або змішують із зразком сироватки пацієнта, і після відповідного часу інкубації, вимірюють ЛПВЩ компонент, визначаючи введений АроА-I агоніст. Можна використати мічені агоністи (наприклад, радіактивні позначки, флуорисцентні позначки, ферментні позначки, барвники і т.д.) або в імуно-тестах, використовуючи антитіла (фрагменти антитіл), специфічні до агоністу.

Крім того, мічені агоністи можна використати в процедурах представлення (САТ екрани, ММ екрани) для візуалізації системи циркуляції для відстеження ЗТХ, для візуалізації накопичення ЛПВЩ в жирових смужках, атеросклеротичних пошкодженнях і т.д. (де ЛПВЩ повинні бути активними у виході холестерину).

6. Приклад: Синтез пептидів-агоністів АроА-I

Пептиди, описані в таблиці X (Секція 8.3. *infra*) синтезовані і охарактеризовані як описано в секціях нижче. Пептиди також проаналізовані структурно і функціонально, як описано в Секціях 7 і 8 *infra*.

6.1 Синтез корових пептидів

Пептиди синтезували на твердій фазі за методикою Mem-field (Memfield, 1969, J.Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154), використовуючи 0,25ммол р-алкоксibenзілової спиртової смоли (HMP смоли) (Wang, 1973, J.Am. Chem. Soc. 95: 1328-1333) і Fmoc хімії. Всі синтези проводили на автоматичному синтезаторі пептидів Applied Biosystems AB.I, модель 43 OA (Perkin-Elmer, Foster City, CA). Дозвіл і час активації, що використовується для кожного парного циклу, показані в Таблиці V, приведений нижче:

Таблиця V

Парні активаторні цикли

Назва циклу	Амінокислоти	Розчинник	Час	Час активації	Час Періоду*
Afmc 31	Asn(trt) His(trt) Lys(Boc)(trt)	-0,4мл DCM -1,2мл NMP -1,0мл HOBT/NMP	-7хв.	-51хв.	1=50сек 2=36сек
Afmc 32	Arg(Pmc) Gln(trt), Aib	-0,8мл DCM -1,2мл NMP -1,0мл HOBT/NMP	-32хв.	-51хв.	1=60сек 2=40сек
Afmc 33	Ala, Asp(OtBu), Glu(OtBu), Glu, Ile, Leu, Met, Phe, Pro	-0,4мл DCM -0,8мл NMP -0,1мл HOBT/NMP	-4хв.	-36,5хв.	1=38сек 2=27сек
Afmc 34	Val	-0,4мл DCM -0,8мл NMP -0,1мл HOBT/NMP	-4хв.	-61,5хв.	1=38сек 2=27сек

* 1= перенесення з картриджу до активатора

2= перенесення з активатора до картриджу

DCS дициклогексилкарбодіімід

HOBT 1-гідроксибензотріазол

NMP N-метилпіралідон

Boc - t-бутилкарбоніл

Ptc пентаметилпропан-6-сульфоніл

OtBu t-бутиловий ефір

trt тритил

Смоли промивають NMP між кожним парним кроком. Протокол одного циклу синтезу показаний нижче на таблиці VI.

Таблиця VI

Парний протокол для одного циклу синтезу

Операція	Час (хв.)
1. Депротекція (10% піперидину в NMP)	20
2. Відмивання (NMP)	5
3. Спаровування (4екв. Fmoc-амінокислота-НОВт ефір в NMP, реактивнація 50хв.)	61
4. Відмивання	3
5. Зразок смоли (необов'язково)	3
Всього	92

Всі амінокислоти, виключаючи Fmoc-β-(1-нафтил)аланін, приєднують таким чином. Fmoc-β-(1-нафтил)аланін приєднують ручним способом. Для ручного приєднання 1ммоль Fmoc-P-(1-нафтил)аланина і 1ммоль 2-(1H-бензотріазол-1-іл)-1,1,3,3-тетраметилуроніум тетрафторборат (TBTU) розчиняють в 5мл NMP і змішують з пептидною смолою.

Після цього 2ммоль N-етілдізопропіламіну додають, суміш струшують протягом 2 годин, і пептид-смола промивають 6 разів в 10мл NMP. Ефективність приєднання відстежують, використовуючи тест Kaiser (Kaiser, 1970, Anal. Biochem. 34: 59577), і приєднання повторюють при необхідності. Після приєднання нафтилаланіна, що залишився, синтез продовжують автоматично, як описано вище.

6.2. Синтез амідів пептиду

Як відмічено в Таблиці X (Секція 8.3., *infra*) амід пептиду синтезують з використанням Rink амідної смоли, що містить Fmoc-Rink амід вручну 4-(2', 4'-діметилфеніл)-Fmoc-феноксиметил (Rink, 1987, Tetrahedron Lett., 28:3787-3790) і протокол синтезу, описаний в Секції, *supra*.

6.3. Синтез пептидів, ацильованих по N-кінцю

Як відмічено в Таблиці X (Секція 8.3. *infra*) N-кінцеві ацильовані форми пептидів отримують шляхом представлення пептиду, пов'язаного зі смолою, отриманого як описано в Секції 6.1. або 6.2. *supra*, відповідному ацилюючому агенту.

Для N-кінцевих ацильованих пептидів, 15 мл розчини оцтового ангідриду (10% в NMP) додають до кожного 1г пептиду, пов'язаного зі смолою, суміш перемішують протягом 5хв., і смола регенерують фільтрацією. Регенеровану смола відмивають три рази NMP (15мл) і три рази етанолом (15мл).

6.4. Розщеплення і депротекція

Після синтезу пептиди, описані в секціях 6.1., 6.2., і 6.3. *supra*, відщеплюють від смоли і депротектують в відщеплюючому розчині, утримуючим 92,5% трифтороцтової кислоти (ТФО)/ 3,75% анізолу/ 3,75% додекантоїлу (v/v/v). Для ефективного відщеплення 10мл відщеплюючого розчину додають до 0,25ммоль пептидної смоли і перемішують протягом 1,5 годин при кімнатній температурі. Смола промивають фільтрацією і відщеплений/депротектирований пептид преципітують діетіловим ефіром, промивають ефіром і висушують під вакуумом.

Відщеплюючий коктейль для пептидів, що містять Trp (W) а також для амідів пептидів, склада-

ється з 86,5% ТФО, 4,5% води, 4,5% 1,2-етандітіолу, 4,5% анізолу і 3% фенолу.

6.5. Очищення

Неочищені відщеплені пептиди Секції 6.4. очищають ВЖХ із зверненою фазою. Чистоту кожного пептиду підтверджують різними аналітичними процедурами (аналітична ВЖХ, капілярний електрофорез). Капілярний електрофорез проводять на кремнієвих капілярах 70см довжини і з внутрішнім діаметром 75мкм (Thermo Separation Products). Сепарацію проводять при 25°C, 15kv, ЧАС 35хв. в двох різних буферних системах: Буфер 1: (20mM Na₂B₄O₇ pH9.2) і буфер 2 (10mM Na₂HPO₄, pH2,5). ВЖХ розділення проводять на Nucleosil 7C18 або на Nucleosil 7C4 колонках (Macherey Nagel, Germany) 250×21мм при швидкості потоку 8мл/хв. Елюцію градієнту проводять, використовуючи суміш 0,1% ТФО у воді (Розчинник А) і 0,1% ТФО в ацетонітрилі (Розчинник В). Градієнти, що використовуються підстроюють під вимоги кожного пептиду.

6.6. Характеристика

Мас-і амінокислотний аналіз очищених пептидів, описаний в секції 6.5 проводять за допомогою мас-спектрометрії і амінокислотного аналізу, відповідно, як описано нижче. Деградацію Едмана використовують для секвенування.

6.6.1. ЖХ-МС

Стандартний комерційно доступний тристадійний квадрупольний мас-спектрометр (модель TSQ 700; Finnigan MAT, San Jose CA, USA), що складається з 4 частин, використали для визначення маси. Пневматично пристосований інтерфейс електророзпилення (ESI) використовували для внесення зразка в джерело іонізації атмосферного тиску мас-спектрометру. Інтерфейс розпилювача приводили в дію при позитивному потенціалі 4,5kV. Температуру сталних капілярів підтримували при 200°C, тоді як множник перебував при 70°C. Позитивні іони, ті, що генеруються в процесі іонного випаровування поступали до аналізатора мас-спектрометру. Множник був відрегульований на 1000V. Відділення аналізатору мас-спектрометру перебував при 4Е-6. Всі вимірювання виконували при дозволі <1од.маса.

Пептиди аналізували шляхом прямої інфузії очищених пептидів з використанням мікроборної системи ABI (Applied Biosystems), що складається з шприцевого насоса (модель 140В), У Ф детектора (модель 785А) і печі-інжектору (модель 112А). Система розчинників складалася з води (розчинник А) і ацетонітрилу (розчинник В), кожний з яких містив 0,1% TFA. Пептиди вводили з використанням або градієнту, або ізократичних умов і елюїровані з колонки Aquarog C18. Швидкість звичайно становила 300мкл/хв. Концентрація кожного пептиду була біля 0,03мг/мл, 20мкл з яких були введені кроликам (наприклад, 30пмоль).

МС експерименти з повним скануванням проводили шляхом сканування квадруполь 1 з m/z 500-1500 за 4сек. Дані отримували з використанням Alpha DEC станції і обробили з використанням програмного пакету, наданого Finnigan MAT (BIOWORKS).

6.6.2. Амінокислотний аналіз

Амінокислотний аналіз проводили на амінокислотному аналізаторі ABI (Applied Biosystems) 420. Ця система складається з трьох модулів: пристрій для гідролізу і дериватизації, ВЕЖХ на зверненій фазі і система обробки даних. Зразок пептиду наносять (три рази при потрібному повторі) на пористий скляний слайд і послідовно гідролізують в умовах газової фази (155°C, 90мін.). Після видалення HCL, отримані амінокислоти перетворюють в PTC-AA (фенілтіокарбамоїл-амінокислоти) за допомогою PITS (фенілізотиоціаната). Після перенесення на HPLC петлі для зразків отриману суміш розділяють на фракції на колонці Aquarog C18 з використанням градієнта (розчинник А: 50ммоль ацетату амоній (NH₄Ac), pH5.4, у воді, розчинник В: 32ммоль ацетату натрію (NaOAc) у водному ацетонітрилі) в умовах контролю температури. Дані ВЕЖХ обробляють за допомогою програмного пакету, представленого Applied Biosystems. Кількісний підрахунок проводять відносно пептидно-го стандарту, наданого Applied Biosystems.

6.7. Синтез розгалужених мереж

Пептид-ліганду з тетрамірним кором і пептид-ліганду з гримувальним кором синтезують як описано в Demoor et al., 1996, Eur. J.Biochem. 239: 74-84. Тетрамірний і гримувальний корові матрикси, все ще пов'язані з 4-метилбензгліциліном смоли, далі використовують як ініціюючу пептид-ліганду для автоматичного синтезу корових пептидів як описано раніше. Розгалужені мережі, що містять спіральні сегменти різних амінокислотних композицій, можуть бути синтезовані з використанням ортогонального синтезу і захисних стратегій, добре відомих в даній області.

7. Приклад: аналіз структурного і ліпідного скріплення AroA-I пептидів

Характеристики структурного і ліпідного скріплення очищених пептидів, синтезованих, як описано в розділі 6, supra, були визначені за допомогою методів кругового діхроїзму, флуоресцентної спектроскопії і ядерного магнітного резонансу.

7.1. Круговий діхроїзм

Цей приклад описує переважний метод визначення міри спіральності корових пептидів даного винаходу як вільних в буфері, так і в присутності ліпідів.

7.1.1. Експериментальний метод

Ультрафіолетовий спектр кругового діхроїзму в далекій області був записаний між 190 і 260нм (з інкрементами 0,5нм або 0,2нм) за допомогою AVIV62DS спектрофотометру (AVIV Associates, Lakewood, NJ, USA), оснащеного термоелектричним тримачем кювети і пристроєм для зміни зразків. Прилад було відкалібровано за допомогою (+)-10-камфороїної кислоти. Від першого до третього зображення отримано для кожного зразка з використанням 10см, 5см, 1см, і 0,1см довжин кварцових кювет Suprasil відповідно, для концентрацій пептиду від 10⁻⁷ до 10⁻⁴М. Була зафіксована ширина смуги 1,5нм і швидкість сканування становила 1сек. на крок довжини хвилі.

Подані дані є середнім принаймні з двох або трьох незалежних вимірювань.

Після віднімання фону спектри перетворювали в одиниці молярної еліптичності (θ) на залишок в град, см² дмоль⁻¹. Концентрацію пептидів визначали за допомогою амінокислотного аналізу, а також з допомогою абсорбційної спектроскопії на Perkin Elmer Lambda 17 УФ/Вид. спектрофотометрі у випадку, якщо пептиди містили хромофор (триптофан, дансил, нафтилаланін).

Сpektри кругового діхроїзму отримували з вільними, непов'язаними пептидами (5мкМ в 5Мм фосфатному буфері, pH7,4); з комплексами пептид-SUV (20:1 EPC:Chol., Ri=30 і Ri=50); з комплексами пептид-міцела (1-мірістоїл-2-гідрокси-sn-глицеро-3 фосфатиділхолін, Ri=100); і з вільними непов'язаними пептидами в присутності 2,2,2-трифтороетанолу (TFE) (5мкМ пептид, 90% об'єм TFE).

SUVs отримували шляхом диспергування ліпідів (10мМ, 20:1EPC:Chol., Avanti Polar Lipids, AL) в фосфатному буфері (5мМ, pH7,4) з барботуванням N₂ протягом 5 хвилин, з подальшим озвученням (1,5г) в ультразвуковій бані. Гомогенність препарату перевіряли з допомогою FPLC.

Міцели отримували шляхом розчинення ліпідів (6мМ 1-миристоїл-2-гідрокси-sn-глицеро-3 фосфатиділхолін, Avanti Polar Lipids, AL) в фосфатному буфері з барботуванням N₂ протягом 5 хвилин і подальшим струшуванням.

Для того, щоб отримати комплекси пептид-SUV, SUVs додають до пептидів (5мкМ в 5Мм фосфатному буфері, pH 7,4) в молярному відношенні фосфоліпід/пептид (Ri)/ рівному 30 або 50.

Для отримання комплексів пептид-міцела, міцели додають до пептидів (5мкМ в 5Мм фосфатному буфері, pH7,4) при Ri=100.

Всі спектри було записано при 37°C.

7.1.2. Визначення спіральності

Міру спіральності пептидів в різних умовах визначають за середньої залишкової еліптичності при 222нм (Chen et al., 1974, Biochemistry 13: 3350-3359) або шляхом порівняння отриманого спектру кругового діхроїзму з довідковими спектрами, що є в розпорядженні в базі даних (16 спіральних довідкових спектрів з Provencher a Glockner, 1981, Biochemistry 20: 33-37; довідкові спектри денатурованих білків з Vennyaminov et al., 1993, Anal. Biochem. 214: 17-24) з використанням CONTIN алгоритму підбору кривих версії 2DP, CD-1 пакет (Aug. 1982) (Provencher, 1982, Comput.Phys.Commun. 27:213-227, 229-242). Допустиме наближення отримують з використанням методології статистичного аналізу, наданого алгоритмом CONTIN. Помилка всіх методів становила ±5% спіральності.

Пептид 146 (SEQ ID NO: 146) має α-спіральний вміст високої міри (86% спіральності) в буфері при концентрації 5мкМ. Спіральність пептиду 146 (SEQ ID NO: 146) збільшується в присутності як SUV(100% спіральності), так і міцел (100% спіральності), а також в присутності TFE (95% спіральності), який є розчинником і завдяки значно нижчій діелектричній константі (ε=26,7), ніж у воді (ε=78,4), стабілізує α-спіралі і внутрішньопептидні водневі зв'язки при концентраціях 5-90% (об/об).

З таблиці 10, розділ 8.3, *infra*, видно, що ті пептиди, які виявляють високу міру активації LCAT ($\geq 38\%$), загалом володіють значною α -спіральною структурою в присутності ліпідів ($\geq 60\%$ спіральної структури у випадку, якщо неблоковані пептиди містять 22 або більше амінокислот або блоковані пептиди, утримуючі 18 або менше амінокислот; $\geq 40\%$ спіральної структури у випадку, якщо неблоковані білки містять 18 або менше амінокислот), в той час як пептиди, що виявляють слабу LCAT активність або що не виявляють її взагалі, мають слабу α -спіральну структуру. Однак в деяких випадках пептиди, які містять значну α -спіральну структуру, в присутності ліпідів не викликають значної активації LCAT. Як наслідок, вважається, що здатність корових пептидів приймати α -спіральну структуру в присутності ліпідів є характерною рисою корових пептидів, оскільки виявляється, що здатність формувати α -спіраль в присутності ліпідів потрібна для активації LCAT.

7.2. Флуоресцентна спектроскопія.

Здатність пептидів, синтезованих в розділі 6, *supra*, зв'язувати ліпіди була протестована за допомогою вимірювань флуоресценції з міченими пептидами, в цьому випадку триптофаном (Trp або W) або нафтилаланіном (Nal). Флуоресцентні спектри були записані на Fluoromax від Spex (Jobin-Yvon), обладнаному ксеноновою лампою 150W, двома монохроматорами (збудження і випускнення), фотопомножувач R-928 для визначення чутливості в червоному діапазоні до 850nm і термоелектричною чарункою з магнітним розмішувачем. Кварцові Suprasil кювети були використані для вимірювань в діапазоні мікромолярних концентрацій. Пристрій варіювання щільності (від 0,4 до 5nm) дозволяють модулювати падаючу що і випускається інтенсивність відповідно до концентрації пептиду, що використовується. Представлені результати загалом є середніми між 2-4 спектрами. Концентрація пептидів була визначена з допомогою абсорбційної спектрометрії на Philips Pu 880 з використанням смуги поглинання Trp ($\epsilon_{280\text{nm}}=5550\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ в трісбуфері) або Nal ($\epsilon_{224\text{nm}}=92770\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ в метанолі).

Флуоресцентний спектр пептидів було записано між 290 і 450nm в тріс-HCL буфері (20mM, pH=7,5), в присутності і відсутності ліпідних везикул. Малі ламелярні везикули були сформовані після регідратації в буфері ліофілізованих фосфоліпідів, розчинення і озвучення в потоці N_2 . Ліпіди, що використовуються були або яєчний PC/Chol (20:1), або POPC/Chol (20:1). Спектри були записані при концентрації пептидів 2мкМ і температурі 37°C. Довідковим флуоресцентним стандартом у випадку Trp був N-ацетилтриптофаніламід (NATA).

Дослідження скріплення ліпідів були проведені шляхом поступового додання ліпідних везикул до пептидів в розчині при 2мкМ (щільності: 5nm для збудження і 1,5nm для випускнення). При визначенні інтенсивності флуоресценції було взято до уваги ефект розбавлення. Концентрація ліпідів варіювала від 10 до 600мкМ, а молярні відношення ліпід/пептиди (Ri) мінялося від 5 до 300. Було встановлено довжину хвилі збудження 280nm і для Trp, і для Nal.

7.2.1. Спектральний аналіз флуоресценції

Дані були безпосередньо записані і оброблені на IBM-PC, зв'язаному зі спектрофлуориметром через DM3000F програмне забезпечення від Spex. Спектр був скореговано шляхом віднімання внеску розчинника і застосування коефіцієнту, даного конструктивного і такого, що береться уваги варіювання відповіді фотопомножувача при зміні довжини хвилі.

Спектр флуоресценції пептидів був охарактеризований довжиною хвилі максимуму флуоресценції випускнення і квантовим виходом в порівнянні з NATA у разі пептидів, мічених триптофаном. Процес скріплення з ліпідами був проаналізований шляхом обчислення зміщення довжини хвилі максимуму флуоресценції випускнення (λ_{max}) і зміною відносної інтенсивності флуоресценції при зміні концентрації ліпідів. Відносна інтенсивність флуоресценції визначається як наступне відношення: $(I - I_0)/\lambda_{\text{max}}/I_0/\lambda_{\text{max}}$. Обидві величини I і I_0 були виміряні при λ_{max} , відповідної початковому вільному стану білків, тобто без ліпідів. I - інтенсивність при певному відношенні ліпідів до пептидів, I_0 - той же параметр, виміряний у відсутності ліпідів. Відсутність різниці між цими двома величинами (I і I_0) має місце при відсутності взаємодії між пептидами і ліпідами.

7.2.2. Результати і обговорення

У таблиці VII представлено дані про властивості пептиду 149 (PVLELFENLWERLLDALQKKLK; SEQ ID NO: 149) зв'язувати ліпіди. Даний пептид схожий за первинним сиквенсом з пептидом 146 (SEQ ID NO: 146), за винятком того, що він містить W (Trp) залишок в положенні 10.

Таблиця VII

Результати флуоресцентного вимірювання здатності пептида 149 (SEQ ID NO: 149) зв'язуватися з ліпідними везикулами

Молярне відношення ліпід/пептид (Ri)	I/I ₀	λ_{max} (nm)
0	0	347
5	19,7	334,5
10	31,4	329
30	49,4	325,5
60	64,3	325
100	77	325,5
200	84	325

Довжина хвилі, відповідна максимуму емісії флуоресценції триптофану (λ_{max}) пептиду 149 (SEQ ID NO: 149) в буфері при концентрації 2мкМ, становить 347nm. Ця довжина хвилі відповідає триптофану, який схильний до впливу водного оточення, якщо порівнювати з NATA ($\lambda_{\text{max}}=350\text{nm}$). Пептид 149 (SEQ ID NO: 149) ефективно зв'язується з EPC/Chol (20:1) малими ламелярними везикулами, на що вказує той факт, що триптофан виявляється екранованим (довжина хвилі максимуму флуоресценції випромінювання триптофану зміщується з 347nm до 325nm), і висока інтенсивність флуоресценції збудження (див. таблицю VII). Триптофанові залишки виявляються найбільш екранованими при молярному відношенні ліпід/пептид, приблизно рівному 30.

Інші пептиди, що виявляють високу міру спіральності в присутності ліпідів $\geq 60\%$ для неблокованих пептидів, що складаються з ≥ 22 амінокислот

або для блокованих пептидів, що містять ≤ 18 амінокислот; $\geq 40\%$ для неблокованих пептидів, що містять ≤ 18 амінокислот), оцінену за методом кругового діхроїзму, як показано у відділі, *supra*, також продемонстрували хороші скріплення ліпідів. Звичайно, серед всіх пептидів, вибраних за допомогою скрінгу за методом кругового діхроїзму, тільки у одиничних пептидів були визначені їх властивості зв'язувати ліпіди.

7.3. Ядерний магнітний резонанс

Цей приклад описує ЯМР метод для аналізу структури корових пептидів справжнього винаходу.

7.3.1. Підготовка зразків для ЯМР аналізу

Зразки були приготовані шляхом розчинення 5 мг пептидів в 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O , що містить слідові кількості 2,2-діметил-2-сила-5-пентан сульфону (DSS) як внутрішнього стандарту для визначення хімічного зсуву. Деякі із зразків містили трифтороетанол (TFE) (виражений в об'ємних %). Загальний об'єм зразка становив 500 мкл і концентрація пептидів дорівнювала приблизно 5 мМ.

7.3.2. ЯМР спектроскопія

^1H ЯМР спектр був отриманий при 500 МГц з використанням Bruker DRX500 спектрометра, оснащеного B-VT2000 пристроєм контролю температури. Експерименти записувалися в одному з двох вимірювань з використанням стандартної послідовності тактових сигналів. (Two Dimensional NMR Spectroscopy, Eds. W.R. Croasmun and RMK Carlson, 1994, VCH Publishers, New York, USA). Пригнічування води було досягнуто з низькою енергією попереднього насичення протягом 2 секунд. Двомірні експерименти проводили в фазочутливому режимі з використанням фазового інкременту, пропорційного часу (TPPI), і спектральної ширини 6000 Гц в обох вимірюваннях. 40 сканувань були додані для 400 т₁ інкрементів з 2048 точками даних. Дані були отримані з використанням FELIX95 програмного забезпечення (Molecular simulations) на INDIG02 робочій станції (Silicon Graphics). Дані були приведені до нуля для отримання матриксу даних 2K*2K і аподизовані за допомогою квадратичної синусової функції, зміщеною на 45°.

7.3.3. Віднесення сигналів ЯМР

Повні значення віднесенні протонних резонансів були отримані за допомогою застосування послідовної техніки віднесенні з використанням DQF COSY, TOCSY і NOESY спектрів методом, описаним в літературі (Wuthrich, NMR of Proteins and Nucleic Acids, 1986, John Wiley & Sons, New York, USA). Повторні хімічні зсуви були обчислені для HN і Ha протонів шляхом віднімання табличних значень випадкових кільцевих хімічних зсувів (Wishart and Sykes, 1994, method. Enz. 239: 363-392) з відповідних експериментальних значень.

7.3.4. Результати і обговорення

Загальні міркування. Амфipатичні спіральні пептиди мають тенденцію утворювати агрегати у водних розчинах при високих концентраціях, необхідних для проведення ЯМР спектроскопії, що викликає труднощі в отриманні спектра з високим дозволом. Наприклад, ЯМР спектр типового корового пептиду 146 (SEQ ID NO: 146) у воді являє собою дуже широку лінію. Тому не може бути отриманим дозвіл резонансу кожного амінокислот-

ного залишку. Додання TFE до зразку збільшує спектральний дозвіл. Відомо, що TFE сольобілізує пептиди і, крім того, стабілізує спіральну конформацію пептидів, що мають схильність приймати спіральну структуру. Факти, виявлені за допомогою ЯМР спектроскопії, продемонстровані за допомогою пептиду 146 (SEQ ID NO: 146), що є показовим прикладом. Для порівняння вивчали consensus Segrest 22-мір (SEQ ID NO: 75).

Повторні хімічні зсуви. Хімічні зсуви протонів в амінокислотах залежать як від типу амінокислотного залишку, так і від типу локальної повторної структури всередині пептиду або білку (Szlagyi, 1995, Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy 27: 325-443). Таким чином, виявлення регулярної повторної структури можливе шляхом порівняння експериментальних зсувів з табличними значеннями випадкових кільцевих конформацій.

Формування α -спіралей звичайно призводить до негативного зсуву у верхню область На резонансу. Виявлення зсуву у верхню область На резонансу декількох послідовних залишків вважається доказом спіральної структури. На повторні зсуви пептиду 146 (SEQ ID NO: 146) в 25% TFE при 295K вказує на значні негативні зсуви для залишків від 4 до 19 (Fig.8A), що підтверджує високу міру спіральності. Хімічні зсуви амідних воднів в амінокислотних залишках, розташованих в області α -спіралі, також зміщуються у верхню область по відношенню до хімічних зсувів, які спостерігаються випадковим образом вибраного кільця. Крім того, може спостерігатися періодичність NH-зсувів, що відображає періоди поворотів спіралі. Амплітуда зсувів, що варіює вздовж послідовності, пов'язана з амфipатичністю спіральних пептидів. Більш високий гідрофобний момент призводить до більш різко вираженої осциляції (Zhou et al., J.Am. Chem. Soc. 114: 4320-4326). Повторні NH зсуви в пептиді 146 (SEQ ID NO: 146) в 25% TFE при 295K вказують на те, що осциляційна поведінка узгодиться з аліфатичною природою спіралі (Fig.8B).

Заміна амінокислот призводить до більш вираженої періодичності вздовж повної послідовності (Fig.8B). Фігура чітко відображає більш яскраво виражену амфipатичну природу пептиду 146 (SEQ ID NO: 146) в порівнянні з consensus Segrest 22-мір (SEQ ID NO: 75). По Fig.8C можна судити про розподіл амінокислот на ідеалізованій α -спіралі, гідрофобні залишки якої екрановані, а гідрофільні залишки представлені як відкриті кола, відобразили графічно разом з повторними зсувами амідного протону пептиду 146 (SEQ ID NO: 146). Експериментальні точки з'єднали згладженою лінією для ясності. Предметом дискусії може бути карта ЯМР зсувів спіральної структури і існування 5-6 поворотів спіралі.

На повторні зсуви амідного протону впливають довжина водневого зв'язку карбонілу кисню на відстані 1 повороту від спіралі. Таким чином, періодичність значень хімічних зсувів, що спостерігаються відображає відмінність в довжинах водневих зв'язків. Ця відмінність пов'язана з повною викривленістю спіральної форми кістяка спіралі. Гідрофобні залишки розташовані на увігнутій стороні.

Повторні зсуви в пептиді 146 (SEQ ID NO: 146) вказують на зігнену α -спіральною конформацію.

8. Приклад: проба на активацію LCAT

Було проаналізовано здатність пептидів, синтезованих способом, описаним в розділі 6, активувати *in vitro* LCAT. У аналізі на LCAT субстратні везикули (малі ламелярні везикули або SUV), що складаються з яєчного фосфатиділхоліну (EPC) або 1-пальмітоїл-2-олеїл-фосфатиділхоліну (POPC) або радіоактивно міченого холестерину (POPC), заздалегідь інкубують з еквівалентною кількістю або пептиду, або ApoA-I (отриманого з людської плазми). Взаємодію ініціюють додаванням LCAT (очищеного з людської плазми). Нативний ApoA-I, який було використано як позитивний контроль, володів 100% активаційною активністю. "Специфічна активність" (тобто одиниці активності (активація LCAT)/ одиниці маси) пептидів може бути обчислена при концентрації пептидів, яка викликає максимум активації LCAT. Наприклад, можна випробувати серію концентрацій пептиду (тобто лімітуюче розведення) для визначення "специфічної активності" пептиду - концентрації, при якій досягається максимальна активація LCAT (тобто перетворення холестерину в ефір холестерину в процентах) за певний момент часу в пробі (наприклад, за 1 годину). На графіку, що являє собою залежність процентного перетворення холестерину, наприклад, за 1 годину, від концентрації пептиду, що використовується, специфічна ак-

тивність може бути обчислена як концентрація пептиду, відповідна плато на графічній кривій.

8.1. Отримання субстратних везикул

Везикули, що використовуються в аналізі LCAT (SUVs), перебувають з яєчного фосфатиділхоліну або 1-пальмітоїл-2-олеїл-фосфатиділхоліну (POPC) і холестерину з молярним відношенням 20:1. Для отримання запасного розчину везикул, достатнього для проведення 40 аналізів, розчиняють 7,7мг EPC (або 7,6мг POPC; 10мкмоль), 78мг (0,2мкмоль) 4^{14}C холестерину, 116мг холестерину (0,3мкмоль) в 5мл ксілолу і ліофілізують. Після цього додають 4мл буферу для проб до сухого порошку і проводять озвучення в атмосфері азоту при 4°C. Умови озвучення: Branson 250 ультразвукової випромінювач, 10мм наконечник (tip), 65мін.; буфер для проб: 10мМ Трис, 0,14М NaCl, 1мМ EDTA, pH7.4. Озвучену суміш центрифугують 6 разів (по 5 хвилин кожний) при 14000об./хв. (16000g) для видалення часток титану. Отриманий чистий розчин використовується для ферментативного аналізу.

8.2. Очищення LCAT

Для очищення LCAT оброблений декстраном сульфат/ Mg^{2+} людська плазма використовується для отримання сироватки, збідненої ліпопротеїнами (LPDS), які зазнають послідовної хроматографії на фенілсефарозі, афігель блакитний і конканавалін А сефарозі і анти-ApoA-I афіної хроматографії. Процес такого показового очищення підсумований в таблиці IX, див. нижче.

Таблиця IX

Очищення LCAT

Фракції	Загальний об'єм, (мл)	Загальні білки, (мг)	Загальна активність (нмол СЕ/мг/г)	Вихід, (%)	Очищення (кратність)
Плазма	550	44550	63706		
LPDS	500	31000	62620	98	1,4
Фенілсефароза	210	363	51909	82	100
Афігель блакитний	95	153	25092	39	115
ConA сефароза	43	36	11245	18	220
Анти-A-1-Афінність	120	3,5	5500	9	1109

8.2. Приготування LPDS

Для приготування LPDS, 500мл плазми додають до 50мл розчину декстрану сульфату (молекулярна маса=500000). Перемішують протягом 20 хвилин. Центрифугують 30хв. При 3000об./хв. (16000хг) при 4°C. Отриманий супернатант (LPDS) піддають подальшому очищенню (прим. 500мл).

8.2.2. Хроматографія на фенілсефарозі

Для фенілсефарозної хроматографії були використані наступні матеріали і умови:

тверда фаза: фенілсефароза з швидким потоком, високої міри чистоти, Pharmacia

колонка: XK26/40, висота гелю: 33см, V=175мл

швидкість потоку: 200мл/г

промивка: 200мл/г

елюювання: 80мл/ч (дистильована вода)

буфер: 10мМ Трис, 140мМ EDTA, pH7,4, 0,01% азид натрію.

Врівноважують колонку в тріс-буфері, додають 29г NaCl до 500мл LPDS і наносять на колонку. Промивають декількома об'ємами тріс-буферу доти, доки поглинання при довжині хвилі 280нм буде приблизно фоновим, потім починають елю-

цію дистильованою водою. Збирають фракції, що містять білки (V=180мл), і піддають подальшому очищенню з допомогою афігель блакитної хроматографії.

8.2.3. Афігель блакитна хроматографія

Отриманий після проведення хроматографії на фенілсефарозі пул піддають діалізу протягом ночі при 4°C проти 20мМ трис-HCl, pH7,4, 0,01% азид натрію. Об'єм пулу зменшують до 50-60мл шляхом ультрафільтрації (Amicon YM30) і наносять на колонку з афігель блакитним.

Тверда фаза: афігель блакитним, Biorad, 153-7301 колонки,

висота гелю: 13см; об'єм колонки:

приблизно 70мл.

Швидкості потоку: нанесення 15мл/г

промивки: 50мл/г.

Врівноважують колонку в тріс-буфері. Наносять на колонку пул, отриманий після очищення на фенілсефарозі. Починають паралельно зі збором фракцій. Промивають тріс-буфером. Фракції пулу (170мл) використовуються для подальшого очищення з допомогою ConA хроматографії.

8.2.4. ConA хроматографія

Був скорочений об'єм пулу, отриманого після очищення за допомогою афігель блакитної хроматографії, до 30-40мл шляхом ультрафільтрації (Amicon YM30) і проведений діаліз проти ConA стартового буферу (1мМ трис-HCl, pH7,4; 1мМ MgCl₂, 1мМ MnCl₂, 1мМ CaCl₂, 0,01% азід Na) протягом ночі при температурі 4°C.

Тверда фаза: ConA сефароза (Pharmacia)

колонка: XK26/20,

висота гелю: 14см (75мл)

швидкості потоку: нанесення: 40мл/г

промивки: (зі стартовим буфером):

90мл/ч елюювання: 50мл/ч, 0,2М

метил-α-D-маннозид в 1мМ трис, pH7,4.

Були зібрані білкові фракції (110мл) елюції манозиду і об'єм був скорочений до 44мл шляхом ультрафільтрації (YM30). Пул ConA був розділений на 2мл аліквоти, які зберігалися при -20°C.

8.2.5. Анти-АроА-I афінна хроматографія

Анти-АроА-I афінна хроматографія було виконано на Af-igel-Hz матеріалі (Biorad), до якого анти-АроА-I антитіла були приєднані ковалентно.

Колонка: XK16/20, V=16мл. Колонку було урівноважено PBS, pH7,4. Перед нанесенням на колонку було проведено діаліз 2мл ConA пулу протягом 2 годин проти PBS.

Швидкості потоку: нанесення: 15мл/ч; промивка (PBS): 40мл/ч.

Зібрані білкові фракції (V=14мл) були використані для аналізу LCAT. Колонку регенерували 0,1М цитратним буфером (pH4,5) для того, щоб елюювати пов'язані А-I (100мл) і відразу ж після цієї процедури зрівноважили знов PBS.

8.3. Результати

Результати аналізу активації LCAT представлені в таблиці X, infra.

Таблиця X

Активация LCAT, виявлена у типових корових пептидів

Пептид	Амінокислотна послідовність	Актив-ність (%) LCAT	Спіраль-ність (%) вільних пептидів	Спіраль-ність (%) mics	> Спіраль-ність (%) SUV	Спіраль-ність (%) пептидів в TFE
1	2	3	4	5	6	7
1 (SEQ ID NO: 1)	PVLDLFRELLNELLEZLKQKQK	120%	77	85	81	69
2 (SEQ ID NO: 2)	GVLDLFRELLNELLEALKQKQK	105%				
3 (SEQ ID NO: 3)	PVLDLFRELLNELLEWLKQKQK	98%	70	95	80	95
4 (SEQ ID NO: 4)	PVLDLFRELLNELLEALKQKQK	93%	80	95	97	94
5 (SEQ ID NO: 5)	pVLDLFRELLNELLEALKQKQK	90%				
6 (SEQ ID NO: 6)	PVLDLFRELLNEXLEALKQKQK	80%	57	93	70	99
7 (SEQ ID NO: 7)	PVLDLFKELLNELLEALKQKQK	83%	77	89	85	73
8 (SEQ ID NO: 8)	PVLDLFRELLNEGLEALKQKQK	83%	20	90	61	93
9 (SEQ ID NO: 9)	PVLDLFRELGNELLEALKQKQK	83%				
10 (SEQ ID NO: 10)	PVLDLFRELLNELLEAZKQKQK	79%	60	87	70	71
11 (SEQ ID NO: 11)	PVLDLFKELLQELLEALKQKQK	72%				
12 (SEQ ID NO: 12)	PVLDLFRELLNELLEAGKQKQK	70%				
13 (SEQ ID NO: 13)	GVLDLFRELLNEGLEALKQKQK	67%				
14 (SEQ ID NO: 14)	PVLDLFRELLNELLEALQOQLO	61%	70	96	80	
15 (SEQ ID NO: 15)	PVLDLFRELWNELLEALKQKQK	60%	55	60	64	68
16 (SEQ ID NO: 16)	PVLDLLRELLNELLEALKQKQK	59%				
17 (SEQ ID NO: 17)	PVLELFKELLQELLEALKQKQK	59%				
18 (SEQ ID NO: 18)	GVLDLFRELLNELLEALKQKQK	58%				
19 (SEQ ID NO: 19)	PVLDLFRELLNEGLEALKQKQK	58%				
20 (SEQ ID NO: 20)	PVLDLFRELLNELLEALKQKQK	57%				
21 (SEQ ID NO: 21)	PVLDLFRELLNELLEALKQKQK	57%				
22 (SEQ ID NO: 22)	PVLDLFRELLNELLEGLKQKQK	54%				
23 (SEQ ID NO: 23)	PLLELFKELLQELLEALKQKQK	54%				
24 (SEQ ID NO: 24)	PVLDLFRELLNELLEALQKQK	53%				
25 (SEQ ID NO: 25)	PVLDFFRELLNEXLEALKQKQK	51%	46	82		93
26 (SEQ ID NO: 26)	PVLDLFRELLNELLEALKQKQK	47%				
27 (SEQ ID NO: 27)	PVLDLFRELLNELZEALKQKQK	44%	72	92	82	81
28 (SEQ ID NO: 28)	PVLDLFRELLNELWEALKQKQK	40%	82	98	90	81
29 (SEQ ID NO: 29)	AVLDLFRELLNELLEALKQKQK	39%				
30 (SEQ ID NO: 30)	PVLDLFRELLNELLEALKQKQK»	38%	85	90	98	90
31 (SEQ ID NO: 31)	PVLDLFLELLNEXLEALKQKQK	34%	49	98		90
32 (SEQ ID NO: 32)	XVLDLFRELLNELLEALKQKQK	33%				
33 (SEQ ID NO: 33)	PVLDLFREKLNELLEALKQKQK	33%				
34 (SEQ ID NO: 34)	PVLDZFRELLNELLEALKQKQK	32%	58	67	68	62
35 (SEQ ID NO: 35)	PVLDWFRELLNELLEALKQKQK	31%	49 (SP)	59	61	
36 (SEQ ID NO: 36)	PLLELLKELLQELLEALKQKQK	31%	95	100		95
37 (SEQ ID NO: 37)	PVLDLFRELLNELLEALKQKQK	29%	65	75	76	73
38 (SEQ ID NO: 38)	PVLDLFRELLNEXLEAWKQKQK	29%	25	49	21	49
39 (SEQ ID NO: 39)	PVLDLFRELLLELLKALKKQKQK	25%	66	69	68	72
40 (SEQ ID NO: 40)	PVLDLFNELLRELLEALKQKQK	25%	66	84	79	77
41 (SEQ ID NO: 41)	PVLDLWRELLNEXLEALKQKQK	25%	53	73	85	69
42 (SEQ ID NO: 42)	PVLDREKLNEXWEALKQKQK	25%	15	74	27	76
43 (SEQ ID NO: 43)	PVLDREKLNEXLEALKQKQK	25%				
44 (SEQ ID NO: 44)	pvldfrecklnexlealkqkqk	25%	20	86		
45 (SEQ ID NO: 45)	PVLDREKLNEXLEALKQKQK	24%	24	84	25	86
46 (SEQ ID NO: 46)	PVLDLPREKLNEXLEALKQKQK	23%	30	86	58	85
47 (SEQ ID NO: 47)	-VLDLFRELLNEGLEALKQKQK	23%				

1	2	3	4	5	6	7	8
48	(SEQ ID NO: 48)	pVLDLFRELLNELLEALKQKQK	22%				
49	(SEQ ID NO: 49)	PVLDLFRNLLLEKLEALEQKQK	22%	57	65	52	57
50	(SEQ ID NO: 50)	PVLDLFRLLWEXLEALKQKQK	21%	68	84	89	76
51	(SEQ ID NO: 51)	PVLDLFWELLNEXLEALKQKQK	20%	63	82	81	73
52	(SEQ ID NO: 52)	PVWDFREKLNEXLEALKQKQK	20%	Sp	SP	SP	
53	(SEQ ID NO: 53)	WLDLFRLLNELLEALKQKQK	19%				
54	(SEQ ID NO: 54)	PVLDLFRLLNEWLEALKQKQK	19%	76	71	84	78
55	(SEQ ID NO: 55)	P~LFRLLNELLEALKQKQK	19%	38	72	78	75
56	(SEQ ID NO: 56)	PVLDLFRLLMELLEALKQKQK	18%				
57	(SEQ ID NO: 57)	PVLDLFRNLLLEELKALEQKQK	18%				
58	(SEQ ID NO: 58)	PVLDFPREKLMELEALKQKQK	18%				
59	(SEQ ID NO: 59)	LVLDFRELLMELLEALKQKQK	17%				
60	(SEQ ID NO: 60)	PVLDLFRLLMELLEALKQ~	16%	39	83	66	84
61	(SEQ ID NO: 61)	PVLDFRWKLMELEALKQKQK	16%				
62	(SEQ ID NO: 62)	PVLDEWREKLMELEALKQKQK	16%	15	85	43	
63	(SEQ ID NO: 63)	PVLDFFREKLMELEALKQKQK	16%				
64	(SEQ ID NO: 64)	PWLDFREKLMELEALKQKQK	15%				
65	(SEQ ID NO: 65)	-VLDFREKXMELEALKQKQK	15%				
66	(SEQ ID NO: 66)	PVLDLFRNLLLEELKALEQKQK	15%	64	82	66	70
67	(SEQ ID NO: 67)	-VLDFRELLMELLEALKQKQK	14%	81	90	84	94
68	(SEQ ID NO: 68)	PVLDFRELLKEXLEALKQKQK	14%				
69	(SEQ ID NO: 69)	PVLDFRKLMELEALKQKQK	13%				
70	(SEQ ID NO: 70)	PVLDEFRELLYEXLEALKQKQK	12%	27	78	33	66
71	(SEQ ID NO: 71)	PVLDFREKLMELEALKQKQK	11%				
72	(SEQ ID NO: 72)	PVLDLFRLLMEXLWALKQKQK	11%	SP	EP	SP	
73	(SEQ ID NO: 73)	PVLDFWEKLMELEALKQKQK	10%				
74	(SEQ ID NO: 74)	PVLDKFREKLMELEALKQKQK	10%				
75 ^u	(SEQ ID NO: 75)	PVLDFREKLNEELEALKQKQK	10%	18	28	23	55
76	(SEQ ID NO: 76)	PVLDFRELLFEXLEALKQKQK	9%	41	88		66
77	(SEQ ID NO: 77)	PVLDFREKLNXLEALKQKQK	9%				
78	(SEQ ID NO: 78)	PVLDFRDKLNEXLEALKQKQK					
79	(SEQ ID NO: 79)	PVLDFRELLNELLEALKQKQK	9%				
80	(SEQ ID NO: 80)	PVLDLFRLLNELLEALKQKQK	9%				
81	(SEQ ID NO: 81)	PVLDFREKLNXLEALKQKQK					
82	(SEQ ID NO: 82)	-LDFREKLNEXLEALKQKQK	8%				
83	(SEQ ID NO: 83)	PVLDFREKLNEXLEALWQKQK					
84	(SEQ ID NO: 84)	PVLDFREKLNELLEALKQKQK	7%				
85	(SEQ ID NO: 85)	P-LDLFRELLNELLEALKQKQK	7%	58	61	64	69
86	(SEQ ID NO: 86)	PVLELFRLLDELLNALQKQK	7%				
87	(SEQ ID NO: 87)	pllellkelqellealkqkik	7%	100	100		100
88	(SEQ ID NO: 88)	PVLDKFRELLNEXLEALKQKQK	7%				
89	(SEQ ID NO: 89)	PVLDFREKLNEXLWALKQKQK	6%				
90	(SEQ ID NO: 90)	--DEFREKLNEXLEALKQKQK	6%				
91	(SEQ ID NO: 91)	PVLDFRELLNEXLEALKQKQK	6%	43	100		100
92	(SEQ ID NO: 92)	PVLDFRELYNEXLEALKQKQK	5%				
93	(SEQ ID NO: 93)	PVLDFREKLNEXLALKQKQK	5%				
94 ^u	(SEQ ID NO: 94)	PVLDFREKLNEALEALKQKQK	5%	18	70	27	63
95	(SEQ ID NO: 95)	PVLDLFRLLNLXLEALKQKQK	5%		SP	SP	
96	(SEQ ID NO: 96)	PVLDLFRLLNEXLEALKQKQK	5%	52	85	63	81
97	(SEQ ID NO: 97)	PVLDLFRLLNELLE~~~~~	4%				
98	(SEQ ID NO: 98)	PVLDLFRLLNEELEALKQKQK	2%				
99	(SEQ ID NO: 99)	KLKQKLAELLENLLEFLDLVP	2%	72	88	80	80
100	(SEQ ID NO: 100)	PVLDLFRLLNELLEALKQKQK	2%	83	92		98
101	(SEQ ID NO: 101)	PVLDLFRLLNWXLEALKQKQK	2%		SP	SP	
102	(SEQ ID NO: 102)	PVLDLFRLLNLXLEALKQKQK	2%	SP			
103	(SEQ ID NO: 103)	PVLDFRELLNEELEALKQKQK	1%				
104	(SEQ ID NO: 104)	P~~~~LLNELLEALKQKQK	1%	21	49	29	55
105	(SEQ ID NO: 105)	PAADAFREAAEAAEAAKQKAK	1%	29	28	32	65
106	(SEQ ID NO: 106)	PVLDLFRKLNEELEALKQKQK	0%				
107	(SEQ ID NO: 107)	KIKQKLAELLENLLEFLDLVP	0%	SP	SP		77
108	(SEQ ID NO: 108)	PVLDLFRWLLNEXLEALKQKQK	0%	28	55		54
109 ^u	(SEQ ID NO: 109)	PVLDFREKLNERLEALKQKQK	0%	19	45	23	58
110	(SEQ ID NO: 110)	PVLDFREKLNEXXLEALKQKQK	0%				
111	(SEQ ID NO: 111)	PVLDFREKLWEXWLEALKQKQK	0%				
112	(SEQ ID NO: 112)	PVLDFREKLNEXSEALKQKQK	0%				
113	(SEQ ID NO: 113)	PVLDFREKLNEPLEALKQKQK	0%	6	22		
114	(SEQ ID NO: 114)	PVLDFREKLNEXMEALKQKQK	0%				
115	(SEQ ID NO: 115)	PKLDFREKLNEXLEALKQKQK	0%				
116	(SEQ ID NO: 116)	PHLDFREKLNEXLEALKQKQK	0%				
117	(SEQ ID NO: 117)	PELDFREKLNEXLEALKQKQK	0%				
118	(SEQ ID NO: 118)	PVLDFREKLNEXLEALEQKQK	0%				
119	(SEQ ID NO: 119)	PVLDFREKLNEELEAXKQKQK	0%				
120	(SEQ ID NO: 120)	PVLDFREKLNEELEXLKQKQK	про»				
121	(SEQ ID NO: 121)	PVLDFREKLNEELEALWQKQK	про»				
122	(SEQ ID NO: 122)	PVLDFREKLNEELEWLKQKQK	про»				
123	(SEQ ID NO: 123)	QVLDLFRLLNELLEALKQKQK					
124	(SEQ ID NO: 124)	PVLDLFOELLNELLEALQOLO					

1	2	3	4	5	6	7	8
125	(SEQ ID NO: 125)	NVLDLFRELLNELLEALKQKQK					
126	(SEQ ID NO: 126)	PVLDLFRELLNELGEALKQKQK					
127	(SEQ ID NO: 127)	PVLDLFRELLNELLELLKQKQK	47%				
128	(SEQ ID NO: 128)	PVLDLFRELLNELLEFLKQKQK					
129	(SEQ ID NO: 129)	PVLELFNDLLRELLEALQKKLK					
130	(SEQ ID NO: 130)	PVLELFNDLLRELLEALKQKQK					
131	(SEQ ID NO: 131)	PVLELFKELLNELLDALRQKQK					
132	(SEQ ID NO: 132)	PVLDLFRELLLENLEALQKKLK					
133	(SEQ ID NO: 133)	PVLELPERLLEDLLQALNKJCLK					
134	(SEQ ID NO: 134)	PVLELPERLLEDLLKALNQKQK					
135	(SEQ ID NO: 135)	DVLDLFRELLNELLEALKQKQK					
136	(SEQ ID NO: 136)	PALELFKDLLQELLEALKQKQK					
137	(SEQ ID NO: 137)	PVLDLFRELLNEGLEAZKQKQK					
138	(SEQ ID NO: 138)	PVLDLFRELLNEGLEWLKQKQK					
139	(SEQ ID NO: 139)	PVLDLFRELWNEGLEALQKQK					
140	(SEQ ID NO: 140)	PVLDLFRELLNEGLEALQOQO					
141	(SEQ ID NO: 141)	PVLDPFRELLNEGLEALKQKQK					
142	(SEQ ID NO: 142)	PVLELPRELLNEGLEALKQKQK					
143	(SEQ ID NO: 143)	PVLDLFRELLNEGLEALKQKQK*					
144	(SEQ ID NO: 144)	pVLELFENLLERLLDALQKKLK	111%	89	88		95
145	(SEQ ID NO: 145)	GVLELFENLLERLLDALQKKLK	100%	55	51		58
146	(SEQ ID NO: 146)	PVLELPENLLERLLDALQKKLK	86%	97	100	100	95
147	(SEQ ID NO: 147)	PVLELPENLLERLFDALQKKLK	76%				
148	(SEQ ID NO: 148)	PVLELFENLLERLGDALQKKLK	75%	10	76	23	80
149	(SEQ ID NO: 149)	PVLELFENLWERLLDALQKKLK	63%	28	54		47
150	(SEQ ID NO: 150)	PLLELFENLLERLLDALQKKLK	57%				
151	(SEQ ID NO: 151)	PVLELFENLGERLLDALQKKLK	55%				
152	(SEQ ID NO: 152)	PVFELFENLLERLLDALQKKLK	50%				
153	(SEQ ID NO: 153)	AVLELFENLLERLLDALQKKLK	49%				
154	(SEQ ID NO: 154)	PVLELFENLLERGLDALQKKLK	39%	13	76	25	80
155	(SEQ ID NO: 155)	PVLELPNLWERLLDALQKKLK	38%				
156	(SEQ ID NO: 156)	PVLELPNLLELLERLLDALQKKLK	35%				
157	(SEQ ID NO: 157)	PVLEFPENLLERLLDALQKKLK	30%				
158	(SEQ ID NO: 158)	PVLELPNLLELLERLLDWLQKKLK	30%				
159	(SEQ ID NO: 159)	PVLDLFENLLERLLDALQKKLK	28%				
160	(SEQ ID NO: 160)	PVLELFENLLERLLDWLQKKLK	28%	65	73	75	61
161	(SEQ ID NO: 161)	PVLELPENLLERLLEALQICKLK	27%				
162	(SEQ ID NO: 162)	PVLELFENWLERLLDALQKKLK	27%	68	83	81	
163	(SEQ ID NO: 163)	PVLELFENLLERLWDALQKKLK	26%	27	53		55
164	(SEQ ID NO: 164)	PVLELFENLLERLLDAWQKKLK	24%	37	66	51	61
165	(SEQ ID NO: 165)	PVLELFENLLERLLDLQKKLK	23%				
166	(SEQ ID NO: 166)	PVLELPNLLEKLLDALQKKLK	22%				
167	(SEQ ID NO: 167)	PVLELFENQLERLLDALQKKLK	18%				
168	(SEQ ID NO: 168)	PVLELFEQLLEKLLDALQKKLK	17%				
169	(SEQ ID NO: 169)	PVLELFENLLEKLLDALQKKLK	17%				
170	(SEQ ID NO: 170)	PVLELFENLLEOLLDALQOOL	17%				
171	(SEQ ID NO: 171)	PVLELFENLLEKLLDLLQKKLK	16%				
172	(SEQ ID NO: 172)	PVLELFNLLERLGDALQKKLK	16%				
173	(SEQ ID NO: 173)	PVLDLFDNLLDRLLDLLNKKLK	15%				
174	(SEQ ID NO: 174)	PVLELFENLLERLLDALQKKLK	13%				
175	(SEQ ID NO: 175)	PVLELPENLLERLLELLNKKLK	13%				
176	(SEQ ID NO: 176)	PVLELWENLLERLLDALQKKLK	11%				
177	(SEQ ID NO: 177)	GVLELFNLLELLERLLDALQKKLK	10%				
178	(SEQ ID NO: 178)	PVLELFDNLLKLEALQKKLR	9%				
179	(SEQ ID NO: 179)	PVLELFDNLLERLLDALQKKLK	10%				
180	(SEQ ID NO: 180)	PVLELFDNLLDKLLDALQKKLR	8%				
181	(SEQ ID NO: 181)	PVLELFENLLERWLDALQKKLK	8%				
182	(SEQ ID NO: 182)	PVLELFENLLEKLEALQKKLK	7%				
183	(SEQ ID NO: 183)	PLLELFENLLEKLLDALQKKLK	6%				
184	(SEQ ID NO: 184)	PVLELFNLLELLERLLDAWQKKLK	4%				
185	(SEQ ID NO: 185)	PVLELFENLLERLLDALQOOL	3%				
186	(SEQ ID NO: 186)	PVLELFEQLLERLLDALQKKLK					
187	(SEQ ID NO: 187)	PVLELFENLLERLLDALNKKLK					
188	(SEQ ID NO: 188)	PVLELFENLLDRLLDALQKKLK					
189	(SEQ ID NO: 189)	DVLELFENLLERLLDALQKKLK					
190	(SEQ ID NO: 190)	PVLEPWNLLDKLLDALQICICLR					
191	(SEQ ID NO: 191)	PVLDLLRELLELKQKQK*	100%				
192	(SEQ ID NO: 192)	PVLDLFKELLEELKQKQK*	100%	36			56
193	(SEQ ID NO: 193)	PVLDLFRELLEELKQKQK*	96%	34	88	87	87
194	(SEQ ID NO: 194)	PVLELFRELLEELKQKQK*	88%	38	93		93
195	(SEQ ID NO: 195)	PVLELFKELLEELKQKQK*	87%				
196	(SEQ ID NO: 196)	PVLDLFRELLEELKNKKQK*	81%				
197	(SEQ ID NO: 197)	PLLDLFRELLEELKQKQK*	81%	43	70		69
198	(SEQ ID NO: 198)	GVLDLFRELLEELKQKQK*	80%				
199	(SEQ ID NO: 199)	PVLDLFRELWEELKQKQK *	76%	35	77	80	79
200	(SEQ ID NO: 200)	NVLDLFRELLEELKQKQK*	75%				
201	(SEQ ID NO: 201)	PLLDLFKELLEELKQKQK*	74%				

1	2	3	4	5	6	7	8
202	(SEQ ID NO: 202)	PALELFKDLLEELRQKLK*	70%				
203	(SEQ ID NO: 203)	AVLDLPRELLEELKQKLK *	66%				
204	(SEQ ID NO: 204)	PVLDFFRELLEELKQKLK*	63%				
205	(SEQ ID NO: 205)	PVLDLFWLEELKQKLK*	60%				
206	(SEQ ID NO: 206)	PLLELLKELLEELKQKLK*	57%				
207	(SEQ ID NO: 207)	PVLELLKELLEELKQKLK*	50%				
208	(SEQ ID NO: 208)	PALELFKDLLEELRQRLK*	48%				
209	(SEQ ID NO: 209)	PVLDLFWLEELKQKLK	47%	54	71	67	62
210	(SEQ ID NO: 210)	PVLDLFWLEELKQKLK	46%	20	63	37	53
211	(SEQ ID NO: 211)	PVLDLFWLEELKQKLK *	45%				
212	(SEQ ID NO: 212)	PVLDLFWLEELKQKLK *	43%				
213	(SEQ ID NO: 213)	PALELFKDLLEELRQRLK*	42%				
214	(SEQ ID NO: 214)	PVLDLFWLEELKQKLK*	39%				
215	(SEQ ID NO: 215)	PVLDLFWLEELKQKLK*	38%	28	63	53	68
216	(SEQ ID NO: 216)	PVLELFKELLEELKQKLK	35%				
217	(SEQ ID NO: 217)	PVLDLFWLEELKQKLK	30%	52	78	76	70
218	(SEQ ID NO: 218)	PVLDLFWLEELKQKLK*	29%				
219	(SEQ ID NO: 219)	PVLDLFWLEELKQKLK	24%				
220	(SEQ ID NO: 220)	PVLDLFWLEELKQKLK J	22% 1	27	64	54	64
221	(SEQ ID NO: 221)	DVLDLFWLEELKQKLK*	12%				
222	(SEQ ID NO: 222)	PVLDLFWLEELKQKLK	8%				
223	(SEQ ID NO: 223)	PVLDLFWLEELKQKLK	8%	21	56	23	51
224	(SEQ ID NO: 224)	PVLDLFWLEELKQKLK	8%				
225	(SEQ ID NO: 225)	PVLDLFWLEELKQKLK	1%				
226	(SEQ ID NO: 226)	PVLDLFWLEELKQKLK	1%				
227	(SEQ ID NO: 227)	PVLDLFWLEELKQKLK*	0%				
228	(SEQ ID NO: 228)	PVLDLFWLEELKQKLK*	0%				
229	(SEQ ID NO: 229)	PVLDLFWLEELKQKLK*	0%				
230	(SEQ ID NO: 230)	PVLELFKELLEELKQKLK					
231	(SEQ ID NO: 231)	PVLDLFWLEELKQKLK					
232	(SEQ ID NO: 232)	PLLELFKELLEELKQKLK*					
237 ¹	(SEQ ID NO: 237)	LDDLLQKWAEAFNQLLKK	11%	30	66	45	-
238 ²	(SEQ ID NO: 238)	EWLKAFYKVKLEKLKELF*	19%	49	72	60	58
239 ³	(SEQ ID NO: 239)	EWLEAFYKVKLEKLKELF*	11%	44	49		SP
240	(SEQ ID NO: 240) -	DWLKAFYDKVAEKLKEAF*	10%	16	68	59	57
241	(SEQ ID NO: 241)	DWPKAFYDKVFEKFEFF	8%				
242 ⁴	(SEQ ID NO: 242)	GKKFLGSIWKFIKAFVG	7%				
243	(SEQ ID NO: 243)	DWFKAFYDKVAEKLKEAF	5%	10	64	50	
244 ⁵	(SEQ ID NO: 244)	DWLKAFYDKVAEKLKEAF	5%	9	40	13	48
245	(SEQ ID NO: 245)	DWLKAFYDKVPEKPEFF	4%	38	77	70	sp
246 ⁶	(SEQ ID NO: 246)	EWLEAFYKVKLEKLKELF	4%	18	44	47	
247	(SEQ ID NO: 247)	DWFKAFYDKVPEKFEFF	3%				
248 ¹⁰	(SEQ ID NO: 248)	EWLKAFYKVKLEKLKELF	3%	18	45	13	
249 ¹¹	(SEQ ID NO: 249)	EWLKAEYKVEEKLKELF*					
250 ¹²	(SEQ ID NO: 250)	EWLKAEYKVKLEKLKELF*					
251 ¹³	(SEQ ID NO: 251)	EWLKAFYKVKLEKLKELF*					
252	(SEQ ID NO: 252)	PVLDLFWLEELKQKLK*					
253	(SEQ ID NO: 253)	PVLDLFWLEELKQKLK*					
254	(SEQ ID NO: 254)	PVLDLFWLEELKQKLK*					
255	(SEQ ID NO: 255)	PVLDLFWLEELKQKLK*					
256	(SEQ ID NO: 256)	PVLDLFWLEELKQKLK*					
257	(SEQ ID NO: 257)	PVLDLFWLEELKQKLK*					
258	(SEQ ID NO: 258)	PVLDLFWLEELKQKLK*					

¹ Узгоджений 22-мірний пептид Серпестра (Anantharamaiah et al., 1990, Arteriosclerosis 10(1):)(95-105).

² [A13]- узгоджений 22-мірний пептид (Anantharamaiah et al., 1990, Arteriosclerosis 10(1):)(95-105).

³ [R13] - узгоджений 22-мірний пептид (Anantharamaiah et al., 1990, Arteriosclerosis 10(1):)(95-105).

⁴ Пептид ID-3 (Labeur et al., 1997, Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 17(3):)(580-588).

⁵ Пептид AC-18AMOD-C(0) NH₂ (Epand et al., 1987, J. Biol. Chem. 262 (19) «. 9389-9396).

⁶ Пептид AC-18AM4-3(0)NH₂ (Brasseur, 1993, Biochem. Biophys. Acta 1170:1-7).

⁷ Пептид 18L (Segrest et al., 1990, Proteins: Structure, Function and Genetics 8:103-117).

⁸ Пептид 18A (Anantharamaiah et al., 1985, J.Biol. Chem. 260(18):10248-10255).

⁹ Пептид 18DM4 (Rosseneu et al., W093/25581; Corijn et al., 1993, Biochim. Biophys. Acta 1170: 8-16).

¹⁰ Пептид [Glu¹⁸, Leu^{5,11,17} A (Epand et al., 1987, J.Biol. Chem. 262 (19): 9389-9396).

¹¹ Ac-18AM3-C(0)NH₂ (Rosseneu et al., W093/25581).

¹² Ac-18AM2- 3(0)NH₂ (Rosseneu et al., W093/25581).

¹³ Ac-18AM1-C(0)NH₂ (Rosseneu et al., W093/25581).

У таблиці X прийнято наступну систему позначень:

* - пептиди, ацетильовані на N-кінці і амідовані на C-кінці;

¹ - пептиди, дансильовані на N-кінці;

sp - пептиди, у яких виявилися труднощі при розчиненні в експериментальних умовах;

X - Aib;

Z - Nal;

O - Orn;

He (%) - спіральність в процентах;

Mes - міцели;

-- викреслені амінокислоти.

9. Приклад: фармакокінетика ApoA-I агоністів

Наступні експерименти можуть бути використані для того, щоб продемонструвати, що ApoA-I агоністи стабільні при циркуляції і пов'язані з HDL компонентами плазми.

9.1. Синтез радіоактивних пептидів

Радіоактивно-мічені пептиди синтезують шляхом приєднання ^{14}C - міченої амінокислоти як N-кінцевої амінокислоти. Синтез проводять згідно Lapatsanis, Synthesis, 1983, 671-173. Коротко, 250мкл немічених N-кінцевих амінокислоти розчиняють в 225мкл 9% розчину Na_2CO_3 і додають до розчину (9% Na_2CO_3) 9,25 MBq (250μM) ^{14}C - міченої N-кінцевої амінокислоти. Рідину охолоджують до 0°C, змішують з 600мкл (202мг) 9-флуоренілметил-М-сукцинімідкарбонат (Fmoc-Osu) в 0,75мл DMF і струшують при кімнатній температурі в протягом 4г. Далі суміш екстрагують діетиленгліколом (2-6мл) і хлороформом (1X5мл), водну фазу, що залишилася підкисляють 30% HCl і екстрагують хлороформом (96мл). Органічну фазу висушують за допомогою Na_2SO_4 , фільтрують і скорочують об'єм в потоку азоту до 5мл. Міра чистоти оцінюється за допомогою ТСХ ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$, 9:1:0,1 v/v/v, стаціонарна фаза RPTLC сілікагель 60, Merck, Germany).

Розчин хлороформу, що містить ^{14}C -мічену Fmoc амінокислоту, використовується безпосередньо для пептидного синтезу. Пептидна смола, що містить амінокислоти 2-22, синтезується автоматично, як описано в розділі 6. Послідовність пептиду визначена за допомогою деградації Едмана. Скріплення виконувалося способом, описаним в розділі 6.1.

9.2. Фармакокінетика у мишей

У кожному експерименті 2,5мг/кг радіоактивно-міченого пептиду вводили внутрішньочеревно мишам, які або отримували нормальний корм для мишей або атерогену діету, модифіковану Thomas-Harcroft (яка призводила до збільшення рівнів VLDL і IDL холестерину). Зразки крові брали в кратні часові інтервали для оцінки радіоактивності в плазмі.

9.3. Стабільність в людській сироватці

Стабільність ApoA-I агоністів даного винаходу в людській сироватці показана методом, описаним нижче.

9.3.1. Експериментальні методи

100мкг ^{14}C -міченого пептиду (приготованого за методом, описаним в розділі 9.1), змішують з 2 мл свіжої людської плазми (при 37°C) і звільняють від ліпідів або негайно (контрольний зразок), або через 8 днів інкубації при 37°C (зразок, що тестується). Звільнення від ліпідів проводили шляхом екстракції ліпідів рівним об'ємом 2:1 (об./об.) хлороформ/метанол.

Зразки наносять в зверненій фазі на C18 BEHX колонку і проводять елюцію в лінійному градієнті (25-58% протягом 33хв.) ацетонітрилу (утримуючого 0,1% TFA). За профілем елюції слідують поглинання (220нм) і радіоактивність.

Формування пре-β-подібних часток

Здатність ApoA-I агоністів даного винаходу формувати пре-β-подібні частки доведена способом, описаним нижче.

9.4.1. Експериментальний метод

Людські HDL виділяють ультрацентрифугуванням в градієнті щільності KBr при щільності $d=1,21\text{г/мл}$ для отримання верхньої фракції, далі проводять гель фільтраційну хроматографію на Superose 6 для відділення HDL від інших ліпопротеїнів. Виділені HDL доведені до остаточної концентрації 1,0мг/мл фізіологічним розчином, виходячи із вмісту білків, що визначається за допомогою білкового аналізу Bradford. Брали 300мкл аліквоти з ізольованого препарату HDL і інкубували зі 100мкл ^{14}C -міченого пептиду протягом 2 годин при 37°C. Були проаналізовані 5 окремих інкубацій, включаючи контроль, що містить 100μл фізіологічного розчину, і 4 розведені ^{14}C -міченого пептиду: (i) 0,20мкг/мкл пептид:HDL, відношення=1:15; (ii) 0,30мкг/мкл пептид:HDL, відношення=1:10; (iii) 0,60мкг/мкл пептид:HDL, відношення=1:5; і (iv) 1,00мкг/мкл пептид:HDL, відношення=1:3. Після двох часів інкубації 200мкл аліквоти із зразка (загальний об'єм=400мкл) наноситься на Superose 6 гель-фільтраційну колонку для розділення ліпопротеїнів і аналізу, а 100мкл використовується для визначення загальної радіоактивності, що наноситься на колонку.

9.5. Скріплення ApoA-I агоністів з людськими ліпопротеїнами

9.5.1. Експериментальні методи

Визначена здатність ApoA-I агоністів даного винаходу зв'язуватися з людськими ліпопротеїновими фракціями шляхом інкубації ^{14}C -мічених пептидів з кожним класом ліпопротеїнів (HDL, LDL і VLDL) і сумішшю різних класів.

HDL, LDL і VLDL виділяють шляхом ультрацентрифугування в градієнті щільності KBr при $d=1,21\text{г/мл}$ і очищають за допомогою FPLC на Superose 6B колонці (колонці виняткового розміру) (хроматографію проводять з швидкістю 0,7мл/хв., 10мМ тріс (pH8), 115мМ NaCl, 2мМ EDTA і 0,01% NaN_3). ^{14}C -мічений пептид інкубують з HDL, LDL і VLDL при відношенні пептиди/фосфоліпіди=1/5 (вагове відношення) протягом 2 годин при 37°C. Необхідну кількість ліпопротеїнів (об'єми, необхідні для отримання 1000мкг) змішують з 0,2мл білкового запасного розчину (1мг/мл) і розчин доводять до 2,2мл з використанням 0,9% NaCl.

Після інкубації протягом 2 годин при 37°C беруть аліквоту для підрахунку рідинної сцинтиляції, щоб визначити загальну радіоактивність, щільність суміші, що інкубується, що залишилася доводять до 1,21г/мл за допомогою KBr і зразки центрифугують при 100000об./хв. (30000g) протягом 24 годин при 4°C в TLA 100.3 роторі з використанням настільної ультрацентрифуги Beckman. Отриманий супернатант фракціонують шляхом видалення 0,3мл аліквоти з поверхні кожної проби, в загальній кількості з 5 фракцій, і 0,05мл кожної фракції використовують для підрахунку рідинної сцинтиляції. Дві верхні фракції містять інші фракції (3-5), що знаходяться на поверхні ліпопротеїни, відповідають відношенню білки/ пептиди в розчині.

9.6. ApoA-I агоністи даного винаходу селективно зв'язують HDL ліпіди в людській плазмі.

9.6.1. Експериментальний метод

Для того, щоб продемонструвати, що ApoA-I агоністи селективно зв'язують HDL білки в людській плазмі, 2мл людської плазми інкубують з 20,

40, 60, 80 і 100мкг ^{14}C -міченого пептиду протягом 2 годин при 37°C. Ліпопротеїни розділяють шляхом доведення щільності до 1,21г/мл і центрифугування в TLA 100.3 роторі при 100000об./хв. (300000g) протягом 36 годин при 4°C. Для аналізу беруть верхні 900мкл (фракції за 300мкл). 50мкл з кожної 300мкл фракції використовують для визначення радіоактивності, 200мкл кожної фракції аналізують за допомогою FPLC (комбінована колонка Superose 6/Superose 12).

10. Приклад: АроА-I агоністи сприяють виходу холестерину

Для того, щоб продемонструвати, що АроА-I агоністи сприяють виходу холестерину, клітини гепатоми Ger G2 переносять на 6-ямковий культуральний посуд і вирощують до злиття. Клітини мітять ^3H -холестерином, для чого висушують холестерин, потім додають 1% бичачий сироваточний альбумін (BSA) в фосфатному буфері (PBS) проводять озвучення розчину, додають 0,2мл цього міченого розчину і 1,8мл ростової середовища до кліток так, щоб кожна ямка містила 2мкCi радіоактивності. Клітини інкубують протягом 24 годин з міченою середовищем.

Комплекси пептиди (або протеїни):DMPC готують у відношенні 1:2 пептиди (або протеїни):DMPC (w:w). Для отримання комплексів пептиди або нативні людські АроА-I білки додають до DMPC розчину в PBS і інкубують при кімнатній температурі протягом ночі, за цей час розчин стає прозорим. Концентрація пептидів або білків в остаточному розчині приблизно становить 1мг/мл.

Мічену середовище видаляють з клітин і клітини промивають PBS перед доданням комплексів. 1,6мл ростової середовища додають до кожної ямки, потім комплекс пептид (білок): DMPC і кількість PBS, необхідну для доведення остаточного об'єму до 2мл на ямку. Остаточні концентрації пептиду або АроА-I складають біля 1; 2,5; 5; 7,5; і 25мкг/мл середовища. Після 24 годин інкубації при 37°C середовище видаляють і клітини промивають 2мл 1% BSA/PBS, а потім 2 рази промивають 2мл PBS. Кількість ^3H -холестерину, що з'явився в середовищі, визначають за допомогою підрахунку рідинної сцинтиляції.

11. Приклад: Використання АроА-I агоністів в модельних системах на тваринах

Ефективність АроА-I агоністів даного винаходу було показано на кролях. Отримані результати свідчать про те, що введення АроА-I агоністів збільшує концентрацію HDL-подібних часток в сироватці.

11.1. Приготування комплексів фосфоліпід/пептид

За допомогою методу холатного діалізу були отримані малі дискоїдальні частки, що складаються з фосфоліпиду (DPPC) і пептиду 146 (SEQ ID NO: 146). Фосфоліпіди були розчинені в хлороформі і висушені під струменем азоту. Пептиди були розчинені в буфері в концентрації 1-2мг/мл. Ліпідну плівку було повторно розчинено в буфері, що містить холат (43°C) і розчин пептидів був доданий у відношенні 3-1 фосфоліпід/пептид. Суміш інкубували протягом ночі при 43°C, потім діалізували при

43°C (24г.), при кімнатній температурі (24г.) і 4°C (24г.), тричі міняючи буфер (великий об'єм) при кожній температурі. Комплекси були стерилізовані (0,22μ) для ін'єкцій і зберігання при 4°C.

11.2. Виділення і характеристика часток пептид/фосфоліпід

Частки були розділені на гельфільтраційній колонці (Superose 6 HR). Шляхом вимірювання концентрації фосфоліпідів в кожній фракції було знайдено розташування піку, що містить частки. Виходячи з об'єму елюції був визначений радіус Стокса. Концентрація пептидів в комплексі була визначена шляхом визначення змісту фенілаланіну (за допомогою ВЕЖХ) після 16г кислотного гідролізу.

11.3. Ін'єкції кролям

Комплекс фосфоліпід/пептид (в дозі 8мг/кг ваги тіла пептиду 146 (SEQ ID NO: 146) або 18мг/кг ваги тіла АроА-I, вираженого як зміст пептиду або білку) був введений внутрішньовенно чоловічим особням новозеландських білих кролів (2,5-3кг) у вигляді одиначної ін'єкції, в об'ємі, що не перевищує 10-15мл. Перед проведенням маніпуляцій тварини були слабо пристані. Зразки крові (зібрані на EDTA) були взяті перед ін'єкцією, через 5, 15, 30, 60, 240 і 1440 хвилин після ін'єкції. Для кожної проби було визначено гематокрит (Het). Зразки розділили на аліквоти і зберігали при -20°C перед проведенням аналізів.

11.4. Аналізи кролячої сироватки

Ліпіди плазми. Рівні загального холестерину плазми, тригліцеридів плазми і фосфоліпідів плазми були визначені ферментативно за використанням комерційних проб, що є в розпорядженні згідно з протоколами виробника (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany and Biomerieux, 69280, Marcy-Fetoile, France).

Профілі ліпопротеїнів. Профілі з фракцій ліпопротеїнів плазми, отриманих після розділення плазми на її ліпопротеїнові фракції, були визначені шляхом обертання в градієнті щільності сахарози. Були зібрані фракції і в кожній індивідуальній фракції були виміряні ферментативно зміст фосфоліпідів і холестерину.

11.5. Результати

На Фіг.9 показано профіль ліпопротеїнів у кролів після ін'єкції 8мг/кг пептиду 146 (SEQ ID NO: 146) (у вигляді комплексів пептид/DPPC) як функція часу. Значне збільшення рівня холестерину в HDL фракціях холестерину (фракції >1,06мг/мл) стає очевидним на 5хв. після ін'єкції і триває приблизно протягом 24 годин.

Рівні холестерину в комбінованих HDL фракціях, отриманих шляхом ультрацентрифугування в градієнті щільності, представлено в таблиці XI, див. нижче. Найбільше збільшення рівня HDL холестерину (90%) відбувається через 240 хвилин після введення. Через 24г після введення збільшення рівня становило все ще 71,2%.

Отримані дані вказують на те, що введення комплексів пептид/DPPC (8мг/кг) індукує швидку і ефективну мобілізацію периферичного холестерину.

Таблиця XI

Рівні HDL холестерину у кролів
після введення 8мг/кг пептиду 146
(SEQ ID NO: 146) або 10мг/кг нативного ApoA-I

Час (хв.)	Збільшення рівня HDL холестерину (%) нативний ApoA-I	Збільшення рівня HDL холестерину (%) Пептид 146
5	19,3	31,3
15	16	60,4
60	15,8	42,9
240	-24,1	90,2
1440	*	71,2

Тварина загинула до даного моменту часу
12. Приклад: приготування комплексів пептид-ліпід за допомогою колюфілізаційного підходу

Для приготування комплексів пептид-ліпід був використаний наступний протокол.

Один мг пептиду 149 (PVLELFENLWERLLDALQKCLK; SEQ ID NO: 149) був розчинений в 250мкл БЕЖХ сорту метанолу (Perkin Elmer) в 1мл чистій скляній ампулі з кришкою (Waters #WAT025054). Для поліпшення розчинення пептиду робили випадкові струшування протягом 10 хвилин при кімнатній температурі. До цієї суміші було додано аліквоту, що містить 3мг дипальмітоїл-фосфатиділхоліну (DPPC; Avanti Polar Lipids, 99% чистоти, product #850355) з 100мг/мл запасного розчину в метанолі. Об'єм суміші було доведено до 400мкл шляхом додавання метанолу і суміш струшували з перервами протягом 10 секунд. У пробірку було додано 200мкл ксилолу (Sigma-Aldrich, 99% чистоти, БЕЖХ сорт) і пробірку струшували протягом 10 секунд. Два маленьких отвори було пробито на вершині пробірки 20-каліброву голкою шприца, пробірку було заморожена в рідкому азоті і ліофілізовано у вакуумі протягом ночі. 200мкл 0,9% розчину NaCl було додано в пробірку. Пробірку струшували протягом 20 секунд. До цього моменту розчин в пробірці зовні нагадував молоко. Потім пробірку інкубували на водяній бані протягом 30хв. при 41°C. Розчин став прозорим (тобто зовні став схожий на воду) через декілька хвилин інкубації при 41°C.

12.1. Характеристика комплексів за допомогою гель-фільтраційної хроматографії на Superose 6

Комплекси пептид-фосфоліпід, що містять пептид 149 (SEQ ID NO: 149), були приготувані шляхом колюфілізації за методом, описаним вище. Препарат містив 1мг пептиду і 3мг DPPC за вазі. Після перетворення комплексів в 200мкл 0,9% NaCl, 20мкл (утримуючих 100мкл пептиду 149) комплексів були нанесені на Pharmacia Superose 6 колонку з використанням 0,9% NaCl як водна фаза при швидкості 0,5мл/хв. Хроматографія контролювалася за поглинанням і розсіюванням світла при довжині хвилі 280нм. Був зібраний 1 мл фракцій. Аліквоти, що містять 20мкл фракцій, були досліджені на вміст фосфоліпідів з використанням bioMerieux Phospholipid-des Enzymatique PAP 150 набору (#61491) згідно з інструкціями, наданими виробником. Переважача більшість фосфоліпідів і поглинання в ультрафіолеті були отримані в декількох фракціях з піком приблизно на 15,8мл. Цей

об'єм елюції відповідає діаметру Стокса, рівному 87 ангстрем.

Для порівняння, роздільна хроматограма 20мкл людського HDLz була записана за тих же умов і використовували ту ж колонку, що і для комплексів пептиду 149. HDL₂ був приготований таким чином: 300мл замороженої людської плазми (Mannheim Blutspendenzentrale #1185190) розморозили, довели її щільність до 1,25 за допомогою твердого бромиду калію і центрифугували 45 годин при 40000об./хв., використовуючи Ti45 ротор (Beckman) при 20°C. Зібраний плаваючий шар, провели діаліз проти дистильованої води, довели щільність до 1,07 за допомогою твердого бромиду калію і центрифугували як описано раніше протягом 70 годин. Зібрали шар на дні (на рівні 1см над дном пробірки), довели концентрацію азиду натрію до 0,01% і зберігали при 4°C протягом 4 днів до проведення хроматографії. Елюат з колонки контролювали за поглинанням і розсіюванням світла при довжині хвилі 254нм. Серія білків з відомою молекулярною масою і діаметром Стокса була використана як стандарт для того, щоб відкалібрувати колонку для обчислення діаметра Стокса часток (Pharmacia Gel filtration Calibration Kit Instruction Manual, Pharmacia Laboratory Separation, Piscataway, NJ, revised April, 1985). HDL₂, елююваному із збереженням об'єму 14,8мл, відповідає діаметр Стокса 108нм.

13. Приклад: приготування антитіл

Для отримання антитіл до ApoA-I агоністів даного винаходу, отримують кон'югат пептиду з keyhole limpet гемоціанином (KLH; 1мг пептиду до 1мл KLH). KLH кон'югат (LMG) суспендують в повному ад'юванті Фрейнда, вводять мишам в нульовий момент часу і підвищують з 0,25мг KLH кон'югату на 4 тижні і потім на 5 тижні. Кров перед експериментом і на шостий тиждень після експерименту було протестовано на титр антитіл проти справжнього антигену за допомогою ELISA.

Кров було зібрано від кожного з двох кролів. Антитіла, направлені виключно проти пептидних антигенів, були виділені наступним чином:

1. Вільний пептид приєднують до активованої ціаном-бромідом Sepharose 4B (Pharmacia) згідно з протоколом виробника.

2. Антисироватку заздалегідь адсорбують на колонці пептидів, що не відносяться до справи або на колонці людських або мишачих сироваточних білків, що до справи не стосується.

3. Заздалегідь адсорбована антисироватка проходить через відповідну пептидну колонку (див. точку 1).

4. Колонку промивають 0,1М боратним буфером (pH8,2) і пов'язані антитіла елюють з використанням низького градієнта pH з кроком від pH4,0 до pH3,0 до pH2,0 (0,1М гліциновий буфер) і остаточно з 0,1М HCl.

5. Елюований матеріал нейтралізують в надлишку боратної солі, концентрують за допомогою ультрацентрифугування (Amicon, YM30) і діалізують проти боратної солі.

6. Визначають концентрацію білка за поглинанням при 280нм.

Отримані антитіла тестують на видову специфічність, використовуючи очищений людський АроА-I в прямому імуноферментному аналізі. Винахід не варто обмежувати сферою описаних специфічних втілень, які розглядаються як одиничні ілюстрації індивідуальних аспектів даного винаходу, функціонально еквівалентні методи і компоненти знаходяться в межах сфери даного винаходу. Насправді різні модифікації даного винаходу в доповнення до показаних і описаних тут стануть очевидними для кваліфікованих фахівців в даній області з попередніх описів і супутніх креслень. Такі модифікації включені в об'єм прикладеної формули винаходу.

Всі посилання, процитовані тут, об'єднані тут як довідки для будь-яких цілей.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

(1) Загальна інформація

(i) Заявник: Dasseux, Jean-Louis Sekul, Renate Buttner, Klaus Cornut, Isabelle Metz, Gunther

(ii) Назва винаходу: Агоністи аполіпропротеїну А-I і їх використання в лікуванні діспілідемічних порушень,

(iii) Кількість послідовностей: 254

(iv) Адреса для кореспонденції:

(A) Адреса: Pennie & Edmonds LLP

(B) Вулиця: 1155 Avenue of the Americas

(C) Місто: New York

(D) Штат: NY (E) Держава: USA

(F) Індекс: 10036-2811

(v) Програмне забезпечення:

(A) Тип носія: дискета

(B) Комп'ютер: IBM сумісний

(C) Оперативна система: DOS

(D) Системне забезпечення: FastSEQ

Version 2.0

(vi) Дані за даною заявкою:

(A) Номер заявки: PCT/US98/20326

(B) Дата подачі: 28 вересня 1998 року

(C) Класифікація:

(vii) Дані про пріоритетну заявку:

(A) Номер заявки: 08/940,096

(B) Дата подачі: 29 вересня 1997 року

(viii) Інформація про повіреного:

(A) Ім'я: Coruzzi, Laura A

(B) Реєстраційний номер: 30,742

(C) Номер посилання справи: 9196-0005-228

(ix) Інформація для телекомунікації:

(A) Телефон: 650-493-4935

(B) Телефакс: 650-493-5556

(C) Телекс: 66141 PENNIE

(2) Інформація для SEQ ID NO:1:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 16

(D) Інша інформація: Хаа= Нафтилаланін

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:1:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Leu Leu Glu
1 5 10 15

Xaa Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:2:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 23 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:2:

Gly Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Leu Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:3:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:3:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Leu Leu Glu
1 5 10 15

Trp Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:4:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:4:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Leu Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:5:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 23 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1

(D) Інша інформація: Хаа==D-Pro

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:5:

Xaa Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Leu Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:6:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 13

(D) Інша інформація: Хаа=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:6:



(2) Інформація для SEQ ID NO:7:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:7:



(2) Інформація для SEQ ID NO:8:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:8:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Gly Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:9:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:9:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Gly Asn Glu Leu Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:10:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 17

(D) Інша інформація: Xaa=Нафтилаланін

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:10:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Leu Leu Glu
1 5 10 15

Ala Xaa Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:11:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:11:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Lys Glu Leu Leu Gln Glu Leu Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:12:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: одна

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:12:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Leu Leu Glu
1 5 10 15

Ala Gly Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:13:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:13:

Gly Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Gly Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:14:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 18

(D) Інша інформація: Xaa=Orn

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 20

(D) Інша інформація: Xaa=Orn

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 22

(D) Інша інформація: Xaa=Orn

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:14:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Leu Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Xaa Gln Xaa Leu Xaa

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:15:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:15:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Trp Asn Glu Leu Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:16:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:16:

Pro Val Leu Asp Leu Leu Arg Glu Leu Leu Asn Glu Leu Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:17:

91

- (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:17:

Pro Val Leu Glu Leu Phe Lys Glu Leu Leu Gln Glu Leu Leu Glu
 1 5 10 15
 Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:18:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:18:

Gly Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Leu Leu Glu
 1 5 10 15
 Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:19:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 1
 (D) Інша інформація: Xaa=D-Pro
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:19:

Xaa Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Gly Leu Glu
 1 5 10 15
 Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:20:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:20:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Gly Leu Asn Glu Leu Leu Glu
 1 5 10 15
 Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:21:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 1
 (D) Інша інформація: Xaa=D-Pro
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:21:

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

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:22:

71552

92

- (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:22:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Leu Leu Glu
 1 5 10 15
 Gly Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:23:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:23:

Pro Leu Leu Glu Leu Phe Lys Glu Leu Leu Gln Glu Leu Leu Glu
 1 5 10 15
 Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:24:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:24:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Leu Leu Glu
 1 5 10 15
 Ala Leu Gln Lys Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:25:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (11) тип молекули: немає
 (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 13
 (D) Інша інформація: Xaa=Aib
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:25:

Pro Val Leu Asp Phe Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Xaa Leu Glu
 1 5 10 15
 Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:26:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:26:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Leu Leu Glu
 1 5 10 15
 Leu Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:27:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає

93

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 14

(D) Інша інформація: Хаа=Нафтилаланін

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:27:

Pro	Val	Leu	Asp	Leu	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Asn	Glu	Leu	Xaa	Glu
1				5						10				15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:28:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:28:

Pro	Val	Leu	Asp	Leu	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Asn	Glu	Leu	Trp	Glu
1				5						10				15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:29:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:29:

Ala	Val	Leu	Asp	Leu	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Asn	Glu	Leu	Leu	Glu
1				5						10				15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:30:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1...22

(D) Інша інформація: Пептид, дансильований

по N-кінцю

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:30:

Pro	Val	Leu	Asp	Leu	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Asn	Glu	Leu	Leu	Glu
1				5						10				15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:31:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 13

(D) Інша інформація: Хаа=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:31:

Pro	Val	Leu	Asp	Leu	Phe	Leu	Glu	Leu	Leu	Asn	Glu	Xaa	Leu	Glu
1				5						10				15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:32:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

71552

94

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1

(D) Інша інформація: Хаа=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:32:

Xaa	Val	Leu	Asp	Leu	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Asn	Glu	Leu	Leu	Glu
1				5						10				15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:33:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:33:

Pro	Val	Leu	Asp	Leu	Phe	Arg	Glu	Lys	Leu	Asn	Glu	Leu	Leu	Glu
1				5						10				15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:34:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 5

(D) Інша інформація: Хаа=Нафтилаланін

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:34:

Pro	Val	Leu	Asp	Xaa	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Asn	Glu	Leu	Leu	Glu
1				5						10				15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:35:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:35:

Pro	Val	Leu	Asp	Trp	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Asn	Glu	Leu	Leu	Glu
1				5						10				15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:36:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:36:

Pro	Leu	Leu	Glu	Leu	Leu	Lys	Glu	Leu	Leu	Gln	Glu	Leu	Leu	Glu
1				5						10				15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:37:

(i) Характеристики послідовності:

95

- (A) довжина: 22 амінокислоти
- (B) тип: амінокислотна
- (C) кількість ланцюгів: один
- (D) топологія: лінійна
- (ii) тип молекули: немає
- (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:37:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Trp Leu Asn Glu Leu Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:38:

- (i) Характеристики послідовності:

- (A) довжина: 22 амінокислоти
- (B) тип: амінокислотна
- (C) кількість ланцюгів: один
- (D) топологія: лінійна
- (ii) тип молекули: немає
- (ix) Властивості:

- (A) Ім'я/ключ: інший
- (B) Розміщення: 13
- (D) Інша інформація: Xaa=Aib
- (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:38:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Xaa Leu Glu
1 5 10 15

Ala Trp Lys Gln Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:39:

- (i) Характеристики послідовності:

- (A) довжина: 22 амінокислоти
- (B) тип: амінокислотна
- (C) кількість ланцюгів: один
- (D) топологія: лінійна
- (ii) тип молекули: немає
- (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:39:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Glu Glu Leu Leu Lys
1 5 10 15

Ala Leu Lys Lys Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:40:

- (i) Характеристики послідовності:

- (A) довжина: 22 амінокислоти
- (B) тип: амінокислотна
- (C) кількість ланцюгів: один
- (D) топологія: лінійна
- (ii) тип молекули: немає
- (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:40:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Asn Glu Leu Leu Arg Glu Leu Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Gln Lys Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:41:

- (i) Характеристики послідовності:

- (A) довжина: 22 амінокислоти
- (B) тип: амінокислотна
- (C) кількість ланцюгів: один
- (D) топологія: лінійна
- (ii) тип молекули: немає
- (ix) Властивості:

- (A) Ім'я/ключ: інший
- (B) Розміщення: 13
- (D) Інша інформація: Xaa=Aib
- (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:41:

Pro Val Leu Asp Leu Trp Arg Glu Leu Leu Asn Glu Xaa Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:42:

- (i) Характеристики послідовності:

71552

96

- (A) довжина: 22 амінокислоти
- (B) тип: амінокислотна
- (C) кількість ланцюгів: один
- (D) топологія: лінійна
- (ii) тип молекули: немає
- (ix) Властивості:

- (A) Ім'я/ключ: інший

- (B) Розміщення: 13

- (D) Інша інформація: Xaa=Aib

- (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:42:

Pro Val Leu Asp Glu Phe Arg Glu Lys Leu Asn Glu Xaa Trp Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:43:

- (i) Характеристики послідовності:

- (A) довжина: 22 амінокислоти
- (B) тип: амінокислотна
- (C) кількість ланцюгів: один
- (D) топологія: лінійна
- (ii) тип молекули: немає
- (ix) Властивості:

- (A) Ім'я/ключ: інший

- (B) Розміщення: 13

- (D) Інша інформація: Xaa=Aib

- (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:43:

Pro Val Leu Asp Glu Phe Arg Glu Lys Leu Trp Glu Xaa Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:44:

- (i) Характеристики послідовності:

- (A) довжина: 22 амінокислоти
- (B) тип: амінокислотна
- (C) кількість ланцюгів: один
- (D) топологія: лінійна
- (ii) тип молекули: немає
- (ix) Властивості:

- (A) Ім'я/ключ: інший

- (B) Розміщення: 1...22

- (D) Інша інформація: Всі амінокислоти, що генетично кодується в D-конфігурації

- (A) Ім'я/ключ: інший

- (B) Розміщення: 13 (D) Інша інформація: Xaa=Aib

- (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:44:

Pro Val Leu Asp Glu Phe Arg Glu Lys Leu Asn Glu Xaa Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:45:

- (i) Характеристики послідовності:

- (A) довжина: 22 амінокислоти
- (B) тип: амінокислотна
- (C) кількість ланцюгів: один
- (D) топологія: лінійна
- (ii) тип молекули: немає
- (ix) Властивості:

- (A) Ім'я/ключ: інший

- (B) Розміщення: 13

- (D) Інша інформація: Xaa=Aib

- (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:45:

Pro Val Leu Asp Glu Phe Arg Glu Lys Leu Asn Glu Xaa Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:46:

- (i) Характеристики послідовності:

97

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 13

(D) Інша інформація: Xaa=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:46:

Pro	Val	Leu	Asp	Leu	Phe	Arg	Glu	Lys	Leu	Asn	Glu	Xaa	Leu	Glu
1			5						10					15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:47:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:47:

Val	Leu	Asp	Leu	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Asn	Glu	Gly	Leu	Glu	Ala
1				5					10					15

Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:48:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1

(D) Інша інформація: Xaa=D-Pro

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 2

(D) Інша інформація: Xaa=D-Val

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:48:

Xaa	Xaa	Leu	Asp	Leu	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Asn	Glu	Leu	Leu	Glu
1			5							10				15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:49:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:49:

Pro	Val	Leu	Asp	Leu	Phe	Arg	Asn	Leu	Leu	Glu	Lys	Leu	Leu	Glu
1			5						10					15

Ala Leu Glu Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:50:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 13

71552

98

(D) Інша інформація: Xaa=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:50:

Pro	Val	Leu	Asp	Leu	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Trp	Glu	Xaa	Leu	Glu
1				5						10				15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:51:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: нема

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 13

(D) Інша інформація: Xaa=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:51:

Pro	Val	Leu	Asp	Leu	Phe	Trp	Glu	Leu	Leu	Asn	Glu	Xaa	Leu	Glu
1				5						10				15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:52:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 13

(D) Інша інформація: Xaa=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:52:

Pro	Val	Trp	Asp	Glu	Phe	Arg	Glu	Lys	Leu	Asn	Glu	Xaa	Leu	Glu
1				5						10				15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:53:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:53:

Val	Val	Leu	Asp	Leu	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Asn	Glu	Leu	Leu	Glu
1				5						10				15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:54:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:54:

Pro	Val	Leu	Asp	Leu	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Asn	Glu	Trp	Leu	Glu
1				5						10				15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:55:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 19 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

99

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:55:

Pro Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Leu Leu Glu Ala Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Lys

(2) Інформація для SEQ ID NO: 56:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:56:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Leu Leu Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Lys Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:57:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:57:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Asn Leu Leu Glu Glu Leu Leu Lys
 1 5 10 15

Ala Leu Glu Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:58:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 21 амінокислота

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 13

(D) Інша інформація: Xaa=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:58:

Pro Val Leu Asp Glu Phe Arg Glu Lys Leu Asn Glu Xaa Leu Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:59:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:59:

Leu Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Leu Leu Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:60:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 19 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:60:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Leu Leu Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln

(2) Інформація для SEQ ID NO:61:

(i) Характеристики послідовності:

71552

100

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 13

(D) Інша інформація: Xaa=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:61:



(2) Інформація для SEQ ID NO:62:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 13

(D) Інша інформація: Xaa=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:62:

Pro Val Leu Asp Glu Trp Arg Glu Lys Leu Asn Glu Xaa Leu Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:63:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 13

(D) Інша інформація: Xaa=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:63:

Pro Val Leu Asp Phe Phe Arg Glu Lys Leu Asn Glu Xaa Leu Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:64:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 13

(D) Інша інформація: Xaa=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:64:

Pro Trp Leu Asp Glu Phe Arg Glu Lys Leu Asn Glu Xaa Leu Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:65:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 21 амінокислота

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

101

- (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 12
 (D) Інша інформація: Хаа=Aib
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:65:



(2) Інформація для SEQ ID NO:66:

(i) Характеристики послідовності:

- (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:66:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Asn Leu Leu Glu Glu Leu Leu Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Gln Lys Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:67:

(i) Характеристики послідовності:

- (A) довжина: 21 амінокислот
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:67:

Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Leu Leu Glu Ala
 1 5 10 15

Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:68:

(i) Характеристики послідовності:

- (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

- (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 13
 (D) Інша інформація: Хаа=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:68:



(2) Інформація для SEQ ID NO:69:

(i) Характеристики послідовності:

- (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

- (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 13
 (D) Інша інформація: Хаа=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:69:



(2) Інформація для SEQ ID NO:70:

(i) Характеристики послідовності:

71552

102

- (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

- (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 13
 (D) Інша інформація: Хаа=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:70:

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

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:71:

(i) Характеристики послідовності:

- (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

- (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 14
 (D) Інша інформація: Хаа=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:71:

Pro Val Leu Asp Glu Phe Arg Glu Lys Leu Asn Glu Leu Xaa Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:72:

(i) Характеристики послідовності:

- (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

- (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 13
 (D) Інша інформація: Хаа=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:72:



(2) Інформація для SEQ ID NO:73:

(i) Характеристики послідовності:

- (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

- (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 13
 (D) Інша інформація: Хаа=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:73:

Pro Val Leu Asp Glu Phe Trp Glu Lys Leu Asn Glu Xaa Leu Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:74:

(i) Характеристики послідовності:

- (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна

103

- (ii) тип молекули: немає
 (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 13
 (D) Інша інформація: Xaa=Aib
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:74:



- (2) Інформація для SEQ ID NO:75:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:75:

Pro Val Leu Asp Glu Phe Arg Glu Lys Leu Asn Glu Glu Leu Glu
 1 5 10 15
 Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys
 20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:76:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 13
 (D) Інша інформація: Xaa=Aib
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:76:



- (2) Інформація для SEQ ID NO:77:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 13
 (D) Інша інформація: Xaa=Aib
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:77:



- (2) Інформація для SEQ ID NO:78:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 13
 (D) Інша інформація: Xaa=Aib
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:78:

71552

104

Pro Val Leu Asp Glu Phe Arg Asp Lys Leu Asn Glu Xaa Leu Glu

1 5 10 15
 Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys
 20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:79:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:80:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Glu Arg Leu Leu Asn Glu Leu Leu Glu
 1 5 10 15
 Ala Leu Gln Lys Lys Leu Lys
 20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:81:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 13
 (D) Інша інформація: Xaa=Aib
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:81:

Pro Val Leu Asp Glu Phe Arg Glu Lys Leu Asn Trp Xaa Leu Glu
 1 5 10 15
 Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys
 20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:82:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 20 амінокислот
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 11
 (D) Інша інформація: Xaa=Aib
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:82:

Leu Asp Glu Phe Arg Glu Lys Leu Asn Glu Xaa Leu Glu Ala Leu
 1 5 10 15
 Lys Gln Lys Leu Lys
 20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:83:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 13
 (D) Інша інформація: Xaa=Aib
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:83:

105

Pro Val Leu Asp Glu Phe Arg Glu Lys Leu Asn Glu Xaa Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Trp Gln Lys Leu Lys
20

(2) Інформація для SEQ ID NO:84:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:84:

Pro Val Leu Asp Glu Phe Arg Glu Lys Leu Asn Glu Leu Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys
20

(2) Інформація для SEQ ID NO:85:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 21 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:85:

Pro Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Leu Leu Glu Ala
1 5 10 15

Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:86:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:86:

Pro Val Leu Glu Leu Phe Glu Arg Leu Leu Asp Glu Leu Leu Asn
1 5 10 15

Ala Leu Gln Lys Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:87:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1...22

(D) Інша інформація: Всі амінокислоти, що перебувають в D-конфігурації

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:87:

Pro Leu Leu Glu Leu Leu Lys Glu Leu Leu Gln Glu Leu Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:88:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 13

(D) Інша інформація: Xaa=Aib

71552

106

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:88:



(2) Інформація для SEQ ID NO:89:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 13

(D) Інша інформація: Xaa=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:89:

Pro Val Leu Asp Glu Phe Arg Glu Lys Leu Asn Glu Xaa Leu Trp
1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:90:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 19 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 10

(D) Інша інформація: Xaa=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:90:

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

Gln Lys Leu Lys

(2) Інформація для SEQ ID NO:91:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 13

(D) Інша інформація: Xaa=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:91:

Pro Val Leu Asp Glu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Xaa Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:92:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 13

(D) Інша інформація: Xaa=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:92:

Pro Val Leu Asp Glu Phe Arg Glu Leu Tyr Asn Glu Xaa Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:93:

107

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 13

(D) Інша інформація: Xaa=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:93:

Pro	Val	Leu	Asp	Glu	Phe	Arg	Glu	Lys	Leu	Asn	Glu	Xaa	Leu	Lys
1			5						10					15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:94:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:94:

Pro	Val	Leu	Asp	Glu	Phe	Arg	Glu	Lys	Leu	Asn	Glu	Ala	Leu	Glu
1			5						10					15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:95:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 13

(D) Інша інформація: Xaa=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:95:

Pro	Val	Leu	Asp	Leu	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Asn	Leu	Xaa	Leu	Glu
1			5							10				15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:89:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 13

(D) Інша інформація: Xaa=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:89:

(2) Інформація для SEQ ID NO:96:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1...22

(D) Інша інформація: Xaa=Aib

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 13

71552

108

(D) Інша інформація: Xaa=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:96:

Pro	Val	Leu	Asp	Leu	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Asn	Glu	Xaa	Leu	Glu
1			5							10				15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:97:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 15 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:97:



(2) Інформація для SEQ ID NO:98:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:98:

Pro	Val	Leu	Asp	Leu	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Asn	Glu	Glu	Leu	Glu
1			5							10				15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:99:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:99:

Lys	Leu	Lys	Gln	Lys	Leu	Ala	Glu	Leu	Leu	Glu	Asn	Leu	Leu	Glu
1			5							10				15

Arg Phe Leu Asp Leu Val Pro

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:100:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1...22

(D) Інша інформація: Всі амінокислоти, що перебувають в D-конфігурації.

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:100:

Pro	Val	Leu	Asp	Leu	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Asn	Glu	Leu	Leu	Glu
1			5							10				15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO: 101:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 13

(D) Інша інформація: Xaa=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:101:

109

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Trp Xaa Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:102:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 13

(D) Інша інформація: Xaa=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO: 102:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Leu Xaa Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys Glu Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:103:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:103:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Glu Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:104:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 15 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:104:



(2) Інформація для SEQ ID NO:105:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:105:



(2) Інформація для SEQ ID NO:106:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:106:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Lys Leu Asn Glu Glu Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:107:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

71552

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1...22

(D) Інша інформація: Всі амінокислоти, перебувають в D-конфігурації

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:107:

Lys Leu Lys Gln Lys Leu Ala Glu Leu Leu Glu Asn Leu Leu Glu
1 5 10 15

Arg Phe Leu Asp Leu Val Pro

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:108:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 13

(D) Інша інформація: Xaa=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:108:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Trp Leu Leu Asn Glu Xaa Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:109:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:109:



(2) Інформація для SEQ ID NO:110:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 13

(D) Інша інформація: Xaa=Aib

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 14

(D) Інша інформація: Xaa=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:110:



(2) Інформація для SEQ ID NO: 111:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

111

- (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 13
 (D) Інша інформація: Хаа=Aib
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO: 111:



(2) Інформація для SEQ ID NO:112:

- (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

- (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 13
 (D) Інша інформація: Хаа=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:112:

Pro Val Leu Asp Glu Phe Arg Glu Lys Leu Asn Glu Xaa Ser Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:113:

- (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:113:

Pro Val Leu Asp Glu Phe Arg Glu Lys Leu Asn Glu Pro Leu Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO: 114:

- (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

- (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 13
 (D) Інша інформація: Хаа=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO: 114:

Pro Val Leu Asp Glu Phe Arg Glu Lys Leu Asn Glu Xaa Met Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:115:

- (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

- (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 13
 (D) Інша інформація: Хаа=Aib

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:108:

Pro Lys Leu Asp Glu Phe Arg Glu Lys Leu Asn Glu Xaa Leu Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

71552

112

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:116:

- (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

- (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 13
 (D) Інша інформація: Хаа=Aib
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:116:

Pro His Leu Asp Glu Phe Arg Glu Lys Leu Asn Glu Xaa Leu Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO: 117:

- (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає (ix) Властивості:

- (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 13
 (D) Інша інформація: Хаа=Aib
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:117:

Pro Glu Leu Asp Glu Phe Arg Glu Lys Leu Asn Glu Xaa Leu Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO: 118:

- (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

- (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 13
 (D) Інша інформація: Хаа=Aib
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:118:

Pro Val Leu Asp Glu Phe Arg Glu Lys Leu Asn Glu Xaa Leu Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Glu Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO: 119:

- (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

- (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 17
 (D) Інша інформація: Хаа=Aib
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:119:

Pro Val Leu Asp Glu Phe Arg Glu Lys Leu Asn Glu Glu Leu Glu
 1 5 10 15

Ala Xaa Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:120:

- (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна

113

- (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 16
 (D) Інша інформація: Xaa=Aib
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:120:

Pro Val Leu Asp Glu Phe Arg Glu Lys Leu Asn Glu Glu Leu Glu
 1 5 10 15

Xaa Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:121 :

- (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:121:

Pro Val Leu Asp Glu Phe Arg Glu Lys Leu Asn Glu Glu Leu Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Trp Gln Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:122:

- (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:122:

Pro Val Leu Asp Glu Phe Arg Glu Lys Leu Asn Glu Glu Leu Glu
 1 5 10 15

Trp Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:123:

- (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:123:

Gln Val Leu Asp Glu Phe Arg Glu Leu Asn Glu Leu Leu Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:124:

- (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 18
 (D) Інша інформація: Xaa=Orn
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 20
 (D) Інша інформація: Xaa=Orn
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 22
 (D) Інша інформація: Xaa=Orn
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:124:

Pro Val Leu Asp Glu Phe Xaa Glu Leu Leu Asn Glu Leu Leu Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Xaa Gln Xaa Leu Xaa

20

71552

114

- (2) Інформація для SEQ ID NO:125:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:125:

Asn Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Leu Leu Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:126:

- (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:126:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Leu Gly Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:127:

- (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:127:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Leu Leu Glu
 1 5 10 15

Leu Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:128:

- (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:128:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Leu Leu Glu
 1 5 10 15

Phe Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:129:

- (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:129:

Pro Val Leu Glu Leu Phe Asn Asp Leu Leu Arg Glu Leu Leu Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Gln Lys Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:130:

- (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:130:

115

Pro Val Leu Glu Leu Phe Asn Asp Leu Leu Arg Glu Leu Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO: 131:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:131:

Pro Val Leu Glu Leu Phe Lys Glu Leu Leu Asn Glu Leu Leu Asp
1 5 10 15

Ala Leu Arg Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:132:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:132:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Glu Asn Leu Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Gln Lys Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:133:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:133:

Pro Val Leu Glu Leu Phe Glu Arg Leu Leu Glu Asp Leu Leu Gln
1 5 10 15

Ala Leu Asn Lys Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:134:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:134:

Pro Val Leu Glu Leu Phe Glu Arg Leu Leu Glu Asp Leu Leu Lys
1 5 10 15

Ala Leu Asn Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:135:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:135:

Asp Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Leu Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:136:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

71552

116

(ii) тип молекули: немає

(x-i) Опис послідовності: SEQ ID NO:136:

Pro Ala Leu Glu Leu Phe Lys Asp Leu Leu Gln Glu Leu Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:137:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 17

(D) Інша інформація: Хаа=Нафтилаланін

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:137:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Gly Leu Glu
1 5 10 15

Ala Xaa Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:138:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:138:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Gly Leu Glu
1 5 10 15

Trp Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:139:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна (ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:139:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Trp Asn Glu Gly Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:140:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна (ii) тип молекули: співа-

ється

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 18

(D) Інша інформація: Хаа=Orn

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:140:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Gly Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Xaa Gln Xaa Leu Xaa

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:141:

(i) Характеристики послідовності:

117

- (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:141:

Pro Val Leu Asp Phe Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Gly Leu Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:142:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:142:

Pro Val Leu Glu Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Gly Leu Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:143:
 253 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 1...22
 (D) Інша інформація: ацильований по N-кінцю

або амільований по C- кінцю пептид

- (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:143:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Gly Leu Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Lys Gln Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:144:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 1
 (D) Інша інформація: Xaa=D-Pro
 (xi) Опис послідовності: SEQ TD NO:144:

Xaa Val Leu Glu Leu Phe Glu Asn Leu Leu Glu Arg Leu Leu Asp
 1 5 10 15

Ala Leu Gln Lys Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:145:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:145:

Gly Val Leu Glu Leu Phe Glu Asn Leu Leu Glu Arg Leu Leu Asp
 1 5 10 15

Ala Leu Gln Lys Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:146:
 (i) Характеристики послідовності:

71552

118

- (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:146:

Pro Val Leu Glu Leu Phe Glu Asn Leu Leu Glu Arg Leu Leu Asp
 1 5 10 15

Ala Leu Gln Lys Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:147:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:147:

Pro Val Leu Glu Leu Phe Glu Asn Leu Leu Glu Arg Leu Phe Asp
 1 5 10 15

Ala Leu Gln Lys Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:148:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:148:

Pro Val Leu Glu Leu Phe Glu Asn Leu Leu Glu Arg Leu Gly Asp
 1 5 10 15

Ala Leu Gln Lys Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:149:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:149:

Pro Val Leu Glu Leu Phe Glu Asn Leu Trp Glu Arg Leu Leu Asp
 1 5 10 15

Ala Leu Gln Lys Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO:150:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:150:

Pro Leu Leu Glu Leu Phe Glu Asn Leu Leu Glu Arg Leu Leu Asp
 1 5 10 15

Ala Leu Gln Lys Lys Leu Lys

20

- (2) Інформація для SEQ ID NO: 151:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 22 амінокислоти
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:151:

Pro Val Leu Glu Leu Phe Glu Asn Leu Gly Glu Arg Leu Leu Asp
 1 5 10 15

Ala Leu Gln Lys Lys Leu Lys

20

121

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:163:

Pro	Val	Leu	Glu	Leu	Phe	Glu	Asn	Leu	Leu	Glu	Arg	Leu	Trp	Asp
1			5					10						15

Ala Leu Gln Lys Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:164:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:164:

Pro	Val	Leu	Glu	Leu	Phe	Glu	Asn	Leu	Leu	Glu	Arg	Leu	Leu	Asp
1			5					10						15

Ala Trp Gln Lys Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:165:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:165:

Pro	Val	Leu	Glu	Leu	Phe	Glu	Asn	Leu	Leu	Glu	Arg	Leu	Leu	Asp
1			5					10						15

Leu Leu Gln Lys Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:166:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:166:

267 (2) Інформація для SEQ ID NO:167:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:167:

Pro	Val	Leu	Glu	Leu	Phe	Glu	Asn	Gly	Leu	Arg	Leu	Leu	Asp
1			5					10					15

Ala Leu Gln Lys Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:168:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:168:

Pro	Val	Leu	Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Leu	Glu	Lys	Leu	Leu	Asp
1			5					10						15

Ala Leu Gln Lys Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:169:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

71552

122

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:169:

Pro	Val	Leu	Glu	Leu	Phe	Glu	Asn	Leu	Leu	Glu	Lys	Leu	Leu	Asp
1			5					10						15

Ala Leu Gln Lys Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:170:

(1) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 12

(D) Інша інформація: Xaa=Orn

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 19

(D) Інша інформація: Xaa=Orn

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 20

(D) Інша інформація: Xaa=Orn

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 22

(D) Інша інформація: Xaa=Orn

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:170:

Pro	Val	Leu	Glu	Leu	Phe	Glu	Asn	Leu	Leu	Glu	Xaa	Leu	Leu	Asp
1			5					10						15

Ala Leu Gln Xaa Xaa Leu Xaa

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:171:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:171:

Pro	Val	Leu	Glu	Leu	Phe	Glu	Asn	Leu	Leu	Glu	Lys	Leu	Leu	Asp
1			5					10						15

Leu Leu Gln Lys Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:172:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:172:

Pro	Val	Leu	Glu	Leu	Phe	Leu	Asn	Leu	Leu	Glu	Arg	Leu	Gly	Asp
1			5					10						15

Ala Leu Gln Lys Lys Leu Lys

20

271 (2) Інформація для SEQ ID NO:173:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO: 173:

Pro	Val	Leu	Asp	Leu	Phe	Asp	Asn	Leu	Leu	Asp	Arg	Leu	Leu	Asp
1			5					10						15

Leu Leu Asn Lys Lys Leu Lys

(2) Інформація для SEQ ID NO:174:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

123

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1...22

(D) Інша інформація: Всі амінокислоти знаходяться в D-конфігурації

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:174:

Pro	Val	Leu	Glu	Leu	Phe	Glu	Asn	Leu	Leu	Glu	Arg	Leu	Leu	Asp
1				5						10				15

Ala Leu Gln Lys Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:175:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:175:

Pro	Val	Leu	Glu	Leu	Phe	Glu	Asn	Leu	Leu	Glu	Arg	Leu	Leu	Glu
1				5						10				15

Leu Leu Asn Lys Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:176:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:176:

Pro	Val	Leu	Glu	Leu	Trp	Glu	Asn	Leu	Leu	Glu	Arg	Leu	Leu	Asp
1				5						10				15

Ala Leu Gln Lys Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:177:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:177:

Gly	Val	Leu	Glu	Leu	Phe	Leu	Asn	Leu	Leu	Glu	Arg	Leu	Leu	Asp
1				5						10				15

Ala Leu Gln Lys Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:178:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:178:



(2) Інформація для SEQ ID NO:179:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:179:

71552

124



(2) Інформація для SEQ ID NO:180:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:180:



(2) Інформація для SEQ ID NO:181:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:181:

Pro	Val	Leu	Glu	Leu	Phe	Glu	Asn	Leu	Leu	Glu	Arg	Trp	Leu	Asp
1				5						10				15

Ala Leu Gln Lys Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:182:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:182:

Pro	Val	Leu	Glu	Leu	Phe	Glu	Asn	Leu	Leu	Glu	Lys	Leu	Leu	Glu
1				5						10				15

Ala Leu Gln Lys Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:183:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:183:



(2) Інформація для SEQ ID NO:184:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:184:



(2) Інформація для SEQ ID NO:185:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

125

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 19

(D) Інша інформація: Xaa=Orn

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 20

(D) Інша інформація: Xaa=Orn

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 22

(D) Інша інформація: Xaa=Orn

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:185:

Pro	Val	Leu	Glu	Leu	Phe	Glu	Asn	Leu	Leu	Glu	Arg	Leu	Leu	Asp
1				5					10					15

Ala Leu Gln Xaa Xaa Leu Xaa

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:186:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:186:

Pro	Val	Leu	Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Leu	Glu	Arg	Leu	Leu	Asp
1				5					10					15

Ala Leu Gln Lys Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:187:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:187:

Pro	Val	Leu	Glu	Leu	Phe	Glu	Asn	Leu	Leu	Glu	Arg	Leu	Leu	Asp
1				5					10					15

Ala Leu Asn Lys Lys Leu Lys

20

(2) Інформація, для SEQ ID NO: 188:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:188:

Pro	Val	Leu	Glu	Leu	Phe	Glu	Asn	Leu	Leu	Asp	Arg	Leu	Leu	Asp
1				5					10					15

Ala Leu Gln Lys Lys Leu Lys

20

(2-) Інформація для SEQ ID NO: 189:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:189:

Asp	Val	Leu	Glu	Leu	Phe	Glu	Asn	Leu	Leu	Glu	Arg	Leu	Leu	Asp
1				5					10					15

Ala Leu Gln Lys Lys Leu Lys

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:190:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 22 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

71552

126

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:190:

Pro	Val	Leu	Glu	Phe	Trp	Asp	Asn	Leu	Leu	Asp	Lys	Leu	Leu	Asp
1				5					10					15

Ala Leu Gln Lys Lys Leu Arg

20

(2) Інформація для SEQ ID NO:191:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1... 18

(D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і

C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:193:

Pro	Val	Leu	Asp	Leu	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Glu	Leu	Lys	Gln
1				5					10					15

Lys Leu Lys

(2) Інформація для SEQ ID NO:194:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1... 18

(D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і

C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:194:

Pro	Val	Leu	Glu	Leu	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Glu	Leu	Lys	Gln
1				5					10					15

Lys Leu Lys

(2) Інформація для SEQ ID NO:195:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислоти

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1... 18

(D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і

C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:191:

Pro	Val	Leu	Asp	Leu	Leu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Glu	Leu	Lys	Gln
1				5					10					15

Lys Leu Lys

(2) Інформація для SEQ ID NO:192:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1... 18

(D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і

C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:192:

127

Pro Val Leu Asp Leu Phe Lys Glu Leu Leu Glu Glu Leu Lys Gln
1 5 10 15

Lys Leu Lys

(2) Інформація для SEQ ID NO:193:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1... 18

(D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і

C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: GEQ ID NO:195:

Pro Val Leu Glu Leu Phe Lys Glu Leu Leu Glu Glu Leu Lys Gln
1 5 10 15

Lys Leu Lys

(2) Інформація для SEQ ID NO:196:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1... 18

(D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і

C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:196:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Glu Glu Leu Lys Asn
1 5 10 15

Lys Leu Lys

(2) Інформація для SEQ ID NO:197:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1... 18

(D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і

C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:197:

Pro Leu Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Glu Glu Leu Lys Gln
1 5 10 15

Lys Leu Lys

(2) Інформація для SEQ ID NO:198:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1... 18

(D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і

C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:198:

Gly Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Glu Glu Leu Lys Gln
1 5 10 15

Lys Leu Lys

(2) Інформація для SEQ ID NO:199:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

71552

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:199:



(2) Інформація для SEQ ID NO:200:

(1) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1... 18

(D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і

C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:200:

Asn Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Glu Glu Leu Lys Gln
1 5 10 15

Lys Leu Lys

(2) Інформація для SEQ ID NO:201:

(1) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тваней молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1... 18

(D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і

C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:201:



(2) Інформація для SEQ ID NO:202:

(1) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1...18

(D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і

C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:202:



(2) Інформація для SEQ ID NO:203:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1... 18

129

(D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:203:

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

Lys Leu Lys

(2) Інформація для SEQ ID NO:204:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1... 18

(D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:204:



(2) Інформація для SEQ ID NO:205:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1... 18

(D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:205:



(2) Інформація для SEQ ID NO:206:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1... 18

(D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:206:



(2) Інформація для SEQ ID NO:207:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1... 18

(D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:207:

71552

130



(2) Інформація для SEQ ID NO:208:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1... 18

(D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:208:

Pro Ala Leu Glu Leu Phe Lys Asp Leu Leu Glu Glu Leu Arg Gln
1 5 10 15

Arg Leu Lys

(2) Інформація для SEQ ID NO:209:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:209:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Leu Lys Gln
1 5 10 15

Lys Leu Lys

(2) Інформація для SEQ ID NO:210:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:210:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Glu Glu Leu Lys Gln
1 5 10 15

Lys Leu Lys

(2) Інформація для SEQ ID NO:211:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1... 18

(D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і C-кінець амідовано

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 14

(D) Інша інформація: Xaa=Orn

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 16

(D) Інша інформація: Xaa=Orn

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 18

(D) Інша інформація: Xaa=Orn

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:211:



(2) Інформація для SEQ ID NO:212:

131

- (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 18 амінокислот
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 1... 10
 (D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і C-кінець амідовано

- (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 7
 (D) Інша інформація: Xaa=Orn
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 14
 (D) Інша інформація: Xaa=Orn
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 16
 (D) Інша інформація: Xaa=Orn
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:212:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Xaa Glu Leu Leu Glu Glu Leu Xaa Gln
 1 5 10 15

Xaa Leu Lys

- (2) Інформація для SEQ ID NO:213:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 18 амінокислот
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 1... 18
 (D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і C-кінець амідовано
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:213:

Pro Ala Leu Glu Leu Phe Lys Asp Leu Leu Glu Glu Phe Arg Gln
 1 5 10 15

Arg Leu Lys

- (2) Інформація для SEQ ID NO: 214:
 (i) Характеристики послідовності: (A) довжина: 18 амінокислот
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 1... 18
 (D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і C-кінець амідовано

- (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 1
 (D) Інша інформація: D-конфігурація Pro
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:213:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Glu Glu Leu Lys Gln
 1 5 10 15

Lys Leu Lys

- (2) Інформація для SEQ ID NO:215:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 18 амінокислот
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (ix) Властивості:

71552

132

- (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 1... 18
 (D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і C-кінець амідовано
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:215:



- (2) Інформація для SEQ ID NO:216:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 18 амінокислот
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:216:



- (2) Інформація для SEQ ID NO:217:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 18 амінокислот
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:217:



- (2) Інформація для SEQ ID NO:218:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 18 амінокислот
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (ii) тип молекули: немає
 (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 1... 18
 (D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і C-кінець амідовано
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:218:



- (2) Інформація для SEQ ID NO:219:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 18 амінокислот
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:219:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Leu Trp Gln
 1 5 10 15

Lys Leu Lys

- (2) Інформація для SEQ ID NO:220:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 18 амінокислот
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:220:



133

(2) Інформація для SEQ ID NO:221:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1... 18

(D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і

C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:221:

Asp Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Glu Glu Leu Lys Gln
1 5 10 15

Lys Leu Lys

(2) Інформація для SEQ ID NO:222:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:222:

Pro Val Leu Asp Ala Phe Arg Glu Leu Leu Glu Ala Leu Leu Gln
1 5 10 15

Leu Lys Lys

(2) Інформація для SEQ ID NO:223:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(11) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:223:



(2) Інформація для SEQ ID NO:224:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:224:



(2) Інформація для SEQ ID NO:225:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:225:



(2) Інформація для SEQ ID NO:226:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

71552

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:226:

Pro Val Leu Asp Ala Phe Arg Glu Leu Gly Glu Ala Leu Leu Gln
1 5 10 15

Leu Lys Lys

(2) Інформація для SEQ ID NO:227:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1... 18

(D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і

C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:227:



(2) Інформація для SEQ ID NO:228:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1... 18

(D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і

C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:228:



(2) Інформація для SEQ ID NO: 229:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1... 10

(D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і

C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:229:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Glu Glu Gly Lys Gln
1 5 10 15

Lys Leu Lys

(2) Інформація для SEQ ID NO:230:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 10 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:230:

Pro Val Leu Glu Leu Phe Glu Arg Leu Leu Glu Asp Leu Gln Lys
1 5 10 15

Lys Leu Lys

(2) Інформація для SEQ ID NO:231:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

135

- (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:231:



- (2) Інформація для SEQ ID NO:232:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 18 амінокислот
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 1... 18
 (D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і C-кінець амідовано
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:232:



- (2) Інформація для SEQ ID NO:233:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина:
 (B) тип:
 (C) нитка:
 (D) топологія
 (ii) молекулярний тип:
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:233:
 Ця послідовність збирається пропущена.
 (2) Інформація для SEQ ID NO:234:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина:
 (B) тип:
 (C) нитка:
 (D) топологія
 (ii) молекулярний тип:
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:234:
 Ця послідовність збирається пропущена.
 (2) Інформація для SEQ ID NO:235:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина:
 (B) тип:
 (C) нитка:
 (D) топологія
 (ii) молекулярний тип:
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:235:
 Ця послідовність збирається пропущена.
 (2) Інформація для SEQ ID NO:236:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина:
 (B) тип:
 (C) нитка:
 (D) топологія
 (ii) молекулярний тип:
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:236:
 Ця послідовність збирається пропущена.
 (2) Інформація для SEQ ID NO:237:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 18 амінокислот
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна

71552

136

- (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:237:



- (2) Інформація для SEQ ID NO:238:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 18 амінокислот
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 1... 18
 (D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і C-кінець амідовано
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:238:
 Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Val Leu Glu Lys Leu Lys
 1 5 10 15
 Glu Leu Phe
 (2) Інформація для SEQ ID NO:239:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 18 амінокислот
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 1... 18
 (D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і C-кінець амідовано
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:239:
 Glu Trp Leu Glu Ala Phe Tyr Lys Lys Val Leu Glu Lys Leu Lys
 1 5 10 15
 Glu Leu Phe
 (2) Інформація для SEQ ID NO:240:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 18 амінокислот
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 1... 18
 (D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і C-кінець амідовано
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:240:
 Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys
 1 5 10 15
 Glu Ala Phe
 (2) Інформація для SEQ ID NO:241:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 18 амінокислот
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:241:
 Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Glu Phe Phe
 (2) Інформація для SEQ ID NO:242:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) довжина: 18 амінокислот
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один

137

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:242:

Gly	lie	Lys	Lys	Phe	Leu	Gly	Ser	lie	Trp	Lys	Phe	lie	Lys	Ala
1				5					10					15

Phe Val Gly

(2) Інформація для SEQ ID NO:243:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:243:

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

Glu Ala Phe

(2) Інформація для SEQ ID NO:244:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:244:

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

Glu Ala Phe

(2) Інформація для SEQ ID NO:245:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:245:

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

Glu Phe Phe

(2) Інформація для SEQ ID NO:246:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:246:

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

Glu Leu Phe

(2) Інформація для SEQ ID NO:247:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:247:

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

Glu Phe Phe

(2) Інформація для SEQ ID NO:240:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:248:

71552

138

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

Glu Leu Phe

(2) Інформація для SEQ ID NO:249:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1...18

(D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і

C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO: 24 9:

Glu	Trp	Leu	Lys	Ala	Glu	Tyr	Glu	Lys	Val	Glu	Glu	Lys	Leu	Lys
1			5						10					15

Glu Leu Phe

(2) Інформація для SEQ ID NO:250:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1... 18

(D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і

C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:250:

Glu	Trp	Leu	Lys	Ala	Glu	Tyr	Glu	Lys	Val	Leu	Glu	Lys	Leu	Lys
1			5						10					15

Glu Leu Phe

(2) Інформація для SEQ ID NO:251:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 18 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна

(ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1... 18

(D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і

C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:251:

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

Glu Leu Phe

(2) Інформація для SEQ ID NO:252:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 15 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

(C) кількість ланцюгів: один

(D) топологія: лінійна (ii) тип молекули: немає

(ix) Властивості:

(A) Ім'я/ключ: інший

(B) Розміщення: 1... 15

(D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і

C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:252:

Pro	Val	Leu	Asp	Leu	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Gln	Lys	Leu	Lys
1			5						10					15

(2) Інформація для SEQ ID NO:253:

(i) Характеристики послідовності:

(A) довжина: 16 амінокислот

(B) тип: амінокислотна

139

- (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 1... 16
 (D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і

C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:253:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Glu Glu Leu Lys Gln
 1 5 10 15

Lys

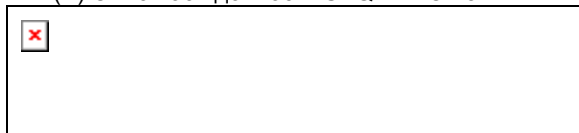
(2) Інформація для SEQ ID NO:254:

(i) Характеристики послідовності:

- (A) довжина: 16 амінокислот
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 1... 16
 (D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і

C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:254:



(2) Інформація для SEQ ID NO:255:

(i) Характеристики послідовності:

- (A) довжина: 15 амінокислот
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 1... 15
 (D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і

C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:255:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Gln Lys
 1 5 10 15

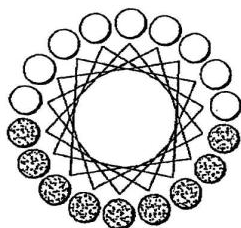
(2) Інформація для SEQ ID NO:256:

(i) Характеристики послідовності:

- (A) довжина: 16 амінокислот

амфipатична α - спіраль

- гідрофобний залишок
 ○ гідрофільний залишок



спіральне коло

Fig. 1A

71552

- (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 1... 16
 (D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і

C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:256:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Glu Ala Leu Lys Gln
 1 5 10 15

Lys

(2) Інформація для SEQ ID NO:257:

(i) Характеристики послідовності:

- (A) довжина: 16 амінокислот
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 1... 16
 (D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і

C-кінець амідовано

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:257:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Glu Asn Leu Leu Glu Arg Leu Lys Gln
 1 5 10 15

Lys

(2) Інформація для SEQ ID NO:258:

(i) Характеристики послідовності:

- (A) довжина: 16 амінокислот
 (B) тип: амінокислотна
 (C) кількість ланцюгів: один
 (D) топологія: лінійна
 (ii) тип молекули: немає
 (ix) Властивості:
 (A) Ім'я/ключ: інший
 (B) Розміщення: 1... 16
 (D) Інша інформація: N-кінець ацетильовано і

C-кінець амідовано

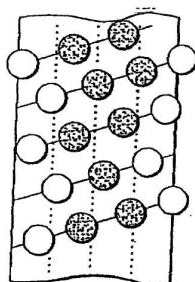
(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO:258:

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Leu Lys Gln
 1 5 10 15

Lys

амфipатична α - спіраль

- гідрофобний залишок
 ○ гідрофільний залишок

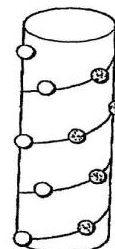


спіральна сітка

Fig. 1B

амфipатична α - спіраль

- гідрофобний залишок
 ○ гідрофільний залишок

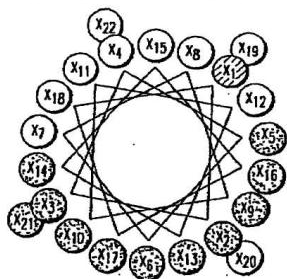


спіральний циліндр

Fig. 1C

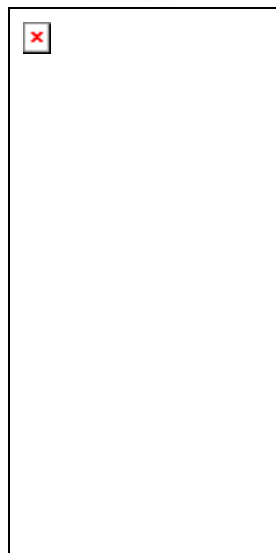
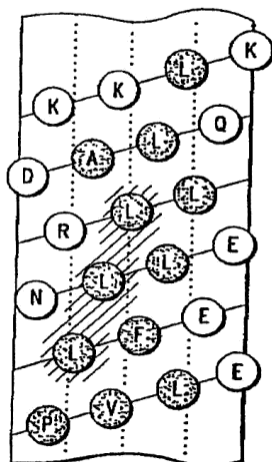
структура (I)

- гідрофобний залишок
- гідрофільний залишок
- ▨ гідрофобний або гідрофільний



спіральне коло

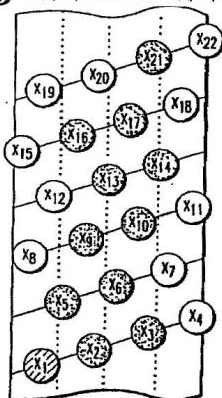
Фиг. 2A

гідрофобний центр
пептид 146

Фиг. 4B

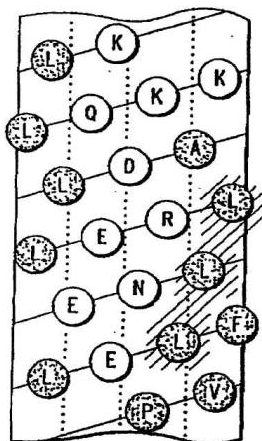
структура (I)

- гідрофобний залишок
- гідрофільний залишок
- ▨ гідрофобний або гідрофільний

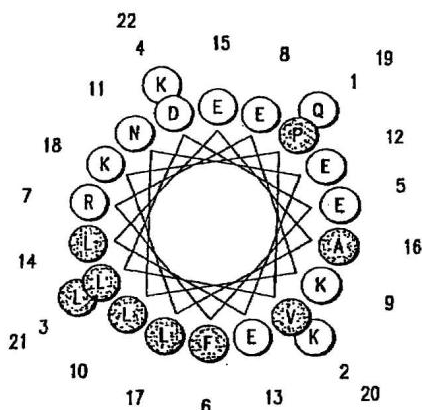


гідрофобний центр

Фиг. 2B

гідрофільний центр
пептид 146

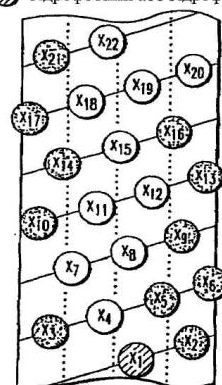
Фиг. 3B

спіральне коло
консенсус 22-MER

Фиг. 5A

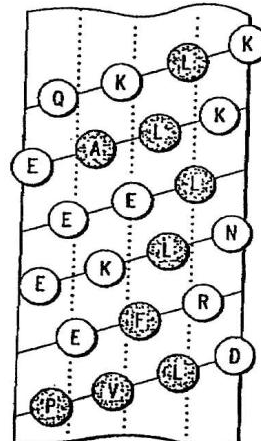
структура (I)

- гідрофобний залишок
- гідрофільний залишок
- ▨ гідрофобний або гідрофільний

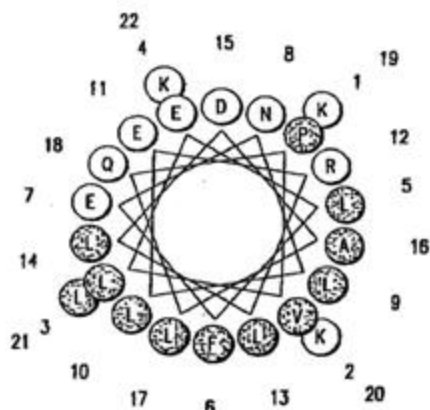


гідрофільний центр

Фиг. 2C

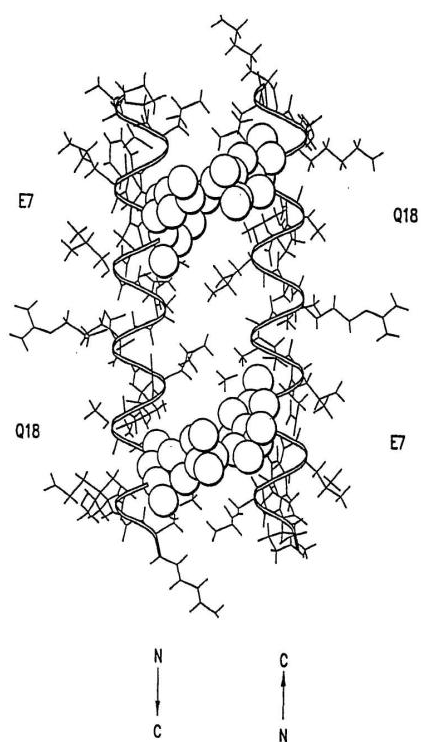
гідрофобний центр
консенсус 22-MER

Фиг. 4A

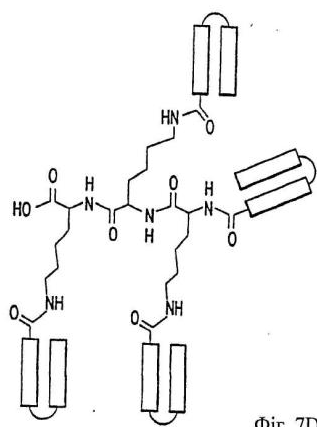
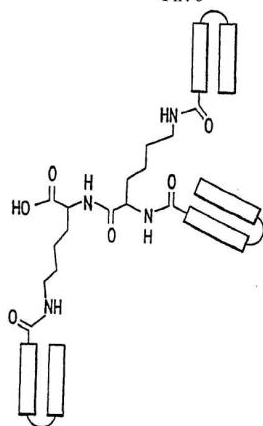
спіральне коло
пептид 146

Фиг. 5B

143



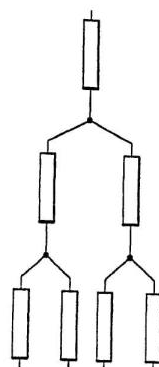
Фиг. 6



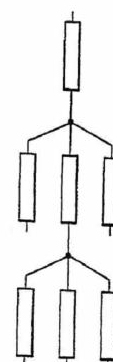
Фиг. 7D

71552

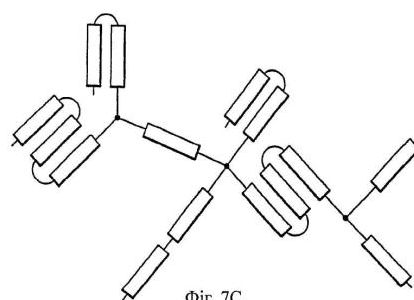
144



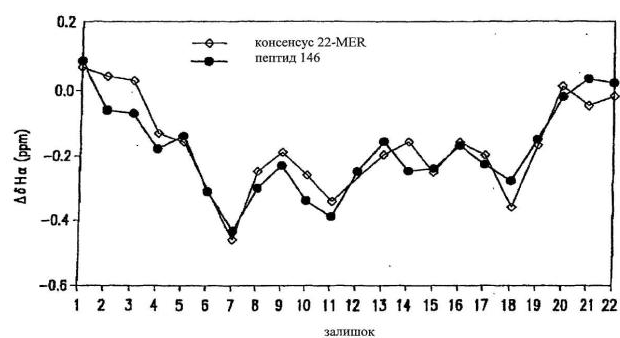
Фиг. 7A



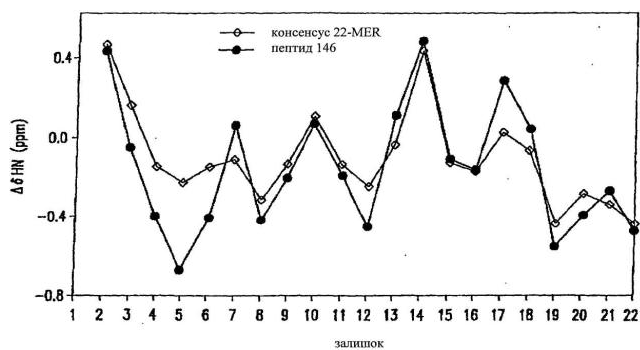
Фиг. 7B



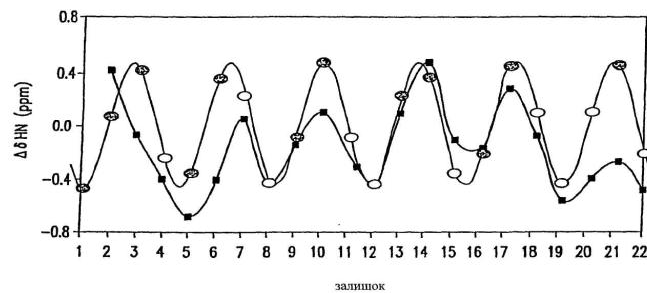
Фиг. 7C



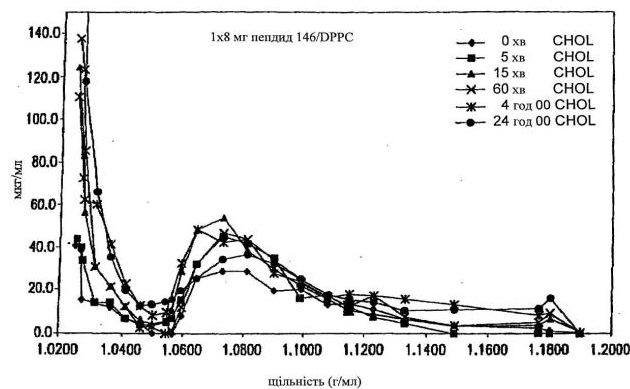
Фиг. 8A



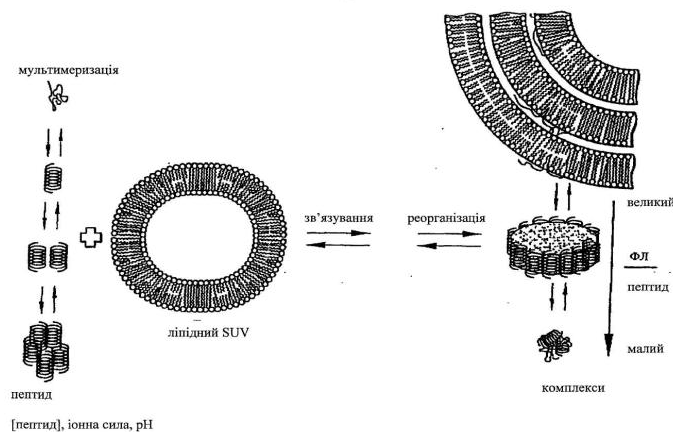
Фиг. 8B



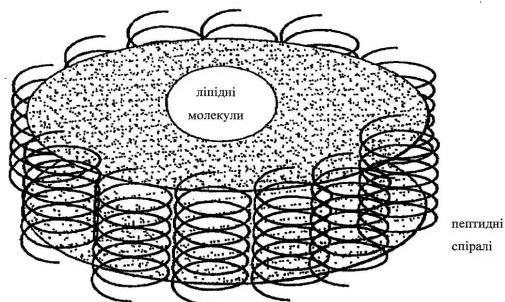
Фіг. 8С



Фіг. 9



Фіг. 10А



Фіг. 10В