(12) **PATENT**

(19) NO (11) **329204** (13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.
C07K 14/775 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20001598	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1998.09.28 PCT/US98/20326
(22)	Inng.dag	2000.03.28	(85)	Videreføringsdag	2000.03.28
(24)	Løpedag	1998.09.28	(30)	Prioritet	1997.09.29, US, 940096
(41)	Alm.tilgj	2000.05.02			
(45)	Meddelt	2010.09.13			

(73) Innehaver Jean-Louis Dasseux, 777 Sherwood Hills Drive, Bloomington, IN 47401, US-, USA
Renate Sekul, Wichernstrasse 13, DE-68526 LADENBURG, Tyskland
Klaus Buttner, Eichendorffstrasse 6, D-74925 Epfenbach, DE-, Tyskland
Isabelle Cornut, Meisenweg 10, D-68535 Edingen-Neckarhausen, DE-, Tyskland
Gunther Metz, Lessingstrasse 14, D-68535 Edingen-Neckarhausen, DE-, Tyskland

(72) Oppfinner Jean-Louis Dasseux, 777 Sherwood Hills Drive, Bloomington, IN 47401, US-, USA
Renate Sekul, Wichernstrasse 13, DE-68526 LADENBURG, Tyskland
Klaus Buttner, Eichendorffstrasse 6, D-74925 Epfenbach, DE-, Tyskland
Isabelle Cornut, Meisenweg 10, D-68535 Edingen-Neckarhausen, DE-, Tyskland
Gunther Metz, Lessingstrasse 14, D-68535 Edingen-Neckarhausen, DE-, Tyskland

(74) Fullmektig Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54) Benevnelse **Apolipoprotein A-1 agonister og multimerer derav, farmasøytisk sammensetning og bruk til behandling.**

(56) Anførte publikasjoner
Anantharamaiah G. M. et al., Arteriosclerosis, 1990, vol. 10, s. 95-105

(57) Sammendrag

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer peptider og peptidanaloger som etterligner de strukturelle og farmakologiske egenskapene til humant ApoA-1. Peptidene og peptidanalogene er nyttige for å behandle forskjellige sykdommer assosiert med dyslipidemi.

1. INTRODUKSION

Oppfinnelsen vedrører apolipoprotein A-I (ApoA-I) agonistsammensetninger for å behandle sykdommer assosiert med dyslipoproteinemi, inklusiv hyperkolesterolemi, kardivaskulær sykdom, aterosklerose, restenose, og andre forstyrrelser som septisk sjokk.

2. BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

Sirkulerende kolesterol blir båret av plasmalipoproteiner - partikler av komplekst lipid og proteinsammensetning som transporterer lipider i blodet. Lavtetthetslipoproteiner (LDL) og høytetthetslipoproteiner (HDL) er hovedkolesterolbærerne. Man tror at LDL er ansvarlig for avlevering av kolesterol fra lever (hvor det blir syntetisert eller erverves fra næringsmidler) til vev utenfor leveren i kroppen. Betegnelsen "reverskolesterol-transport" beskriver transport av kolesterol fra vev utenfor leveren til leveren hvor den blir katabolisert og eliminert. Man tror at plasma HDL partikler spiller en hovedrolle i den reverse transportprosessen, og virker som en søppeltømmer for vevskolesterol.

Bevisene som kopler forhøyet serumkolesterol til koronar hjertesykdom er store. For eksempel, aterosklerose er en langsom progressiv sykdom karakterisert ved akkumulering av kolesterol inne i arterieveggene. Fremstående bevis støtter konseptet at lipider deponert i aterosklerotiske lesioner er avledet primært fra plasma LDL; derfor har LDL blitt kjent som det "slemme" kolesterolet. I motsetning til, korrelerer HDL serumsnivåene inverst med koronar hjertesykdom, høye serumsnivåer av HDL er betraktet som en negativ risikofaktor. Det er fremstilt hypoteser at høye nivåer av plasma HDL er ikke bare beskyttende mot koronar hjertesykdom, men induserer regresion av aterosklerotiske plakk (f.eks. se Badimon et al., 1992, Circulation 86 (Suppl. III) :86-94). Derfor, har HDL populært blitt kjent som "det gode" kolesterol.

2.1. KOLESTEROLTRANSPORT

Fett-transportsystemet kan deles i to reaksionsveier: et eksogent for kolesterol og triglyserider absorbert fra tarmene, og et endogent for kolesterol og triglyserider som kommer i blodstrømmen fra leveren og andre vev.

I den eksogene reaksionsveien, blir fett fra maten pakket inn i lipoproteinpartikler kalt kylomikroner som går inn i blodstrømmen og avleverer deres triglyserider til fettvevet (for lagring) og til muskel (for oksidering for å gi energi). Resten av kylomikron, som inneholder kolesterylestere, blir fjernet fra sirkulasionen av en spesifikk reseptor som finnes bare på leverceller. Dette kolesterolet blir deretter tilgjengelig igjen for cellulær metabolisme eller for resirkulasion til ekstrahepatisk vev som plasma lipoproteiner.

I den endogene reaksionsveien, sekreterer leveren en stor, svært lav tetthetslipoprotein-partikkel (VLDL) inn i blodstrømmen. Kjernen av VLDL består for det meste av triglyserider syntetisert i leveren, med en mindre mengde av kolesterylestere (enten syntetisert i leveren eller resirkulert fra kylomikronene). To dominerende proteiner blir på overflaten av VLDL, apoprotein B-100 og apoprotein E. Når en VLDL når kapillarene til fettvevet eller muskel, blir dets triglyserider ekstrahert og dette resulterer i en ny type partikkel, forminsket i størrelse og anriket på kolesterylestere, men bibeholder sine to apoproteiner, kalt intermediat-tetthetslipoprotein (IDL).

Hos mennesker, blir omtrent halvparten av IDL-partiklene fjernet fra sirkulasionen raskt (innen to til seks timer etter deres dannelse), fordi de binder tett til leverceller som ekstraherer deres kolesterol ved å lage ny VLDL og gallesyrer. IDL partiklene som ikke blir tatt opp av leveren forblir i sirkulasionen lenger. Over tid, dissosierer apoprotein E fra de sirkulerende partikler, og konverterer dem til LDL som har apoprotein B-100 som deres kjerneprotein.

Primært, tar leveren opp og degraderer det meste av kolesterolet til gallesyrer, som er endeproduktene til kolesterolmetabolisme. Opptaket av kolesterol som inneholder partikler blir mediert av LDL reseptorer, som er tilstede i høye konsentrasioner på hepatocytter. LDL reseptorene binder både apoprotein E og apoprotein B-100, og er ansvarlig for å binde og fjerne både IDL og LDL fra sirkulasionen. Imidlertid, er affiniteten av apoprotein E for LDL reseptoren større enn for apoprotein B-100. Som et resultat, har LDL partiklene mye lengere sirkuleringstidsrom enn IDL-partiklene - LDL sirkulerer i gjennomsnitt i to og en halv dag før den bindes til LDL reseptorene i leveren og andre vev. Høyere serumsnivåer av LDL (det "slemme" kolesterolet) er positivt assosiert med koronar hjertesykdom. For eksempel, i aterosklerose, kolesterol avledet fra sirkulerings LDL akkumulerer i veggene på arteriene som fører til dannelse av uregelmessige plakk som inhiberer gjennomstrømningen av blod inntil en propp eventuelt dannes, obstruksion av arterien forårsaker et hjerteanfall eller slag.

Og til slutt, mengden av intracellulær kolesterol frigitt fra LDL kontrollerer cellulær kolesterolmetabolisme. Akkumulering av cellulær kolesterol avledet fra VLDL og LDL kontrollerer tre prosesser: først, den reduserer cellulær kolesterolsynteser ved å skru av syntesen for HMGCoA reduktase - et nøkkelenzym i kolesterolbiosyntetisk reaksionsvei. For det andre, innkommende LDL avledet kolesterol fremmer lagring av kolesterol ved å aktivere ACAT - det cellulære enzymet som konverterer kolesterol til kolesterylestere som blir lagret i lagringsdråper. For det tredje akkumulering av kolesterol i cellene driver en feedback-mekanisme som inhiberer cellulær syntese av nye LDL reseptorer. Cellene, justerer derfor deres komplement av LDL reseptorer slik at tilstrekkelig kolesterol blir brukt for å møte deres metabolske behov, uten å være overlastet. (For gjennomgang, se Brown & Goldstein, In, The Pharmacological Basis Of Therapeutics, 8. Utg. Goodman & Gilman, Pergamon Press, NY, 1990, Ch. 36, s. 874-896).

2.2. REVERS KOLESTEROLTRANSPORT

I sum, erverver perifere (ikke-hepatisk) celler deres kolesterol fra en kombinasion av lokal syntese og opptak av predannet sterol fra VLDL og LDL. I motsetning til revers kolesteroltransport (RCT) er reaksionsveien hvorved perifer cellekolesterol kan returneres til leveren for resirkulering til ekstrahepatiske vev, eller ekskresion inn i tarmene som galle, enten i modifisert eller oksidert form som gallesyrer. RCT reaksionsveien representerer bare metoder for å eliminere kolesterol fra de fleste ekstrahepatiske vev, og er viktig for å opprettholde strukturen og funksionen til de fleste cellene i kroppen.

RCT består i hovedsak av tre trinn: (a) kolesterolutstrømning, den initielle fjerningen av kolesterol fra forskjellige oppsamlinger i perifere celler; (b) kolesterolesterifisering ved virkningen av lekitin: kolesterolacyltransferase forhindre en re-tilbakegang av kolesterol som gått ut av cellen tilbake til cellene; og (c) opptak/avlevering av HDL kolesterylester til leverceller. RCT reaksionsveien blir mediert av HDL. HDL er en generisk term for lipoproteinpartikler som blir karakterisert ved deres høye tetthet. Hovedlipidbestanddelene i HDL kompleksene er av forskjellige fosfolipider, kolesterol (ester) og triglyserider. De mest fremtredende apolipoproteinkomponentene er A-I og A-II som bestemmer de funksionelle karakteristika hos HDL; videre er det en mindre mengde av apolipoprotein C-I, C-II, C-III, D, E, J, etc. som er blitt observert. HDL kan virke i mange forskjellige størrelser og forskjellige blandinger av ovenfornevnte bestanddeler avhengig av status på remodellering under metabolsk RCT kaskade.

Nøkkelenzymet som er involvert i RCT reaksionsveien er LCAT. LCAT blir produsert i hovedsak i leveren og sirkulerer i plasma assosiert med HDL fraksionen. LCAT konverterer celleavledet kolesterol til kolesterylestere som er avsondret i HDL bestemt for å fjernes. Kolesterylesteroverføringsprotein (CETPT) og fosfolipidoverførings-
5 protein (PLTP) bidrar til ytterligere remodullering av den sirkulerende HDL populasionen. CETP kan flytte kolesterylestere fremstilt av LCAT til andre lipoproteiner, spesielt ApoB-inneholdende lipoproteiner, slik som VLDL og LDL. PLTP tilfører lekitin til HDL. HDL triglyserider kan bli katabolisert ved ekstracellulær hepatisk triglyseridlipase, og lipoproteinkolesterol blir fjernet via leveren ved
10 forskjellige mekanismer.

Hver HDL partikkel inneholder minst en kopi (og vanligvis to til fire kopier) av ApoA-I. ApoA-I blir syntetisert i leveren og tynntarmen som preproapolipoprotein som sekreteres som et proprotein som blir raskt kuttet for å danne et modent polypeptid med
15 243 aminosyreresidier. ApoA-I består i hovedsak av 6 til 8 forskjellige 22 aminosyrerepeteringer med mellomrom med en linkerdel som ofte er prolin, og som i noen tilfeller består av en strekning av flere residier. ApoA-I danner tre typer av stabile komplekser med lipider: små, lipidfattige komplekser referert til som pre-beta-1 HDL; forflatede diskoidale partikler som inneholder polare lipider (fosfolipid og kolesterol)
20 referert til som pre-beta-2 HDL; og sfæriske partikler som inneholder både polare og ikke-polare lipider, referert til som sfæriske eller modent HDL (HDL_3 og HDL_2). De fleste HDL i en sirkulerende populasion inneholder både ApoA-I og ApoA-2 (det andre hoved HDL proteinet) og refereres til heri som AI/AII-HDL fraksionen til HDL. Imidlertid, inneholder fraksionen av HDL bare ApoA-I (referert til heri som AI-HDL
25 fraksion) som ser ut til å være mer effektiv i RCT. Visse epidemilogiske studier støtter hypotesen at AI-HDL fraksionen er anti-aterogenisk. (Parra et al., 1992, Arterioscler, Thromb. 12:701-707; Decossin et al., 1997, Eur. J. Clin. Invest. 27:299-307).

Skjønt mekansimen for kolesteroloverføring fra celleoverflaten (dvs., kolesteroleffluks)
30 er ukjent, tror man at det lipidfattige komplekset pre-beta-1 HDL er den foretrukne akseptoren for kolesteroloverføring fra perifert vev involvert i RCT. (Se Davidson et al., 1994, J. Biol. Chem. 269:2297-22982, Bielicki et al., 1992, J. Lipid Res. 33:1699-1709, Rothblat et al., 1992, J. Lipid Res. 33:1091-1097; og Kawano et al., 1993, Biochemistry 32:5025-5028; Kawano et al., 1997, Biochemistry 36:9816-9825). Under prosessen for
35 kolesterolrekruttering fra celleoverflaten, blir pre-beta-1 HDL rask konvertert til pre-beta-2 HDL. PLTP kan øke raten av pre-beta-2 skive (disc) dannelse, men data som indikerer en rolle for PLTP i RCT mangler. LCAT reagerer fortrinnsvis med diskoidal

og sfærisk HDL, som overfører 2-acylgrupper av lekitin eller andre fosfolipider til den frie hydroksylresidien av kolesterol for å danne kolesterylestere (bibeholdt i HDL) og lysolekitin. LCAT reaksionen krever ApoA-I som aktivator; dvs., ApoA-I er den naturlige kofaktoren for LCAT. Konversionen av kolesterol til dets ester avsondret i HDL hindrer reentring av kolesterolet inn i cellen, resultatet er at kolesterylestere er bestemt for å forflyttes. Kolesterylestere i modne HDL partikler i AI-HDL fraksionen (dvs., som inneholder ApoA-I og ingen ApoA-II) blir fjernet av leveren og prosessert inn til galle mer effektivt enn de som er avledet fra HDL som inneholder både ApoA-I og ApoA-II (AI/AII-HDL fraksionen). Dette kan delvis skyldes en mer effektiv binding av AI-HDL til hepatocyttmembranen. Det er en hypotese om eksistensen til HDL reseptoren, og nylig ble en renovasionsreseptor, SR-BI, identifisert som HDL reseptor (Acton et al., 1996, Science 271:518-520; Xu et al., 1997, J. Lipid Res. 38:1289-1298). SR-BI blir uttrykt mer hyppig i steroidogeniske vev (f.eks. binyrene), og i leveren (Landshulz et al., 1996, J. Clin.Invest. 98:984-995; Rigotti et al., 1996, J. Biol. Chem. 271:33545-33549).

CETP ser ikke ut til å spille noen hovedrolle i RCT og er i steden involvert i metabolismen av VLDL og LDL avleverte lipider. Imidlertid, endringer i CETP aktivitet eller dets akseptorer, VLDL og LDL, spiller en rolle i "remodellering" av HDL populasionen. For eksempel, i fravær av CETP, blir HDL forstørrede partikler som ikke klareres. (For enoversikt på RCT og HDL, se 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. Vasc. Biol. 17 (6) : 1053-1059).

2.3. NÅVÆRENDE BEHANDLINGSFORMER

Et antall av behandlinger er for tiden tilgjengelig for å senke serumkolesterol og triglyserider (se f.eks. Brown & Goldstein, supra). Imidlertid, det har sine ulemper og begrensninger når det gjelder effektivitet, bivirkninger og å kvalifisere pasientpopulasionen.

Gallesyre-bindingsresiner er en klasse av medikamenter som avbryter resyklus av gallesyrer fra tarmene til leveren; f.eks. kolestyramin (Questran Light®, Brustol-Myers Squibb) og kolestipolhydroklorid (Colestid®, The Upjohn Company). Når dette tas oralt, binder disse positivt ladede resinene seg til de negativt ladede gallesyrene i tarmen. Fordi resinene ikke kan absorberes fra tarmen, blir de ekskretert samtidig som de bærer

gallesyrene med seg. Anvendelse av slike resiner, senker bare serumkolesterolnivåene med omtrent 20% på sitt beste, og er assosiert med magetarmbivirkninger, inklusiv forstoppelse og visse vitaminmangler. Dessuten, siden resinene binder andre medikamenter, må andre orale medikamenter tas minst en time før eller fire til seks timer etter inntak av resinene; og kompliserer derfor hjertepasienters medikament-regime.

Statinene er kolesterolsenkende midler som blokkerer kolesterolsyntesen ved å inhibere HMGCoA-reduktase - nøkkelenzymet involvert i kolesterolbiosyntetisk reaksionsvei. Statinene, f.eks. lovastatin (Mevacor®, Merck & Co, Inc.) og pravastatin (Pravachol®, Bristol-Myers Squibb Co.) blir noen ganger brukt i kombinasion med gallesyre-bindingsresiner. Statiner reduserer signifikant serumkolesterol og LDL serumnivåene, og senker progressionen av koronarateroskerose. Imidlertid, blir serum HDL kolesterolnivåene bare moderat økt. Mekanismen for LDL senkningseffekt kan involvere både reduksion av VLD konsentrasionen og induksion av cellulær ekspresion av LDL reseptor, som fører til redusert produksion og/eller økt katabolisme av LDL. Bivirkninger, inklusiv lever og nyre dysfunksion er assosiert med anvendelse av disse medikamenter (Physicians Desk Reference, Medical Economics Co., Inc., Montvale, N.J., 1997). Nylig har FDA godkjent atorvastatin (en HMGCoA reduktaseinhibitor utviklet av Parke-Davis) (Warner Lambert) for markedet for å behandle sjeldne, men presserende tilfeller av familiær hyperkolesterolemi (1995, Scrip 20 (19) :10).

Niasin eller nikotinsyre, er et vannløselig vitamin B-kompleks brukt som et næringsmiddeltilskudd og antihyperlipidemisk middel. Niasin minsker produksionen av VLDL og er effektivt i å senke LDL. I noen tilfeller blir den brukt i kombinasion med gallesyre-bindingsresiner. Niasin kan øke HDL når den blir brukt i adekvate doser, imidlertid, er dens nytte begrenset av alvorlige bivirkninger når den blir brukt i slike høye doser.

Fibrater er en klasse lipidsenkende medikamenter brukt for å behandle forskjellige former av hyperlipidemi (dvs., forhøyet serum-triglyserider) som også kan bli assosiert med hyperkolesterolemi. Fribrater ser ut til å redusere ved VLDL fraksionen og øke noe HDL - imidlertid er effektene av disse medikamentene på serumkolesterol variable. I USA, har fibratene blitt godkjent for anvendelse som anti-lipidiske medikamenter, men har ikke nådd godkjennelse som hyperkolesterolemimidler. For eksempel er klofibrat (Atromid-S®, Wyeth-Ayerst Laboratories) et anti-lipidemisk middel som virker (via en ukjent mekanisme) til å senke serum-triglyserider ved å redusere VLDL fraksionen.

Skjønt serum-kolesterolen kan bli redusert i visse pasient subpopulasioner, er den biokjemiske responsen til medikamentet variabelt, og det er ikke alltid mulig å predikere hvilke pasienter som vil erverve gunstige resultater. Atromid-S® har ikke vist å være effektiv for å hindre koronar hjertesykdom. Den kjemiske og farmakologisk beslektede medikamenter gemfibrozil (Lopid®, Parke-Davis) er et lipidregulerende middel som moderat minsker serum-triglyserider og VLDL kolesterol, og moderat minsker HDL kolesterol. HDL_2 og HDL_3 subfraksioner såvel som både ApoA-I og A-II (dvs., AI/AII-HDL fraksionen). Imidlertid, er lipidresponsen heterogen, spesielt blant forskjellige pasientpopulasioner. Hindring av koronar hjertesykdom ble observert i mannlige pasienter mellom 40-55 uten noen historie eller symptomer av eksisterende hjertesykdom, er det dessuten ikke klart i hvilken grad disse funnene kan bli ekstrapolert til andre pasientpopulasioner (f.eks. kvinner, eldre og yngre menn). Ingen effekt ble observert i pasienter med etablert koronar hjertesykdom. Alvorlige bivirkninger er assosiert med anvendelse av fibrater inklusiv toksisitet slik som malignitet, (spesielt magetarmcancer), galleblæresykdom og økt insidens av ikke-koronar dødelighet. Disse medikamentene er ikke indikert for behanlding av pasienter med høyt LDL eller lavt HDL som eneste lipidabnormalitet (Physician's Desk Reference, 1997, Medical Economics Co., Inc. Montvale, N.J.).

Oral østrogenerstatningsterapi kan komme i betraktning for moderat hyperkolesterolemi hos kvinner som har nådd post-menopause. Imidlertid, kan økninger i HDL følges av en økning i trigylserider. Østrogenbehandling, er selvfølgelig, begrenset til en spesifikk pasientpopulasion (post-menopause kvinner) og er assosiert med alvorlige bivirkninger inklusivt induksion av malign neoplasmi, galleblæresykdom, tromboembolisk sykdom, hepatisk adenoma, økt blodtrykk, glukoseintoleranse og hyperkalsemi.

Derfor, er det et behov for å utvikle sikrere medikamenter som er effektive i å senke serumkolesterolet, øke HDL serumnivåene, å hindre koronar hjertesykdom, og/eller behandle eksisterende sykdom, spesielt aterosklerose.

2.4. ApoA-I SOM ET MÅL

Ingen av de nåværende tilgjengelige medikamentene for å senke kolesterol øker HDL nivåene på en sikker måte og stimulerer RCT - synes å operere på kolesterol-transportreaksionsveien, modellere næringsinntak, resirkulere, syntese av kolesterol, og VLDL populasioner.

Det er ønskelig å finne medikamenter som stimulerer kolesterolutstrømning og fjerning. Det eksisterer flere potensielle mål i RCT - f.eks. LCAT, HDL og dets forskjellige komponenter (ApoA-I, ApoA-II og fosfolipider), PLTP og CETP - og det er kjent hvilket mål som vil være mest effektivt i å oppnå ønskelig lipoproteinprofiler og beskyttende effekter. Forstyrrelse av enhver enkelt komponent i RCT reaksionsveien har innvirkning på sammensetning av sirkulerende lipoproteinpopulasioner, og effektiviteten på RCT.

Flere bevis er basert på data ervervet in vivo impliserer HDL og dets hovedprotein-komponent ApoA-I i å forhindre ateroskleroselesioner, og potensielt, regression av plakk - som gjør disse til attraktive mål for terapeutisk intervension. Det eksisterer en invers korrelasion mellom serum ApoA-I (HDL) konsentrasion og aterogenese hos mennesker (Gordon & Rifkind, 1989, N. Eng. J. Med. 321:1311-1316; Gordon et al., 1989, Circulation 79:8-15). Spesifikke subpopulasioner av HDL har blitt assosiert med en redusert risiko for aterosklerose hos mennesker (Miller, 1987, Amer. Heart 113:589-597; Cheung et al., 1991, Lipid Res. 32:383-394); Fruchart & Ailhaud, 1992, Clin, Chem. 38:79).

For det andre, dyrestudier støtter den beskyttende rolle til ApoA-I (HDL). Behandling av kolesterolfôrede kaniner med ApoA-I eller HDL reduserte utviklingen og progression av plakk (fettstreker), i kolesterolfôrede kaniner. (Koizumi et al., 1988, J. Lipid Res. 29:1405-1415; Badimon et al., 1989, Lab. Invest. 60:455-461; Badimon et al., 1990, J. Clin. Invest. 85:1234-1241). Imidlertid, varierte effektiviteten avhengig av kilden for HDL (Beitz et al., 1992, Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 47:149-152; Mezdour et al., 1995, Atherosclerosis 113:237-246).

For det tredje, ble direkte bevis for rollen til ApoA-I ervervet fra eksperimenter som involverte transgene dyr. Ekspresion av det humane genet for ApoA-I overført til mus genetisk predisponert for diett-indusert aterosklerose beskyttet mot utviklingen av aortiske lesioner (Rubin et al., 1991, Nature 353:265-267). ApoA-I transgene ble også vist å undertrykke aterosklerose i ApoE-mangelfulle mus og i Apo(a)-transgene mus (Paszty et al., 1994, J. Clin. Invest. 94:899-903; Plump et al., 1994, Proc, Natl. Acad. Sci. USA 91:9607-9611; Lieu et al., 1994, J. Lipid Res. 35:2263-2266). Lignende resultater ble observert i transgene kaniner som uttrykte humant ApoA-I (Duverger, 1996, Circulation 94:713-717; Duverger et al., 1996, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 16:1424-1429), og i transgene rotter hvor forhøyede nivåer av humant ApoA-I beskyttet mot aterosklerose og inhiberte restenose etter ballongangioplasti (Burkey et al., 1992,

Circulation, Supplement I, 86:I-472, Abstract No. 1876; Burkey et al., 1995, J. Lipid Res. 36:1463-1473).

AI-HDL ser ut til å være mer effektiv ved RCT enn AI/AII-HDL fraksionen. Studier med mus som er transgene for humant ApoA-I eller Apo-I og ApoA-II (AI/AII) viste at proteinsammensetningen av HDL signifikant innvirket på dets rolle, AI-HDL er mer anti-aterogenisk enn AI/AII-HDL (Schultz et al., 1993, Nature 365:762-764). Parallelle studier som involverer transgene mus som uttrykker humant LCAT gen viste at moderate økninger i LCAT aktivitet signifikant endret lipoproteinkolesterolnivåene, og at LCAT har en signifikant preferanse for HDL inneholdende ApoA-I (Francone et al., 1995, J. Clinic. Invest. 96:1440-1448; Berard et al., 1997, Nature Medicine 3 (7):744-749). Mens disse dataene støtter en signifikant rolle for ApoA-I i aktivering av LCAT og stimulerte RCT, viser andre studier mer komplisert scenario: en hovedkomponent av HDL som modullerer utstrømning av cellekolesterol er fosfolipider (Fournier et al., 1996, J. Lipid Res. 37:1704-1711).

I syn på den potensielle rollen til HDL, dvs. både ApoA-I og dets assosierte fosfolipid, i beskyttelsen mot aterosklerotisk sykdom, ble human kliniske utprøvninger som benytter rekombinant produsert ApoA-I nevnt, avbrutt og deretter innledet igjen ved UCB Belgia (Pharmaprosjekter, 27. oktober, 1995; IMS R&D Focus, 30. juni, 1997; Drug Status Update, 1997, Atherosclerosis 2 (6) :261-265), se også M. Eriksson at Congress, "The Role of HDL in Disease Prevention," 7.-9. nov., 1996, Fort Worth; Lacko & Miller, 1997, J. Lip. Res. 38:1267-1273; og WO94/13819) og ble startet og avbrutt av Bio-Tech (Pharmaprosjekter, 7. april 1989).Utprøvninger ble også utført ved å bruke ApoA-I for å behandle septisk sjokk (Opal, "Reconstituted HDL as a Treatment Strategy for Sepsis", IBC's 7th International conference on Sepsis, 28.-30. april, 1997, Washington, D.C.; Gouni et al., 1993, J. Lipid Res. 94:139-146; Levine, WO96/04916). Imidlertid er det mange fallgruver assosiert med produksionen og anvendelsen av ApoA-I, som gjør den mindre enn ideell som et medikament; f.eks. ApoA-I er et stort protein som er vanskelig og dyrt å produsere; signifikant fremstilling og reproduserbarhetsproblemer må overvinnes med hensyn på stabilitet under lagring, avlevering av et aktivt produkt og halveringstiden in vivo.

Med hensyn på disse ulempene, er det gjort forsøk for å fremstille peptider som etterligner ApoA-I. Siden nøkkelaktivitetene til ApoA-I har blitt tilskrevet tilstedeværelse av et unikt sekundært trekk i proteinet - en klasse A amfipatisk α-heliks (Segrest, 1974, FEBS Lett. 38:247-253) har mye anstrengelse for å designe peptider som

etterligner aktiviteten til ApoA-I vært fokusert på designe peptider som danner klasse A-type amfipatiske α-helikser.

Klasse A-type amfipatiske α-helikser er unike i at positivt ladede aminosyreresidier er satt sammen i den hydrofobe-hydrofile interfasen og negativt ladede aminosyreresidier er samlet i sentrum av den hydrofile fasen. Dessuten, har en klasse A α-helikspeptider en hydrofob vinkel på mindre enn 180° (Segrest et al., 1990 PROTEINS: Structure, Function and Genetics 8:103-117). De initielle de novo-strategier for å designe ApoA-I etterligninger ble ikke basert på primærsekvensen av naturlig forekommende apolipoproteiner, men heller på å inkorporere disse unike klasse A helikstrekkene i sekvenser fra peptidanalogene, såvel som noen av egenskapene til ApoA-I-domener (se f.eks. Davidson et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:13605-13610; Rogers et al., 1997, Biochemistry 36:288-300; Lins et al., 1993, Biochim. Biophys. Acta biomembranes 1151:137-142; Ji og Ionas, 1995, J. Biol. Chem. 270:11290-11297; Collet et al., 1997, Journal of Lipid Research, 38:634-644; Sparrow og Gotto, 1980, Ann. N.Y. Acad. Sci. 348-187-211; Sparrow og Gotto, 1982, 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; Minich et al., 192, 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; og Frank et al., 1997, Biochemistry 36:1798-1806).

I ett studie, syntetiserte Fukushima et al. en 22-residiepeptid sammensatt kun av Glu, Lys og Leu residier arrangert periodisk for å danne en amfipatisk α-heliks med like hydrofile og hydrofobe faser ("ELK peptid") (Fukushima et al., 1979, J. Amer. Chem. Soc. 101(13) :3703-3704; Fukushima et al., 1980, J. Biol. Chem. 255-10651-10657). ELK-peptidet deler 41% sekvenshomologi med 198-219 fragmentet til ApoA-I. Ved kvantitativ ultrafiltrering, gelpermieringskromatografi og sirkulær dikroisme, viste dette ELK-peptidet å effektivt assosiere med fosfolipider og etterlignet noen av de fysiske og kjemiske egenskapene til ApoA-I (Kaiser et al., 1983, Proc, Natl. Acad. Sci. USA 80:1137-1140; Kaiser et al., 1984, Science 223-249-255; Fukushima et al., 1980, supra; Nakagawa et al., 1985, J. Am. Chem. Soc. 107:7087-7092). Yokoyama et al. konkluderte fra slike studier at den viktige faktoren for LCAT aktivering er ganske enkelt tilstedeværelsen av en tilstrekkelig stor amfipatisk struktur (Yokoyama et al., 1980, J. Biol. Chem. 255(15):7333-7339). En dimer av dette 22-residiepeptidet ble senere funnet å nærmere ligne ApoA-I enn monomeren; basert på disse resultatene ble det foreslått at 44-meren, som finnes i midten av en heliks "breaker" (enten Gly eller Pro), representerte minimalfunksionsdomene i ApoA-I (Nakagawa et al., 1985, supra).

Et annet studie involverer modellamfipatiske peptider kalt "LAP-peptider" (Pownall et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (6) :3154-3158; Sparrow et al., 1981, *In:* Peptides: Sythesis-Structure-Function, Roch og Gross, Utg.., Pierce Chem. Co., Rockford, IL, 253-256). Basert på lipidbindingsstudier med fragmenter fra native apolipoproteiner, ble flere LAP-peptider designet, kalt LAP-16, LAP-20 og LAP-24 (som inneholder 16, 20 0g 24 aminosyreresidier, respektivt). Disse modellamfipatiske peptidene deler ingen sekvenshomologi med apolipoproteinet og ble designet til å ha hydrofile flater organisert på en måte som er ulikt klasse A-type amfipatiske helikse domener assosiert med apolipoproteiner (Segrest et al., 1992, J. Lipid Res. 33: 141-166). Fra disse studiene, konkluderte forfatterne at en minimallengde på 20 residier er nødvendig for å overføre lipidbindende egenskaper til modellamfipatiske peptider.

Studier med mutanter fra LAP20 som inneholder en prolinresidie i forskjellige posisioner i sekvensen, indikerte at et direkte forhold eksisterte mellom lipidbinding og LCAT aktivering, men at det heliske potensialet til et peptid alene ikke fører til LCAT aktivering (Ponsin et al., 1986 J. Biol. Chem. 261 (20): 9202-9205). Dessuten, tilstedeværelse av denne heliks "breaker" (Pro) er midten av peptidet redusert til dets affinitet for fosfolipidoverflater såvel som dets evne til å aktivere LCAT. Mens visse av disse LAP-peptidene viste seg å binde fosfolipider (Sparrow et al., supra), er det strid om til hvilken grad LAP-peptidene er heliske ved tilstedeværelse av lipider (Buchko et al., 1996, J. Biol. Chem. 271 (t) :3039-3045; Zhong et al., 1994, Peptide Reserach 7 (2) :99-106).

Segrest et al. har syntetisert peptider komponert av 18 til 24 aminosyreresidier som ikke deler sekvenshomologi med helikser fra ApoA-I (Kannelis et al., 1980, J. Biol. Chem. 255 (3) :11464-11472; Segrest et al., 1983, J. Biol. Chem. 258:2290-2295). Sekvensene ble spesifikt designet for å etterligne amfipatiske heliske domener av klasse A utbyttbare apolipoproteiner med hensyn på hydrofobisk moment (Eisenberg et al., 1982, Nature 299:371-374) og ladningsdistribuering (Segrest et al., 1990, Proteins 8:103-117; U.S. patent nr. 4.643.988). Ett 18-residiepeptid, var "18A"-peptidet som ble designet til å være en modell klasse-A α-heliks (Segrest et al., 1990, supra). Studier med disse peptidene og andre peptider som har en reversert ladningsdistribuering, som "18R"-peptidet, har konsekvent vist at ladningsdistribusion er kritisk for aktiviteten; peptider med en reversert ladningsdistribuering utviser forminsket lipidaffinitet relativ til 18A klasse-A etterligninger og et lavere helisk innhold ved tilstedeværelse av lipider (Kanellis et al., 1980,J. Biol. Chem. 255:11464-11472; Anantharamaiah et al., 1985, J. Biol. Chem. 260:10248-10255; Chung et al., 1985, J. Biol. Chem. 260:10256-10262;

Epand et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:9389-9396; Anantharamaiah et al., 1991, Adv. Exp. Med. Biol. 285:131-140).

Andre syntetiske peptider deler ingen sekvenshomologi med apolipoproteinet som har blitt foreslått med begrenset suksess inklusive dimerer og trimerer av 18A-peptidet (Anantharamaiah et al., 1986, Proteins of Biological Fluids 34:63-66), GALA og EALA-peptider (Subbarao et al., 1988, PROTEINS; Structure, Function and Genetics 3:187-198) og ID-peptider (Labeur et al., 1997, Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 17:580-588) og 18AM4-peptidet (Brasseur et al., 1993, Biochim. Biophys. Acta 1170:1-7).

Et "konsensus" peptid som inneholder 22-aminosyreresidier basert på sekvensen fra heliksene fra humant ApoA-I har også blitt designet (Anantharamaiah et al., 1990, Arteriosclerosis 10 (1) :95-105; Venkatachalapathi et al., 1991, Mol. Conformation and Biol. Interactions, Indian Acad. Sci. B:585-596). Sekvensen ble konstruert ved å identifisere den mest hyppige residien i hver posision av den hypotetiske heliksen til humant ApoA-I. Som de andre peptidene som er beskrevet over, har heliksene som er dannet ved dette peptidet positivt ladede aminosyreresidier satt sammen i den hydrofile-hydrofobe "interface", negativt ladede aminosyreresidier samlet i sentrum av den hydrofile flaten, og en hydrofobisk vinkel på mindre enn 180°. Mens en dimer av dette peptidet er effektiv i å inaktivere LCAT, utviser monomeren dårlig lipidbindings-egenskaper (Venkatachalapathi et al., 1991, supra).

Basert primært på in vitro studier med peptidene som er beskrevet over, har et sett av "regler" oppstått for å designe peptider som etterligner funskionen til ApoA-I. Siginifikant, tror man at en amfipatisk α-heliks som har positivt ladede residier samlet i den hydrofili-hydrofobe "interface" og negativt ladede aminosyrer samlet i sentrum av den hydrofobe flaten kreves for lipidaffinitet og LCAT aktivering (Venkatachalapathi et al., 1991, supra). Ananatharamaiah et al. har også indikert at negativt ladet Glu-residie i posision 13 på konsensus 22-mer-peptidet, som er posisionert inne i den hydrofobe flaten til α-heliksen, spiller en viktig rolle i LCAT aktivering (Anantharamaiah et al., 1991, supra). Dessuten har Brassseur indikert at en hydrofob vinkel (pho-vinkel) på mindre enn 180° kreves for optimal lipid-apolipoproteinkompleksstabilitet, og står også for dannelsen av diskoidale partikler som har peptider rundt kanten av lipidbilaget (Brasseur, 1991, J. Biol. Chem. 66 (24) :16120-16127). Rosseneu et al. har også insistert at en hydroforb vinkel på mindre enn 180°C kreves for LCAT aktivering.

Imidlertid, uansett disse "reglene" har ingen til dags dato designet eller produsert et peptid som er så aktivt som ApoA-I - det beste har mindre enn 40% av aktiviteten til ApoA-I målt ved LCAT aktiveringsanalyse beskrevet heri. Ingen av peptidene "etterlignerne" beskrevet i litteraturen har blitt vist å være nyttig som et medikament.

Med hensyn på det foregående, er det et behov for utvikling av en stabil ApoA-I agonist som etterligner aktiviteten til ApoA-I og som er relativt enkelt og kostnadseffektivt å produsere. Imidlertid, "reglene" for å designe effektiv ApoA-I etterligninger har ennå ikke blitt utredet og prinsippene for å designe organiske molekyler med funksionen til ApoA-I er ukjent.

3. SAMMENDRAG AV OPPFINNELSEN

Oppfinnelsen vedrører ApoA-I agonister som er i stand til å danne amfipatiske α-helikser som etterligner aktiviteten til ApoA-I, med spesifikke aktiviteter, dvs. enheter for aktivitet (aktivering av LCAT)/enheten av masse), som er tilnærmet eller som går utover den fra det native molekyl. Spesielt, er ApoA-I agonister fra oppfinnelsen peptider som: danner amfipatiske helikser (ved tilstedeværelse av lipider), binder lipider, danner pre-β-lignende eller HDL lignende komplekser, aktiverer LCAT, øker serumnivåene av HDL fraksioner, og fremmer kolesterolstrømning.

Oppfinnelsen er basert, delvis, på søkerens design og oppdagelse av peptider som etterligner funksionen til ApoA-I. Peptidene i følge oppfinnelsen ble designet basert på den antatte heliksstrukturen og de amfipatiske egenskapene til de 22 aminosyrekonsensus-sekvensene som var avledet fra heliksrepeteringene i ApoA-I. Overraskende, har peptidene i følge oppfinnelsen spesifikk aktivitet godt over de som er rapportert for ApoA-I-avledede peptider beskrevet i litteraturen. Noen av utførelsesformene fra oppfinnelsen viser 100% aktivitet i forhold til nativ ApoA-I, mens superagonistene beskrevet heri går utover den spesifikke aktiviteten til ApoA-I.

Foreliggende oppfinnelse omfatter en ApoA-I agonist, som er kjennetegnet ved at den utviser minst 38% LCAT-aktiveringsaktivitet sammenlignet med humant ApoA-I og består av:

(i) et peptid med 15 til 29 rester som danner en amfipatisk α-heliks ved tilstedeværelse av lipider og som omfatter den strukturelle formelen (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

eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvori:

X_1 er pro (P), Ala (A), Gly (G), Gln (Q), Asn (N), Asp (D) eller D-Pro (p);
X_2 er en alifatisk rest;
X_3 er Leu (L) eller Phe (F);
X_4 er Glu (E);
X_5 er en alifatisk rest;
X_6 er Leu (L) eller Phe (F);
X_7 er Glu (E) eller Leu (L);
X_8 er Asn (N) eller Gln (Q);
X_9 er Leu (L);
X_{10} er Leu (L), Trp (W) eller Gly (G);
X_{11} er en sur rest;
X_{12} er Arg (R);
X_{13} er Leu (L) eller Gly (G);
X_{14} er Leu (L); Phe (F) eller Gly (G);
X_{15} er Asp (D);
X_{16} er Ala (A);
X_{17} er Leu (L);
X_{18} er Asn (N) eller Gln (Q);
X_{19} er en basisk rest;
X_{20} er en basisk rest;
X_{21} er Leu (L);
X_{22} er en basisk rest;
X_{23} er fraværende eller en basisk rest;
Z_1 er H_2N- eller RC(O)NH.;
Z_2 er -C(O)NRR, -C(O)OR eller -C(O)OH eller et salt derav;

hver R er uavhengig -H, (C_1-C_6) alkyl, (C_1-C_6) alkenyl, (C_1-C_6) alkynyl, (C_5-C_{20}) aryl, (C_6-C_{26}) alkaryl, 5-20 leddet heteroaryl eller 6-26 leddet alkheteroaryl;

hver " - " mellom restene X_n betegner uavhengig en amidkopling, eller

(ii) en deletert form av den strukturelle formelen (I) som danner en amfipatisk α-heliks ved tilstedeværelse av lipider, hvori minst en og opp til åtte av restene 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} og X_{22} er deletert; eller

(iii) en endret form av den strukturelle formelen (I) som danner en amfipatisk α-heliks ved tilstedeværelse av lipider, hvori minst en av restene 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} eller X_{23} er konservativt substituert med en annen rest,

eller nært beslektede derivater med samme biologiske effekt.

Oppfinnelsen omfatter også en multimer ApoA-I agonist som er kjennetegnet ved, at den utviser minst 38% LCAT aktiveringsaktivitet sammenlignet med humant ApoA-I og som har den strukturelle formelen (II):

(II) $HH\ [LL_m\text{-}HH]_nLL_m\text{-}HH$

eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvori:

hver m er uavhengig et heltall fra 0 til 1;

n er et heltall fra 0 til 10;

hver "HH" er uavhengig et peptid ifølge krav 1;

hver "LL" er uavhengig en bifunksionell linker;

og

hver " - " betegner uavhengig en kovalent binding.

Videre omfatter oppfinnelsen en multimer ApoA-I agonist, kjennetegnet ved at den utviser minst 38% LCAT aktiveringsaktivitet sammenlignet med humant ApoA-I og har den strukturelle formelen (III):

(III) $X\text{-}N_{ya}\text{-}X_{(ya-1)}(N_{yb}\text{-}X_{(yb-1)})_p$

eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvori:

hver X er uavhengig HH-(LL_m–HH)$_n$ -LL_m–HH;

hver HH er uavhengig et peptid som tidligere nevnt;

hver LL er uavhengig en bifunksionell linker;

hver m er uavhengig et heltall fra 0 til 1;

hver n er uavhengig et heltall fra 0 til 8;

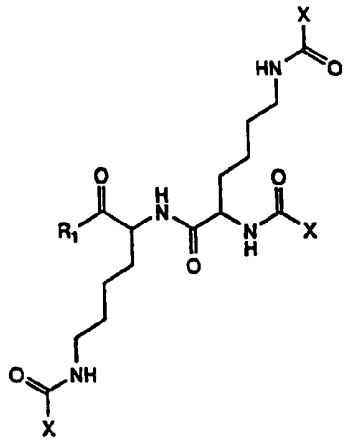
N_{ya} og N_{yb} er hver uavhengig en multifunksionell koplingsdel hvor y_a og y_b representerer antallet av funksionelle grupper på N_{ya} og N_{yb}, respektivt;

hver y_a eller y_b er uavhengig et heltall fra 3 til 8;

p er et heltall fra 0 til 7; og

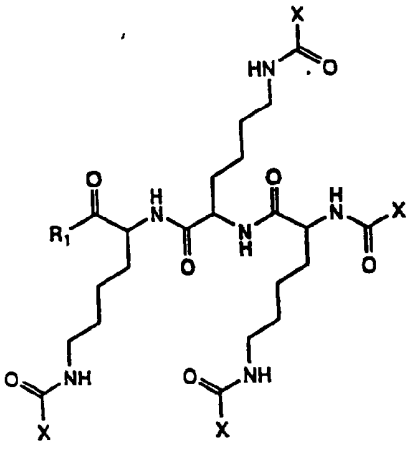
hver "–" betegner en uavhengig en kovalent binding.

Omfattet av oppfinnelsen er også Multimer ApoA-I agonist, kjennetegnet ved at den utviser minst 38% LCAT aktiveringsaktivitet sammenlignet med humant ApoA-I og har den strukturelle formelen (IV) eller (V):



(IV)

eller



(V)

eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvori:

hver X er uavhengig $HH(LL_m–HH)_nLL_m–HH$;

hver HH er uavhengig et peptid ifølge krav 1;

hver LL er uavhengig en bifunksionell linker;

hver n er uavhengig et heltall fra 0 til 1;

hver m er uavhengig et heltall fra 0 til 8;

R_1 er -OR eller -NRR; og

hver R er uavhengig -H, (C_1-C_6) alkyl, (C_1-C_6) alkenyl, (C_1-C_6) alkynyl; (C_5-C_{20}) aryl (C_6-C_{26}) alkaryl, 5-20 leddet heteroaryl eller 6-26 leddet alkheteroaryl.

Videre omfatter oppfinnelsen et ApoA-I agonist-lipidkompleks, som tilveiebringer en ApoA-I agonist og et lipid, hvori ApoA-I agonisten er et peptid som nevnt over, en multimer ApoA-I agonist ifølge krav 17, en multimer ApoA-I agonist i følge krav 18, eller en multimer ApoA-I agonist i følge det uselvstendige kravet 19, eller nært beslektede derivater med samme biologiske effekt.

Omfattet av oppfinnelsen er også en farmasøytisk sammensetning, som tilveiebringer en ApoA-I agonist og en farmasøytisk akseptabel bærer, eksipient eller diluent, hvori ApoA-I agonisten er et peptid som nevnt tidligere, en multimer ApoA-I agonist som nevnt over, en multimer ApoA-I agonist ifølge krav 18, eller en multimer ApoA-I agonist ifølge krav 19.

Til slutt omfatter oppfinnelsen en Apo-I agonist i følge krav 1 for behandling av en pasient som lider av en sykdom assosiert med dyslipidemi.

Oppfinnelsen blir illustrert ved arbeidseksempler som beskriver strukturen, fremstillingen og anvendelse av spesielle amfipatiske peptider som danner helikser (ved tilstedeværelse av lipider), binder lipider, danner komplekser og øker LCAT aktiviteten. Basert på strukturen og aktiviteten til de eksemplifiserte utførelsesformene, har søkerne tenkt ut et sett av "regler" som kan bli brukt for å designe endrede eller muterte former som også er innenfor rekkevidden av denne oppfinnelsen.

Oppfinnelsen vedrører som nevnt over farmasøytiske formuleringer som inneholder slike ApoA-I agonister (enten som peptider eller peptidlipidkomplekser) som det aktive ingrediens, og ApoA-1 for å behandle sykdommer assosiert med dyslipoproteinemi (f.eks., kardiovaskulære sykdommer, aterosklerose, metabolsk syndrom), restenose, eller endotoksemi (f.eks. septisk sjokk).

3.1. FORKORTELSER

Forkortelsene for de genetisk kodede L-enantiomere aminosyrene brukt heri er konvensionelle og som følger:

Aminosyre	En-bokstav symbol	Vanlig forkortelse
Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Asparaginsyre	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamin	Q	Gln
Glutaminsyre	E	Glu
Glysin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleukin	I	Ile
Leukin	L	Leu

Aminosyre	En-bokstav symbol	Vanlig forkortelse
Lysin	K	Lys
Metionin	M	Met
Fenylalinin	F	Phe

Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Treonin	T	Thr
Tryptofan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valine	V	Val

Forkortelsene brukt for D-enantiomerene av de genetisk kodede aminosyrene er "lower-case" ekvivalenter av en-bokstavsymbolene. For eksempel "R" betegnes L-arginin og "r" betegner D-arginin.

3.2 DEFINISIONER

Som brukt heri skal følgende betegnelser ha følgende meninger:

"Alkyl": referer seg til en mettet grenet rett kjede eller cyklisk hydrokarbonradikal.Typiske alkylgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til, metyl, etyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, *t*-butyl, pentyl, isopentyl, heksyl, og dets like. I foretrukne utførelsesformer, er alkylgruppene (C_1-C_6) alkyl.

"Alkenyl": refererer seg til en umettet forgrenet, rett kjede eller cyklisk hydrokarbonradikal som har minst ett karbon-karbon dobbelbinding. Radikalet kan være enten i *cis* eller *trans*-konformasion rundt dobbelbindingen(e). Typiske alkenylgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til, etenyl, propenyl, isopropenyl, butenyl, isobutenyl, *tert*-butenyl, pentenyl, heksenyl og dets like. I foretrukne utførelsesformer, er alkenylgruppen (C_1-C_6) alkenyl.

"Alkynyl": refererer seg til en umettet grenet, rett kjede eller cyklisk hydrokarbonradikal som har minst en karbon-karbon trippelbinding. Typiske alkenylgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til, etynyl, propynyl, butynyl, isobutynyl, pentynyl, hekytnyl og dets like. I foretrukne utførelsesformer er alkynylgruppen (C_1-C_6) alkynyl.

"Aryl": referer seg til en umetted cyklisk hydrokarbonradikal som har et konjugert π elektronsystem. Typiske arylgrupper inkluduerer, men er ikke begrenset til, penta-2,4-dien, fenyl, naftyl, antracyl, azulenyl, krysenyl, koronenyl, fluorantenyl, indacenyl, idenyl, ovalenyl, perylenyl, fenalenyl, fenantrenyl, pikenyl, pleiadenyl pyrenyl, pyrantrenyl, rubicenyl og dets like. I foretruknee utførelsesformer, er arylgruppen

(C_5-C_{20}) aryl, med (C_5-C_{20}) som fortrinnsvis foretrukket.

"Alkaryl": refererer seg til en rettkjedet alkyl, alkenyl eller alkynylgruppe hvori en av hydrogenatomene bundet til en terminal karbon blir erstattet med en aryldel. Typiske alkarylgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til, benzyl, benzyliden, benzylidyn, benzenobenzyl, naftenobenzyl og dets like. I foretrukne utførelsesformer, er alkarylgruppen (C_6-C_{26}) alkaryl, dvs., alkyl, alkenyl eller alkynyldel av alkarylgurppen er (C_1-C_6) og aryldelen er (C_5-C_{20}). I spesielt foretrukne utførelsesformer, er alkarylgruppen (C_6-C_{13}) alkaryl, dvs., alkyl, alkenyl eller alkynyldel fra alkarylgruppen er (C_1-C_3) og aryldelen er (C_5-C_{10}).

"Heteroaryl": refererer seg til en aryldel hvori en eller flere karbonatomer er erstattet med et annet atom, slik som N, P, O, S, As, Se, Si, Te, etc. Typiske heteroarylgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til akridarsin, akridin, arsantridin, arsindol, arsindolin, karbazol, β-karbolin, kromen, cinnolin, furan, imidazol, indazol, indol, indolizin, isoarsindol, isoarsinolin, isobenzofuran, isokromen, isoindol, isofosfoindol, isofosfinolin, isokvinolin, isotiazol, isoksazol, naftyridin, perimidin, fenantridin, fenantrolin, fenazin, fosfoindol, fosfinolin, ftalazin, fteridin, purin, pyran, pyrazin, pyrazol, pyridazin, pyridin, pyrimidin, pyrrol, pyrrolizin, kvinazolin, kvinolin, kvinolizin, kvinoksalin, selenofen, tellurofen, tiofen og xanten. I foretrukne utførelsesformer, er heteroarylgruppen en 5-20 leddet heteroaryl, med 5-10 leddet aryl som spesielt foretrukket.

"Alkheteroaryl": refererer seg til en rettkjedet alkyl, alkenyl eller alkynylgruppe hvor en av hydrogenatomene blir bundet til et terminalt karbonatom er erstattet med en heteroaryldel. I foretrukne utførelsesformer, er alkheteroarylgruppen 6-26 leddet alkheteroaryl, dvs., alkyl, alkenyl eller alkynyldel fra alkheteroaryl er (C_1-C_6) og heteroaryl er en 5-20 leddet heteroaryl. I spesielt foretrukne utførelsesformer, er alkheteroarylen 6-13 leddet alkheteroaryl, dvs., alkyl, alkenyl eller alkynyldelen er en 5-10 leddet heteroaryl.

"Substituert Alkyl, alkenyl, Alkynyl, Aryl, Alkaryl, Heteroary eller Alkheteroaryl": refererer seg til en alkyl, alkynyl, aryl, alkaryl, heteroaryl eller alkheteroarylgruppe hvori en eller flere hydrogenatomer er erstattet med andre substituenter. Foretrukkede substituenter inkluderer -OR, -SR, -NRR, -NO_2, -CN, halogen, -C(O)R, -C(O)OR og -C(O)NR, hvor hver R er uavhengig hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, alkaryl, heteroaryl eller alkheteroaryl.

4. KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

FIG. 1A er et Schiffer-Edmundson helikshjuldiagram av en idealisert amfipatisk α- heliks hvori åpne sirkler representerer hydrofile aminosyreresidier og skraverte sirkler representerer hydrofobe aminosyreresidier.

FIG. 1B er et heliksnettdiagram av den idealiserte amfipatiske heliksen i FIG. 1A.

FIG. 1C er et helikssylinderdiagram av den idealiserte amfipatiske heliksen i FIG. 1A.

FIG. 2A er et Schiffer-Edmundson helikshjuldiagram av kjernepeptidet i struktur (I) som illustrerer amfipatisitet til heliksen (åpne sirkler representerer hydrofile aminosyreresidier, skraverte sirkler representerer hydrofobe aminosyreresidier og delvis skraverte sirkler representerer enten hydrofile eller hydrofobe aminosyreresidier).

FIG. 2B er et heliksnettdiagram av kjernepeptider til struktur (I) som illustrerer en hydrofobe flaten av heliksen.

FIG. 2C er et heliksnettdiagram av kjernepeptidet fra struktur (I) som illustrerer den hydrofile flaten av heliksen.

FIG. 3A er et heliksnettdiagram som illustrerer den hydrofile flate av Segrest's konsensus 22-mer peptid (PVLDEFREKLNEELEALKQKLK; SEQ ID NO:75).

FIG. 3B er et heliksnettdiagram som illustrerer den hydrofile siden av eksempelkjernepeptidet **146** (PVLELFENLLERLLDALQKKLK; SEQ ID NO:146).

FIG. 4A er et heliksnettdiagram som illustrerer den hydrofobe siden av Segrest's konsensus 22-mer peptid (SEQ ID NO:75).

FIG. 4B er et heliksnettdiagram som illustrerer den hydrofobe siden av eksempelkjernepeptidet **146** (SEQ ID NO:146).

FIG. 5A er et Schiffer-Edmundson helikshjuldiagram av Segrest's konsensus 22-mer peptid (SEQ ID NO:75).

FIG. 5B er et Schiffer-Edmundson helikshjuldiagram av eksempelkjernepeptidet **146** (SEQ ID NO:146).

FIG. 6 er en computermodell av to **146** pepetider (SEQ ID NO:146) arrangert på en antiparallell måte hvori residiene Glu-7 og Gln-18 er uthevet for å illustrere evnen til disse to peptidene til å danne intermolekylære hydrogenbindinger når de er bundet til lipider.

FIG. 7A illustrerer en tertiær-ordensforgreningsnettverk av oppfinnelsen.

FIG. 7B illustrerer kvaternær-ordensforgreningsnettverk av oppfinnelsen.

FIG. 7C illustrerer et blandet ordensforgreningsnettverk av oppfinnelsen.

FIG. 7D illustrerer eksempel "Lys-tre" forgrenet nettverk av oppfinnelsen.

FIG. 8A er en graf som illustrerer forskjeller mellom observert Hα kjemiske skift og beregnet tilfeldig kveil Hα kjemiske skift for peptid **146** (SEQ ID NO:146) og Segrest's konsensus 22-mer peptid (SEQ ID NO: **75**).

FIG. 8B er en graf som illustrerer forskjellen mellom observert aminoprotonkjemiske skift og beregnet tilfeldig kveilamidprotonkjemisk skift for peptid **146** (SEQ ID NO:146) og Segrest's konsensus 22-mer peptid (SEQ ID NO:75).

FIG. 8C er en graf sammenlignet med den sekundære amidprotonkjemiske skift observert for peptid **146** (SEQ ID NO:146) (■) med den fra en idealisert α-heliks (θ) (i den idealiserte heliksen, er hydrofile residier representert som åpne sirkler, hydrofobe residier som skraverte sirkler).

FIG. 9 er en graf som illsutrerer lipoproteinprofilen til en kanin injisert med 8 mg/kg kroppsvekt av peptid **146** (SEQ ID NO:146) (i form av peptid/DPPC komplekser).

FIG. 10A er en figur som viser forskjellige aggregasionstilstander og peptid-lipidkomplekser som kan erverves med ApoA-I agonister fra oppfinnelsen. **Venstre:** Multimeriseringsprosessen av peptidet som er et resultat fra interaksionen fra flere peptidhelikser og fører til dannelse av oligomerer i tilstander av definert peptidkonsentrasion, pH og ionestyrke. **I midten:** Interaksionen av peptidene (i enhver av disse tilstandene av aggregasion) med lipidske enheter (slik som SUV) som fører til lipid reorganisering. **Til høyre:** Ved å bytte lipid-peptid molarratio, kan forskjellige typer av peptid-lipidkomplekser erverves, fra lipid-peptid "comicelles" ved lavlipid-peptid ratioer, til diskoidale partikler og til slutt til store multilamellære komplekser ved økende høyere lipid-lipidratioer.

FIG. 10B illustrerer den generelle aksepterte modellen for diskoidal peptid-lipidkomplekser dannet i et definert område av lipid-peptidratioene. Hvert peptid som omslutter skive (disc) kanten er i nær kontakt med sine to nærmeste naboer.

5. DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

ApoA-I agonister fra oppfinnelsen etterligner ApoAI funksionen og aktivitet. De danner amfipatiske helikser (ved tilstedeværelse av lipider), binder lipider, danner pre-β-lignende eller HDL lignende komplekser, aktiverer LCAT, øker serum HDL konsentrasionen og fremmer kolesterolutstrømning. Den biologiske funksionen til peptidene korrolerer med deres heliske struktur, eller konvertering til heliske strukturer i tilstedeværelse av lipider.

ApoA-I agonister fra oppfinnelsen kan bli fremstilt i stabile volum eller enhetsdose-former, f.eks. lyofiliserte produkter, som kan bli rekonstituert før anvendelse in vivo eller reformulert. Oppfinnelsen inkluderer de farmasøytiske formuleringene og disse kan anvendes i behandlingen av hyperlipidemi, hyperkolesterolemi, koronar hjertesykdom, aterosklerose, og andre tilstander slik som endotoksemi som forårsaker septisk sjokk.

Oppfinnelsen blir illustrert ved arbeidseksempler som demonstrerer at ApoA-I agonister fra oppfinnelsen er ekstremt effektive i å aktivere LCAT, og derved fremme RCT. Anvendelse av ApoA-I agonister fra oppfinnelsen in vivo i dyremodeller resulterer i en økning i serum HDL konsentrasionen.

Oppfinnelsen er fremsatt i mer detalj i avsnittene under, som beskriver: sammensetningen og strukturen til ApoA-I-peptidagonistene; strukturell og funksionell karakterisering; metoder for fremstilling av volum og enhetsdoseformuleringer; og metoder for anvendelse.

5.1. PEPTIDSTRUKTUR OG FUNKSION

Apo-A-I-agonister fra oppfinnelsen er generelt peptider eller analoger derav, som er i stand til å danne amfipatiske α-helikser ved tilstedeværelse av lipider og som etterligner aktiviteten til ApoA-I. Agonistene har som deres hovedtrekk et "kjerne" peptid sammensatt av 15 til 29 aminosyreresidier, fortrinnsvis 22 aminosyreresidier, eller en analog derav hvori minst en aminosyrekopling i peptidet er erstattet med et substituert amid, og isostere av en amid eller en amid-etterligning.

ApoA-I agonister fra oppfinnelsen er basert, delvis, på søkernes overraskende oppdagelse at ved å endre visse aminosyreresidier i primærsekvensen til 22-mer konsensussekvensen fra Venkatachalapathi et al., 1991, Mol. Conformation and Biol. Interactions, Indian Acad. Sci. B:585-596 (PVLDEFREKLNEELEALKQKLK; SEQ ID NO:75) som heretter blir kalt "Segrests konsensus 22-mer" eller "konsensus 22-mer") som man trodde var kritisk for aktivitetsutbytte for syntetiske peptider som utviser aktiviteter som tilnærmes, eller i noen utførelsesformer til og med overskrider, aktiviteten til nativt ApoA-I. Spesielt, har søkerne oppdaget at å erstatte tre ladede aminosyreresidier i Segrests konsensus 22-mer peptid (Glu-5, Lys-9 og Glu-13) med en hydrofob Leu-residie tilveiebringer peptider som etterligner de strukturelle og funksionelle egenskaper til ApoA-I til en grad som ikke tidligere er presentert innen fagfeltet.

Uten å være bundet til noen spesiell teori, tror man at heliksen dannet ved ApoA-I agonistene fra oppfinnelsen ligner mer de strukturelle og funksionelle egenskapene til de amfipatiske heliske regionene til nativt ApoA-I som er viktig for å virke inn på lipidbinding, kolesterolutstrømming og LCAT aktivering enn de α-heliks som er dannet

ved ApoA-I etterlignende peptider beskrevet i litteraturen, for derved å resultere i peptider som utviser signifikant høyere ApoA-I-lignende aktivitet enn de andre peptidene. Mens mange av ApoA-I agonistene fra oppfinnelsen tilnærmelsesvis, og i noen utførelsesformer faktisk går forbi, aktivitetene til ApoA-I, er det beste peptid til dags dato ApoA-I etterligneren som er beskrevet i litteraturen - peptid 18AM4. (EWLEAFYKKVLEKLKELF; SEQ ID NO: 246) (Corinjn et al., 1993, Biochim. Biophys. Acta 1170 :8-16; Labeur et al., Oct. 1994, Arteriosclerosis: Abstrakt nr. 186 og 187) og N-acetylert, C-amidert peptid 18AM4 (SEQ ID NO: 239) (Brasseur, 1993, Biochim. Biophys. Acta 1170 :1-7) - som utviser mindre enn 4% og 11% respektivt av aktiviteten til ApoA-I målt ved LCAT aktiveringsanalyse beskrevet heri.

I en illustrativ utførelsesform av oppfinnelsen, har kjernepeptidene (eller analoger derav) som utgjør ApoA-I agonistene fra oppfinnelsen følgende strukturelle formel (I):

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}

hvori:

X_1 er Pro (PI, Ala (A), Gly (G), Gln (Q), Asn (N), Asp (D) eller D-Pro (p);
X_2 er en alifatisk aminosyre;
X_3 er Ley (L) eller Phe (F);
X_4 er Glu (E);
X_5 er en alifatisk aminosyre;
X_6 er Leu (L) eller Phe (F);
X_7 er Glu (E) eller Leu (L);
X_8 er Asn (N) eller Gln (Q);
X_9 er Leu (L);
X_{10} er er Leu (L), Trp (W) eller Gly (G);
X_{11} er en sur aminosyre;
X_{12} er Arg (R);
X_{13} er Leu (L) eller Gly (G);
X_{14} er Leu (L), Phe (F) eller Gly (G);
X_{15} er Asp (D);
X_{16} er Ala (A);
X_{17} er Leu (L);
X_{18} er Asn (N) eller Gln (Q);
X_{19} er en basisk aminosyre;

X_{20} er en basisk aminosyre;

X_{21} er Leu (L); og

X_{22} er en basisk aminosyre.

Kjernepeptidene fra struktur (I) er definert delvis, på grunnlag av aminosyrer fra designerte klasser. Definisioner av forskjellige designerte klasser er tilveiebrakt "infra" sammen med beskrivelsen av muterte eller endrede utførelsesformer av struktur (I). I kjernepeptidene fra struktur (I) betegnes generelt symbolet "—" mellom aminosyreresidien X_n en hovedkjede konstitutiv koplingsfunksion. Derfor, representerer symbolet "—" vanligvis en peptidbinding eller amidkopling (-C(O)NH-). Det skal forstås, imidlertid, at den foreliggende oppfinnelse omfatter peptidanaloger hvori en eller flere aminokoplinger er valgfritt erstattet med en kopling som er en annen enn amid, fortrinnsvis en substituert amid eller en isoster av amid. Derfor, mens forskjellige X_n residier i struktur (I) generelt blir beskrevet på grunnlag av aminosyrene, og foretrukne utførelsesformer av oppfinnelsen er eksemplifisert ved peptider, vil en som kjenner fagfeltet gjenkjenne at i utførelsesformer som har ikke-amidbindinger, refererer betegnelsen "aminosyre" eller "residie" som brukt heri til andre bifunksionelle deler som bærer grupper lik i struktur til de sidekjedene fra aminosyrene.

Substituerte amider inkluderer generelt, men er ikke begrenset til, grupper av formelen -C(O)NR-, hvor R er (C_1-C_6) alkyl, substituert (C_1-C_6 alkyl, (C_1-C_6 alkenyl, substitutert (C_1-C_6) alkenyl, (C_1.C_6) alkynyl, substituert (C_1.C_6) alkynyl, (C_5.C_{20}) aryl, substituert (C_5-C_{20}) aryl, (C_6-C_{26}) alkaryl, substituert (C_6.C_{26}) alkaryl, 5-20 leddet heteroaryl, substituert 5-20 leddet heteroaryl eller 6-26 leddet alkheteroaryl og substituert 6.26 leddet alkheteroaryl.

Isosterer av amid inkluderer generelt, men er ikke begrenset til -CH_2NH-, -CH_2S-, -CH_2CH_2-, -CH=CH- (cis og trans), -C(O)CH_2-, -CH(OH)CH_2- og -CH_2SO-. Forbindelser som har slike ikke-amidkoplinger og metoder for fremstilling av slike forbindelser er vel kjent innen fagfeltet (se f.eks. Spatola, mars 1993, Vega Data Vol. 1, utg. 3; Spatola, 1983, "Peptide Backbone Modifications" *In*: Chemistry and Biochemistry of Amino Acids Peptides and Proteins, Weinstein, ed., Marcel Dekker, New York, s. 267 (generell oversikt); Morley, 1980, Trends Pharm. Sci. 1:463-468; Hudson et al., 1979, Int. J. Prot. Res. 14:177-185 (-CH_2NH-, -CH_2-CH_2-); spatola et al., 1986, Life Sci. 38:1243-1249 (-CH_2-S); Hann, 1982, J. Chem. Soc. Perking Trans. I. 1:307-314 (-CH=CH-, cis og rans); Almquist et al., 1980, J. Med. Chem. 23:1392-1398 (-$COCH_2$-); Jennings-White et al., Tetrahedron. Lett. 23:2533 (-$COCH_2$-): European

patentsøknad EP 45665 (1982) CA 97:39405 (-CH(O)CH_2-); Holladay et al., 1983, Tetrahedron Lett. 24:4401-4404 (-C(OH)CH_2-); og Hruby, 1982, Life Sci. 31:189-199 (-CH_2-S-).

I tillegg, kan en eller flere amidkoplinger bli erstattet med peptidoetterlignere eller amidetterligningsdeler som ikke signifikant interfererer med strukturen eller aktiviteten av peptidene. Egnet amidetterligningsdeler er beskrevet, for eksempel i Olson et al., 1993, J.Med. Chem. 36:3039-3049.

Et kritisk trekk av kjernepeptidene fra struktur (I), er deres evne til å danne en amfipatisk α-heliks med tilstedeværelse av lipider. Ved amfipatisk menes at α-heliks har motsatte hydrofile og hydrofobe sider og de er orientert langs sin lange akse, dvs., en side av heliks viser i hovedsak hydrofile sidekjeder mens den andre siden viser i hovedsak hydrofobe sidekjeder. FIG. 1A og 1B presenterer to illustrative figurer av de motstående hydrofile og hydrofobe sidene av en eksemplifisert idealisert amfipatisk α-heliks. FIG. 1A er en Schiffer-Edmundson helisk hjuldiagram (Schiffer og Edmundson, 1967, Biophys.J. 7:121-135). I hjulet, er den lange aksen til heliksen i loddrett stilling i forhold til siden. Ved å starte med den N-terminale enden, er suksessiv aminosyreresidier (representert ved sirkler) radialt distribuert omkring perimeteren til en sirkel ved 100° intervaller. Derfor, er aminosyreresidien n+1 posisionert 100° fra residie n, residie n+2 er posisionert 100° fra residie n+1 også videre. 100°'s plassering står for 3.6 aminosyreresidier pr vending som typisk blir observert i en idealisert α-heliks. I FIG. 1A, er de motstående hydrofile og hydrofobe sidene av heliksen tydelige: hydrofile aminosyrer er repsentert som åpne sirkler og hydrofobe aminosyreresidier er representert som skraverte sirkler.

FIG. 1B viser et helisk nettdiagram av idealisert amfipatisk heliks fra FIG. 1A. (Lim, 1979, FEBS Lett. 89:10-14). I et typisk helisk nettdiagram, blir α-heliks presentert som en sylinder som har blitt kuttet langs sentrum av sin hydrofile side og deretter flatet ut. Derfor, i sentrum av den hydrofobe siden, bestemt ved hydrofobisk moment av heliksen (Eisenberg et al., 1982, Nature 299:371-374), i sentrum av figuren og er orientert slik at den reises ut av planet på siden. En illustrasion av helisk sylinder forut for at den er blitt kuttet og flatet ut er vist i FIG. 1C. Ved å kutte sylinderen langs forskjellige plan, kan forskjellige fremvisninger av samme amfipatiske heliks observeres, og forskjellig informasion om egenskapene av heliksen erverves.

Den amfipatiske egenskapen til α-heliks dannet ved kjernepeptidene fra struktur (I) ved tilstedeværelse av lipider er illustrert i FIG. 2. FIG. 2A presenterer en Schiff-Edmundson helisk hjuldiagram, FIG. 2B presenterer et helisk nettdiagram som viser den hydrofobiske siden og FIG. 2C presenterer et helisk nettdiagram som viser den hydrofile siden. I hver av FIG. 2A, 2B og 2C er hydrofile residier representert som åpne sirkler, hydrofobe residier som skraverte sirkler, og residier som hverken er hydrofile eller hydrofobe som delvis skraverte sirkler. Som det vil bli diskutert mer grundig under i sammen med endrede eller muterte former av peptidene fra struktur (I), kan visse aminosyreresidier bli erstattet med andre aminosyreresidier slik at den hydrofile og hydrofobe siden av heliksen dannet av peptidene ikke kan dannes fullstendig av hydrofile og hydrofobe aminosyrer, respektivt. Derfor, må det forstås at når man refererer til amfipatisk α-heliks dannet av kjernepeptidene fra oppfinnelsen, refererer betegnelsen "hydrofil side" seg til en side av heliksen som har en generell netto hydrofil karakter. Betegnelsen "hydrofob side" refererer seg til en side av peptidet som har en generell netto hydrofob karakter.

Selv om man ikke har til hensikt å være bundet opp til noen spesiell teori, tror man at visse strukturelle og/eller fysiske egenskaper av den amfipatiske heliksen dannet ved kjernepeptidene fra struktur (I) er viktig for aktiviteten. Disse egenskapene inkluderer grad av amfifatisitet, generell hydrofobisitet, gjennomsnittshydrofobisitet, hydrofobiske og hydrofile vinkler, hydrofobisk moment, gjennomsnittshydrofobisk moment, og netto ladning av α-heliks.

Mens helisk hjuldiagrammene i FIG. 2A tilveiebringer en enkel måte å visualisere den amfipatiske egenskapen til kjernepeptidene i struktur (I), grad av amfifatisitet (grad av asymmetri fra hydrofobisitet) kan kvantifiseres ved å beregne hydrofobisk moment (μ_H) i heliksen. Metodene for å beregne μ_H for en spesiell peptidsekvens er vel kjent innen fagfeltet, og er beskrevet, for eksempel i Eisenberg, 1984, Ann. Rev. Biochem. 53:595-623. Det aktuelle μ_H ervervet for et spesielt peptid vil avhenge av det totale antallet av aminosyreresidier som omfatter peptidet. Derfor, er det ikke generelt informativt å direkte sammenligne μ_H peptider av forskjellige lengder.

Amfipatisiteten for peptider av forskjellige lengder kan direkte bli sammenlignet som gjennomsnittshydrofobisk moment ($<\mu_H>$). Gjennomsnittshydrofobisk moment kan erveves ved å dele μ_H ved antallet av residier i heliksen (dvs, $<\mu_H> = \mu_H/N$). Generelt, er kjernepeptidene som utviser en $<\mu_H>$ i området fra 0.45 til 0.65 bestemt ved å bruke normalisert konsensus hydrofobisitetsskala fra Eisenberg (Eisenberg, 1984, J.Mol. Biol.

179:125-142) betraktet å være innenfor området av den foreliggende oppfinnelsen, med en $<\mu_H>$ i området på 0.50 til 0.60 som foretrukket.

Den generelle eller totale hydrofobisiteten (H_o) av et peptid kan med enkelthet bli beregnet ved å ta den algebraiske sum av hydrofobisitetene fra hver aminosyre residiet i peptidet (f.eks., $H_o = \sum_{i=1}^{N} H_i$), hvor N er antallet aminosyreresidier i peptidet og H_i er hydrofobisiteten til *i*th aminosyreresidien). Gjennomsnittshydrofobisitet ($<H_o>$) er hydrofobisitetet delt med antallet med aminosyreresidier (dvs, $<H_o> = H_o/N$). Generelt, er kjernepeptider som utviser en gjennomsnittshydrofobisitet i området -0.050 til -0.070, bestemt ved å bruke normalisert konsensus hydrofobisitetsskala fra Eisenberg (Eisenberg, 1984, J. Mol. Biol. 179:125-142) betraktet å være innenfor området av den foreliggende oppfinnelsen med en gjennomsnittshydrofobisitet i området fra -0.030 til -0.055 som foretrukket.

Den totale hydrofobisiteten til den hydrofobiske siden (H_o^{pho}) til en amfipatisk heliks kan erverves ved å ta summen av hydrofobisitetene til de hydrofobe aminosyreresidiene som faller innenfor den hydrofobe vinkelen som definert under

dvs., (f.eks., $H_o^{pho} = \sum_{i-1}^{N} H_i$), hvor H_i er som tidligere definert og N_H er det totale antallet av hydrofobe aminosyrer i den hydrofobe siden). Gjennomsnittshydrofobisiteten til den hydrofobe siden ($<H_o^{pho}>$) er H_o^{pho}/N_H hvor N_H er som definert over. Generelt, er kjernepeptidene som utviser en $<H_o^{pho}>$ i området fra 0.90 til 1.2 som bestemt ved å bruke konsensus hydrofobisitetsskalaen til Eisenberg (Eisenberg, 1984, supra; Eisenberg et al., 1982, supra) betraktet å være innenfor området av den foreliggende oppfinnelsen med en $<H_o^{pho}>$ i området på 0.940 til 1.10 som foretrukket.

Den hydrofobe vinkel (pho-vinkel) er generelt definert som vinkelen eller buen som dekkes av det lengste kontinuerlige strekket av hydrofobe aminosyreresidier når peptidet er arrangert i Schiffer-Edmundson heliske hjul (dvs., antallet av kontinuerlig hydrofobe residier i hjulet multiplisert med 20°). Den hydrofile vinkel (phi-vinkel) er forskjellen mellom 360° og pho-vinkelen (dvs., 360°-pho-vinkelen). De som kjenner fagfeltet vil gjenkjenne at pho- og phi-vinkler vil avhenge av, delvis, av antallet av aminosyreresidier i peptidet. For eksempel, ved å referere til FIG. 5A og 5B, kan det

sees at bare 18 aminosyrer passer rundt en rotering i Schiffer-Edmundons heliks hjul. Færre aminosyrer gir et hull i hjulet; flere aminosyrer forårsaker visse posisioner i hjulet til å være fylt opp med mer enn en aminosyreresidie. I tilfellet av når peptidene inneholder mer enn 18 aminosyreresidier, slik som kjernepeptidene i struktur (I), er et "kontinuerlig" strekk av hydrofobe aminosyreresidier ment at minst en aminosyreresidie i posisionene langs hjulet okkupert av to eller flere aminosyrer er en hydrofob aminosyre. Derfor, med referanse til FIG. 5B er pho-vinkelen buen som er dekket av residiene 5, 16, 9, 2, 13, 6, 17, 10, 3 og 14 på tross av forekomsten av en hydrofil residie i posision 20 som residiet i posisjon 2 som fyller den samme posisionen på hjulet som residiet 20, er en hydrofob residie. Typisk, har kjernepeptidene en pho-vinkel i området fra 160° til 220° og er betraktet å være innenfor området av oppfinnelsen, med en pho-vinkel i området fra 180° til 200° som foretrukket.

Visse strukturelle og/eller fysiske karakteristika i kjernepeptidene fra struktur (I) er illustrert i FIG. 3 og 4. FIG. 3B presenterer et helisk nettdiagram av et eksempel-kjernepeptid fra oppfinnelsen, peptid **146** (PVLELFENLLERLLDALOKKLK; SEQ ID NO: 146), som illustrerer ladningsdistribueringen langs den hydrofile siden av heliksen. I FIG. 3B, har helikssylinderen blitt kuttet langs sentrum av den hydrofobe siden og flatet ut. De tre hydrofobe Leu (L) residiene som erstatter hydrofile residier i Segrest's konsensus 22-mer (FIG. 3A) er skravert. Som det kan sees i FIG. 3B, er positivt ladede aminosyreresidier samlet i den siste C-terminale dreiningen av heliksen (den C-terminale enden er øverst på siden). Ved ikke å være bundet til noen spesiell teori så tror man at denne samlingen av basiske residier i den C-terminale enden (residiene 19, 20 og 22) stabiliserer heliksen gjennom ladning (NH_3^+)-heliks dipol elektrostatisk interaksioner. Man tror også at stabiliseringen forekommer gjennom hydrofobe interaksioner mellom lysin sidekjeder og helikskjernen (se, Groebke et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:4025-4029; Esposito et al., 1997, Biopolymers 41:27-35).

Med unntak av den positivt ladede C-terminale samlingen, er negative ladninger distribuert på resten av den hydrofile siden, med minst en negativt ladet (sur) aminosyreresidie pr dreining, som resulterer i en kontinuerlig strekk av negative ladninger langs den hydrofile siden av heliksen. En positiv ladning er lokalisert ved residiet 12, som potensielt bidrar til heliksstabilitet ved å danne en saltbro med en syreresidie en dreining vekk fra heliksen.

FIG. 4B viser et helisk nettdiagram som illustrerer den hydrofobe siden av den amfipatiske heliksen dannet ved eksempelkjernepeptidet **146** (SEQ ID NO:146). I FIG.

4B, den heliske sylinderen kuttet langs sentrum av den hydrofile siden og flatet ut. Den hydrofobiske siden av kjernepeptidet består av to hydrofobiske residier pr dreining, med unntak av siste C-terminale drening, hvor basiske residier dominerer. NMR-studier indikerer at aminosyrene 3, 6, 9 og 10 fra denne kjernepeptiden danner en hydrofob samling der N-terminale ende av heliksen. Phe-6 er sentrert i denne samlingen og man tror at den spiller en viktig rolle i å stabilisere hydrofobisk samling.

Uten å være bundet av noen spesiell teori, tror man at den hydrofobe samlingen dannet ved residiene 3, 6, 9 og 10 er signifikant i å effektuere lipidbinding og LCAT aktivering. Amfipatiske peptider er forventet å binde fosfolipider ved å rekke ut deres hydrofobe sider mot alkylkjedene i lipiddelene. Derfor tror man at denne svært hydrofobe samlingen bidrar til sterke lipidaffiniteter observert for kjernepeptider fra oppfinnelsen. Siden lipidbinding er en forløper for LCAT aktivering, tror man at denne hydrofobe samlingen også er essensiell for LCAT aktivering.

Aromatiske residier er ofte funnet å være viktige i ankerpeptider og proteiner til lipider (De Kruijff, 1990, Biosci. Rep. 10:127-130; O'Neil og De Grado, 1990, Science 250:645-651; Bondelle et al., 1993, Biochim. Biophys. Acta 1202:331-336). Derfor tror man også at Phe-6, som er posisionert i sentrum av den hydrofobe samlingen, kan spille en nøkkelrolle i å forankre kjernepeptidene i struktur (I) til lipidene.

Interaksionene mellom kjernepeptidene fra oppfinnelsen og lipider fører til dannelse av peptid-lipidkomplekser. Som vist i FIG. 10A, avhenger type av kompleks som erverves (comiceller, skiver, vesikler eller multilag) av lipid: peptidmolarratio, med comiceller generelt dannet ved lavlipid: peptidmolarratio og diskiodale og vesikulære eller multilagskomplekser dannes med økning i lipid: peptidmolarratioer. Denne karakteristikk har blitt beskrevet for amfipatiske peptider (Epand, The Amphipathic Helix, 1993) og for ApoA-I (Iones, 1992, Structure and Function of Apolipoproteins, Kap.8, s. 217-250). Lipid: pepetidmolarratio bestemmer også størrelsen og sammensetning for kompleksene. (Se, avsnitt 5.3.1, *infra)*.

Den lange aksen av α-heliks dannet av kjernepeptidene fra struktur (I) har en generell buet form. I typiske amfipatiske helikser, er det blitt funnet at lengdene på hydrogenbindingene fra hydrofile og hydrofobe sider varierer slik at den hydrofobe siden i heliksen er konkav (Barlow og Thornton, 1988, 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). Uten å være bundet til noen teori, tror man at gjennomsnittskurven til den

hydrofobe siden av heliksen kan være viktig i binding i diskoidale komplekser, en buet heliks tillater peptidet til å "passe" bedre rundt kantene til diskoidale partikler, og derved øke stabiliteten til peptid-skivekomplekset.

I den generelt aksepterte strukturelle modellen til ApoA-I, er amfipatiske α-heliksen pakket rundt kanten til diskoidalt HDL (se, FIG. 10B). I denne modellen, antas det at heliksene blir oppstilt med deres hydrofobe sider pekende mot lipidacylkjedene (Brasseur et al., 1990, Biochim. Biophys. Acta 1043:245-252). Heliksene er arrangert på en antiparallell måte, og en kooperativ effekt mellom heliksene tror man bidrar til stabilitet av det diskoidale HDL komplekset (Brasseur et al., supra). Det er blitt foreslått at en faktor som bidrar til stabiliteten til HDL diskoidal kompleks er eksistensen av ioneinteraksioner mellom sure og basiske residier som resulterer i dannelse av intermolekylære saltbroer eller hydrogenbindinger mellom residier på ved siden av liggende antiparallelle helikser. I denne metoden, betraktes peptidene ikke bare ved en enkel enhet, men som en interaksion med minst to andre nabopeptidmolekyler (FIG. 10B).

Det er også generelt akseptert at intramolekylære hydrogenbinding eller saltbrodannelse mellom sure og basiske residier, respektivt, i posisionene i og i+3 i heliksen stabiliserer heliksstrukturen (Marqusee et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (24) :8898-8902).

Ytterligere nøkkeltrekk hos kjernepeptidene fra struktur (I) er deres evne til å danne intermolekylære hydrogenbindinger med hverandre når de er oppstillet på en antiparallell måte med deres hydrofobe sider pekende i samme retning, slik som vil være tilfelle når peptidene er bundet til lipidene (dvs., mellom sure residier i posisioner 4 og 7 og de basiske residiene i posisionen 19, 20 og 22), og også deres evne til å danne intramolekylære hydrogenbindinger eller saltbroer nær N- og C-terminal ende i heliksen.

Evnen til kjernepeptidene i struktur (I) til å danne intermolekylære hydrogenbindinger er vist i FIG. 6. I FIG. 6 er to ideelle α-helikser med eksempelkjernepeptidet **146** (SEQ ID NO:146) stilt opp på antiparallell måte med deres respektive hydrofobe sider pekende i samme retning (ut av planet på siden). H-bindingsinteraksioner kan oppstå mellom residiene E-7 og Q-18 (Huyghues-Despointes et al., 1995, Biochemistry 34(42) :13267-13271).

Dessuten, når den blir arrangert på denne antiparallelle måten, er heliksene tett pakket; det er ingen sterisk hindring som forhindrer nær kontakt mellom heliksene. Endringer i sekvensene til kjernepeptidene som affiserer pakkingen av heliksene negativt influerer aktiviteten av kjernepeptidene.

Uten å være bundet til noen spesiell teori, tror man at evnen til kjernepeptidene fra struktur (I) til å tett pakke og ionisk interagere for å danne intra- og/eller inter-molekylære saltbroer og/eller hydrogenbindinger når det er bundet til lipider på en antiparallell måte er et viktig trekk for kjernepeptidet fra oppfinnelsen.

Evnen til kjernepeptidene til å danne foretrukne intramolekylære peptid-peptid interaksioner tror man også er av relevans i fravær av lipider. Kjernepeptidene fra oppfinnelsen er selv-assosierte, delvis på grunn av deres høye $<\mu_H>$, $<H_0>$, og hydrofobe vinkel (se, TABELL I, *infra*). Selv-assosieringsfenomenet avhenger av pH-betingelsene, peptidkonsentrasionen og ionestyrken, og kan resultere i flere nivåer av assosiering, fra monomerer til fler-multimere former (FIG. 10A). Den hydrofobe kjernen av peptidaggregater foretrekker hydrofobiske interaksioner med lipider. Evnen til peptider til å aggregere selv ved svært lave konsentrasioner kan favoriseres deres binding til lipidene. Man tror at i kjernen av peptidaggregatene forekommer peptid-peptid interaksioner og kan konkurrere med lipid-peptid interaksionene.

I tillegg til de ovenfor beskrevne egenskapene, tror man at andre parameter er viktig for aktiviteten, inklusiv det totale antallet av hydrofobe residier, det totale antallet av ladede residier, og nettoladningen av peptiden.

En oversiktig over de fysiske og strukturelle egenskapene til kjernepeptidene i struktur (I) er tilveiebrakt i TABELL I, under:

TABELL 1

FYSISKE EGENSKAPER AV FORETRUKKET

ApoA-I AGONISTER FRA STRUKTUR (i)

Egenskap	Området	Foretrukket område
% hydrofobe aminosyrer	40-70	50-60
$<H_o>$	-0.050 til -0.070	-0.030 til 0.055
$<H_o^{pho}>$	0.90 - 1.2	0.94 - 1.1
$<\mu_H>$	0.45 - 0.65	0.50 - 0.60
pho vinkel	160° - 220°	180° - 200°
# positivt ladede aminosyrer	3 - 5	4
# negativt ladede aminosyrer	3 - 5	4

netto ladning	-1 til +1	0
hydrofob samling	posisionene 3, 6, 9, 10 er hydrofobe aminosyrer	
sur samling	minst 1 sur aminosyre pr dreining med unntak av minst 5 C-terminale aminosyrer	
basisk samling	minst 3 basiske aminosyrer i minst 5 C-terminale aminosyrer	

Egenskapene til amfipatiske α-helikser dannes av kjernepeptidene fra oppfinnelsen er signifikant forskjellig fra egenskapene til klasse A amfipatisk α-helikser, spesielt klasse A α-heliksen til Segrest's konsensus 22-mer. Disse forskjellene er illustrert med eksempelkjernepeptidet **146** (SEQ ID NO: 146) i FIG. 3-5.

Ved å referere til FIG. 4A og 4B kan det sees at den hydrofobe siden til peptid **146** har mye større hydrofobisk karakter enn den hydrofobe siden til Segrest's konsensus 22-mer. Spesielt, residie 5, 9 og 13 (skravert region i FIG. 4B) er hydrofobe Leu (L) residier i peptid **146** (SEQ ID NO: 146) sammenlignet med ladede residier i konsensus 22-mer (SEQ ID NO:75). Erstatning av disse tre ladede residiene i Segrest's konsensus 22-mer med hydrofobisk Leu (L) residier fører til signifikante forskjeller i amfifatisitet, hydrofobisitet, pho-vinkel og andre egenskaper i heliksen.

Sammenligning av fysisk og strukturelle egenskaper hos peptid **146** (SEQ ID NO: 146) og Segrest's konsensus 22-mer (SEQ ID NO:75) er tilveiebrakt i TABELL I, under:

TABELL II

SAMMENLIGNING AV EGENSKAPER AV EKSEMPELKJERNEPEPTID 146 (SEQ ID NO:146) MED SEGREST'S KONSENSUS 22-MER (SEQ ID NO:75)

Egenskap	Konsensus 22-mer	Peptid 146
# aminosyrer	22	22
# hydrofile aminosyrer	13	10
# hydrofobe aminosyrer	9	12
% hydrofobe aminosyrer	41	55
$<H_o>$	-0.293	-0.013
$<H_o^{pho}>$	0.960	0.990
$<\mu_H>$	0.425	0.577
pho-vinkel	100°	200°

# positivt ladede aminosyrer	5	4
# negativt ladede aminosyrer	6	4
netto ladning	-1	0

Verdt å merke seg, er at kjernepeptidene fra struktur (I) er sammensatt av større prosentdel hydrofobe residier, og har en signifikant større $<H_o>$ og $<\mu_H>$ og har en to-ganger større pho-vinkel enn Segrest's konsensus 22-mer (se FIG. 5A og 5B). Disse forskjeller i egenskaper fører til signifikante forskjeller i aktivitet. Mens Segrest's konsensus 22-mer (SEQ ID NO:75) utviser bare 10% LCAT aktivering sammenlignet med nativt ApoA-I i analysene beskrevet heri, utviser peptid **146** (SEQ ID NO:146) 86% aktivering sammenlignet med nativt ApoA-I i samme analyser. Peptid **144** (PVLELFENLLERLLDALQKKLK; (SEQ ID NO:144) some r forskjellig fra peptid **146** (SEQ ID NO:146) bare ved D-Pro (p) i posision X_1, utviser 111% LCAT aktivitet sammenlignet med nativt ApoA-I i samme analyser.

Visse amnosyreresidier i kjernepeptidene til struktur (I) kan erstattes med andre aminosyreresidier uten signifikant å ha innvirkning på og i mange tilfeller til og med øker, aktivitetene av peptidene. Derfor, inneholder også foreliggende oppfinnelse endret eller muterte former av kjernepeptidene fra struktur (I) hvori minst en definert aminosyreresidie i strukturen er substituert med en annen aminosyreresidie. Siden man tror at en av de kritiske trekkene som har innvirkning på aktiviteten til kjernepeptidene fra oppfinnelsen er deres evne til å danne α-helikser ved tilstedeværelse av lipider som utviser amfipatiske eller andre egenskaper beskrevet over, skal igjenkjennes at i foretrukne utførelsesformer fra oppfinnelsen, er aminosyresubstitusionene konservative, dvs., erstatning av aminosyreresidier har fysiske og kjemiske egenskaper som er lik den aminosyreresidien som er erstattet.

Med formål å bestemme konservative aminosyresubstitusioner, kan aminosyrer med letthet klassifiseres i to hovedkategorier - hydrofile og hydrofobe - avhengig av primært deres fysisk-kjemiske karakteristika av aminosyrekjeden. Disse to hovedkategorier kan ytterligere bli klassifisert i sub-kategorier som mer distinkt definerer karaktistika til aminosyresidekjedene. For eksempel, klassen av hydrofile aminosyrer kan ytterligere bli delt inn i sure, basiske eller polare aminosyrer. Klassen av hydrofobe aminosyrer kan ytterligere bli delt inn i apolare og aromatiske aminosyrer. Definisionene av forskjellige kategorier aminosyrer som definerer struktur (I) er som følger:

"Hydrofile aminosyrer" refererer seg til en aminosyre som utviser en hydrofobisitet på mindre enn null ifølge den normaliserte konsensushydrofobisitetsskalaen til Eisenberg et al., 1984, J. Mol. Biol. 179:125-142. Genetisk kodede hydrofile aminosyrer inkluderer Thr (T), Ser (S), His (H), Glu (E), Asn (N), Gln (Q), Asp (D), Lys (K) og Arg (R).

"Sure aminosyrer" refererer seg til en hydrofil aminosyre som har en sidekjede pK-verdi på mindre enn 7. Sure aminosyrer har typisk negativt ladede sidekjeder ved fysiologisk pH på grunn av tap av et hydrogenion. Genetiske kodede aminosyrer inkluderer Glu (E) og Asp (D).

"Basiske aminosyrer" refererer seg til en hydrofil aminosyre som har en sidekjede pK-verdi som er større enn 7. Basiske aminosyrer har typisk positivt ladede sidekjeder ved fysiologisk pH som skyldes assosiasion med hydroniumion. Genetisk kodede basiske aminosyrer inkluderer His (H), Arg (R) og Lys (K).

"Polare aminosyrer" refererer seg til en hydrofil aminosyre som har en sidekjede som er uladet ved fysiologisk pH, men som har minst en binding hvori paret av elektroner delt med to atomer holdes nærmere av en av atomene. Genetisk kodede polare aminosyrer inkluderer Asn (N), Gln (Q), Ser (S) og Thr (T).

"Hydrofobe aminosyrer" refererer seg til en aminosyre som utviser en hydrofobisitet som er større enn null ifølge normalisert konsensus hydrofobisitetskalaen til Eisenberg, 1984, J. Mol. Biol. 179:125-142. Genetisk kodede hydrofobe aminosyrer inkluderer Pro (P), Ile (I), Phe (F), Val (V), Leu (L), Trp (W), Met (M), Ala (A), Gly (G) og Tyr (Y).

"Aromatiske aminosyrer" refererer seg til en hydrofob aminosyre som har en sidekjede som har minst en aromatisk eller heteroaromatisk ring. Aromatiske eller heteroaromtisk ring kan inneholde en eller flere substituenter slik som -OH, -SH, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -NO_2, -NO, -NH_2, -NHR, -NRR, -C(O)R, -C(O)OH, -C(O)OR, -$C(O)NH_2$, -C(O)NHR, -C(O)NRR og det like hvor hver R er uavhengig (C_1-C_6) alkyl, substituert (C_1-C_6) alkyl, (C_1-C_6) alkenyl, substituert (C_1-C_6) alkenyl, (C_1-C_6) alkynyl, substituert (C_1-C_6) alkynyl, (C_5-C_{20}) aryl, substituert (C_5.C_{20}) aryl, (C_6.C_{26} alkaryl, substituert (C_6-C_{26}) alkaryl, 5-20 leddet heteroaryl, substituert 5-20 leddet heteroaryl, 6-26 leddet alkheteroaryl eller substituert 6-26 leddet alkheteroaryl. Genetisk kodede aromatiske aminosyrer inkluderer Phe (F), Tyr (Y) og Trp (W).

"Ikke-polar aminosyre" refererer seg til en hydrofob aminosyre som har en sidekjede som er uladet ved fysiologisk pH og som har bindinger hvori paret av elektroner som deles felles mellom to atomer generelt blir holdt likt for hvert av de to atomene (dvs., sidekjeden er ikke polar). Genetisk kodede apolare aminosyrer inkluderer Leu (L), Val (V), Ile (I), Met (M), Gly (G) og Ala (A).

"Alifatisk aminosyre" refererer seg til en hydrofob aminosyre som har en alifatisk hydrokarbon sidekjede. Genetisk kodede alifatiske aminosyrer inkluderer Ala (A), Val (V), Leu (L) og Ile (I).

Aminosyreresidien Cys (C) er uvanlig, idet den kan danne disulfidbroer med andre Cys (C) residier eller andre sulfanyl-inneholdende aminosyrer. Evnen til Cys (C) redisier og andre aminosyrer med -SH-inneholdende sidekjeder til å være i et peptid i enten redusert fri -SH eller oksidert disulfidbroform innvirker på enten Cys (C) residier og bidrar til netto hydrofob eller hydrofil egenskap til et peptid. Mens Cys (C) utviser en hydrofobisitet på 0.29 i forhold til normalisert konsensusskala av Eisenberg (Eisenberg, 1984, supra), det skal ikke forstås slik at formålet med den foreliggende oppfinnelse er at Cys (C) blir kategoriseres som polar hydrofil aminosyre, som ikke står i forhold til de generelle klassifikasioner som er definert over.

De som kjenner fagfeltet vil forstå at de ovenfor definerte kategoriene ikke gjensidig er utelukkende. Derfor kan aminosyrer som har sidekjeder som utviser to eller flere fysisk-kjemiske egenskaper bli inkludert i flere kategorier. For eksempel, aminosyresidekjeder som har aromatiske deler som er ytterligere substituert med polare substituenter, slik som Tyr (Y), kan utvise både aromatisk hydrofobiske egenskaper og polare eller hydrofile egenskaper, og kan derfor bli inkludert i både den aromatiske og polare kategorien. Den egnede kategoriseringen av enhver aminosyre vil være tydelig for de som kjenner fagfeltet, spesielt i lys av detaljerte beskrivelsen som er tilveiebrakt heri.

Visse aminosyreresidier, kalt "heliksbryter" aminosyrer har den egenskapen å avbryte strukturen til α-heliksene når de finnes i interne posisioner inne i heliksen. Aminosyreresidier som utviser slike heliksbryteregenskaper er vel kjent innen fagfeltet (se f.eks. Chou og Fasman, Ann. Rev. Biochem. 47:251-276) og inkluderer Pro (P), Gly (G) og potensielt alle D-aminosyrer når de finnes i et L-peptid; motsatt, L-aminosyrer bryter heliksstrukturen når de finnes i et D-peptid). Mens disse heliksbrytende aminosyreresidier faller i kategoriene som er definert over, med unntak av Gly (G) (diskutert infra), skulle disse residiene ikke bli brukt for å substituere aminosyreresidier

i interne posisioner innen heliksen - de skulle bare bli brukt for å substituere 1-3 aminosyreresidier i den N-terminale og/eller C-terminale enden av peptidet.

Mens de ovenfor definerte kategoriene har blitt eksemplifisert i form genetisk kodede aminosyrer, trenger ikke aminosyresubstitusionene å være, og i visse utførelsesformer er de ikke, begrenset til genetisk kodede aminosyrer. Mange av de foretrukne peptidene i struktur (I) inneholder genetisk ikke-kodede aminosyrer. Derfor, i tillegg til naturlig forekomne genetisk kodede aminosyrer, kan aminosyreresidiene i kjernepeptidene til struktur (I) bli substituert med naturlig forekomne ikke-kodede aminosyrer og syntetiske aminosyrer.

Visse vanlige aminosyrer som tilveiebringer nyttige substitusioner for kjernepeptidene fra struktur (I) inkluderer, men er ikke begrenset til, β-alanin (β-Ala) og andre omega-aminosyrer slik som 3-aminopropionsyre, 2,3-diaminopropionsyre (Dpr), 4-aminobutyrinsyre også videre; α-aminoisobutyrinsyre (Aib); ε-aminoheksanoinsyre (Aha); δ-aminovalerinsyre (Ava); N-metylglysin eller sarkosin (MeGly); ornitin (Orn); citrullin (Cit); t-butylalanin (t-BuA); t-butylglysin (t-BuG); N-metylisoleucin (MeIle); fenylglysin (Phg); cykloheksylalanin (Cha); norleucin (Nle); naftylalanin (Nal); 4-klorofenylalanin (Phe(4Cl)); 2-fluorofenylalanin (Phe(2-F)); 3-fluorofenylalanin (Phe(3-F)); 4-fluorofenylalanin (Phe(4-F)); penicillamin (Pen); 1,2,3,4-tetrahydroiskvinolin-3-karboksylsyre (Tic); β-2-tienylalanin (Thi); metioninsulfoksid (MS=); homoarginin (hArg); N-acetyllysin (AcLys); 2,4-diaminobutyrinsyre (Dbu); 2,3-diaminobutyrinsyre (Dab); *p*-aminofenylalanin (Phe(*p*NH_2)); N-metylvalin (MeVal); homocystein (hCys), homofenylalanin (hPhe) og homoserin (hSer); hydroksyprolin YHypI, homoprolin (hPro), N-metylerte aminosyrer og peptioder (N-substituerte glysiner).

Klassifiseringene av de genetiske kodede og vanlige ikke-kodede aminosyrer ifølge kategoriene definert over er summert i TABELL III under. Det skal forstås at TABELL III er kun for å illustrere formålet og ikke å være en utfyllende liste av aminosyreresidier som kan bli brukt for å substituere kjernepeptidene beskrevet heri. Andre aminosyreresidier som ikke spesifikt er nevnt heri kan lett bli kategorisert basert på deres observerte fysiske og kjemiske egenskaper i lys av definisionene tilveiebrakt heri.

TABELL III

KLASSIFISERING AV VANLIGE ANVENDTE AMINOSYRER

Klassifisering	Genetisk kodede	Ikke-genetisk kodede
Hydrofobe		
Aromatiske	F, Y, W	Phg, Nal, Thi, Tic, Phe(4-Cl), Phe(2-F), Phe(3-F), Phe(4-F), hPhe
Apolare	L, V, I, M, G, A, P	t-BuA, t-BuG, MeIle, Nle, MeVal, Cha, McGly, Aib
Alifatiske	A, V, L, I	b-Ala, Dpr, Aıb, Aha, MeGly, t-BuA, t-Bug, MeIle, Cha, Nle, MeVal
Hydrofile		
Sure	D, E	
Basiske	H, K, R	Dpr, Orn, hArg, Phe(*p*-NH), Dbu, Dab
Polare	C, Q, N, S, T	Cit, AcLys,MSO, bAla, hSer
Heliks-brytere	P, G	D-Pro og andre D-aminosyrer (i L-peptider)

I de fleste tilfellen, vil aminosyrene fra kjernepeptidene fra struktur (I) bli substituert med L-enantiomere aminosyrer, substitusionene er ikke begrenset til L-enantiomere aminosyrer. Derfor, er også inkludert i definisionene til "mutert" eller "endret" former er de situasjoenne hvor minst en L-aminosyre er erstattet med en identisk D-aminosyre (f.eks., L-Arg → D-Arg) eller med en D-aminosyre av samme kategori eller subkategori (f.eks. L-arg → D-Lys), og vise versa. I vissse former som er egnet for oral administrering til dyreindivider, kan peptidet med fordel bli sammensatt av minst en D-enantiomer aminosyre. Peptidene som inneholder slike D-aminosyrer tror man er mer stabile mot degradering i munnhulen, tarmene eller serum enn peptider sammensatt kun av L-aminosyrer

Som nevnt over, har D-aminosyrer en tendens til å bryte strukturen til α-helikser når de finnes i interne posisioner til en α-heliks L-peptid. Videre, er det blitt observert at visse muterte former av kjernepeptidene til struktur (I) som er sammensatt kun av D-aminosyrer utviser signifikant lavere LCAT aktivering i analysen beskrevet heri enn identiske peptider sammensatt kun av L-aminosyrer. Som en konsekvens, skulle D-aminosyrer ikke bli brukt til å substituere interne L-aminosyrer; D-aminosyresubstitu-

sioner skulle bli begrenset to 1-3 aminosyreresidier i den N-terminale og/eller C-terminale ende av peptidet.

Som tidligere diskutert, virker aminosyrer Gly (G) generelt som en heliks-bryterresidie når den finnes i interne posisioner på et peptid. Nokså overraskende, har oppfinnerne oppdaget at når heliksstrukturen til kjernepeptidene fra oppfinnelsen blir brutt i fravær av lipider når interne aminosyreresidier er substituert med Gly (G) ved tilstedeværelse av lipider vil slike Gly (G) inneholdende peptider utvise signifikant helikssstruktur, såvel som aktivitet. For eksempel, mens peptid **154** (PVLELFENLLERGLDALQKKLK; SEQ ID NOR: 154) utviser bare 13% heliksstruktur i buffer, ble 76% heliksstruktur observert ved tilstedeværelse av miceller. Det skal bemerkes, at flere kjernepeptider som inneholder intern Gly (G) residier utviser ≥38% LCAT aktivering. Skjønt, selv om Gly (G) generelt blir betraktet å være en heliks-brytende residie, kan Gly (G) bli brukt til å substituere aminosyrer i interne posisioner til kjernepeptidene med struktur (I). Fortrinnsvis, bare interne residier posisionert innenfor omtrent ± 1 heliksvridning av sentrum av peptidet (spesielt for peptider sammensatt av like antall av aminosyrer) blir substituert med Gly (G). I tillegg, er det foretrukket at bare en intern aminosyrereside i peptidet kan blir substituert med Gly (G). Foretrukkede utførelsesformer av ApoA-I agonister fra oppfinnelsen som inneholder interne glysiner er beskrevet i avsnitt 5.1.2, infra.

Ved å bruke aminosyreresidieklassifiseringen beskrevet over sammen med Schiffer-Edmundson heliks hjul og helisk nettdiagram presentasioner av kjernepeptidene fra struktur (I) såvel som den detaljerte beskrivelsen av ønskede egenskaper tilveiebrakt heri, endret eller muterte former av kjernepeptidene fra stuktur (I) som vesentlig bibeholder de amfipatiske eller andre egenskaper til heliksen, og som derfor er å betrakte som å være innenfor området av foreliggende oppfinnelse, kan lett erverves.

I en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen, er endrede eller muterte former av kjernepeptidene fra struktur (I) ervervet ved å fiksere de hydrofile eller hydrofobe residiene ifølge struktur (I) og substituere minst en ikke-fiksert residie med en annen aminosyre, fortrinnsvis konservative, dvs., med andre aminosyrer av samme kategori eller subkategori. Residier som utgjør basiske og/eller hydrofobiske samlinger kan også bli fiksert ifølge struktur (I) og minst en ikke-fiksert residie substituert, fortrinnsvis kan dette gjøres på en konservativ måte.

Endret eller muterte former av kjernepeptidene fra struktur (I) er ervervet ved å fiksere hydrofile aminosyreresidier posisionert innenfor den hydrofile siden av heliks ifølge stuktur (I) og substituert ved minst en ikke-fiksert aminosyreresidie med en annen aminosyre, fortrinnsvis med en annen aminosyreresidie av samme kategori eller sub-kategori. Med referanse til FIG. 2A kan det sees at residiene 1, 4, 7, 8, 11, 12, 15, 18, 19 og 22 er posisionert innenfor den hydrofile siden til den amfipatiske heliksen dannet av kjernepeptidene fra struktur (I). Av disse studier, er alle hydrofile med unntak av residie 1, som kan være enten hydrofil eller hydrofob. Derfor, i en foretrukket utførelsesform, er residiene 4, 7, 8, 11, 12, 15, 18, 19 og 22 fiksert ifølge struktur (I) og minst en av residiene 1, 2, 3, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 16, 17, 20 og 21 er substituert med en annen aminosyre fra samme kategori, fortrinnsvis med en annen aminosyre fra samme sub-kategori. Alternativt er residie 1 også fiksert ifølge struktur (I) og minst en av residiene 2, 3, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 16, 17, 20 og 21 er substituert.

I en spesielt foretrukket utførelsesform, er C-terminal basisk samling (residiene 19, 20 og 22) også fiksert ifølge struktur (I) og bare residiene 2, 3, 5, 6, 9 10, 13, 14 og 16 og/eller 17 er substituert.

I en annen spesielt foretrukket uførelsesform, er den hydrofobiske samlingen også fiksert, og bare residiene 2, 5, 13, 14, 16, 17, 20 og/eller 21 er substituert.

Og i ennå en annen spesielt foretrukket utførelsesform, er både basiske og hydrofobe samlinger fiksert og bare residiene 2, 5, 13, 14, 16 og/eller 17 er substituert.

I en annen foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen, er endrede eller muterte former av kjernepeptidene fra oppfinnelsen ervervet ved å fiksere hydrofobe aminosyreresidier posisionert innenfor den hydrofobe siden av heliksen og som substituerer minst en ikke-fiksert aminosyreresidie med en annen aminosyreresidie, fortrinnsvis med en annen residie av samme kategori eller sub-kategori.

Ved å referere til FIG. 2A, kan det sees at residiene 2, 3, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 16, 17, 20 og 21 er posisionert innenfor den hydrofobiske siden. Av disse, er alle hydrofobiske med unntak av residie 20, som er hydrofil. Derfor, i en foretrukket utførelsesform, er residiene 2, 3, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 16, 17 og 21 fiksert ifølge struktur (I) og ved minst en av residiene 1, 4, 7, 8, 11, 12, 15, 18, 19, 20 og 22 er substituert med en annen aminosyreresidie, fortrinnsvis med en annen aminosyre av samme kategori eller sub-kategori.

I en spesielt foretrukket utførelsesform, er C-terminal basisk samling (residie 19, 20 og 22) også fiksert, og bare residiene 1, 4, 7, 8, 11, 12 og/eller 15 er substituert.

I en annen utførelsesform, er endrede eller muterte former av peptidene fra stuktur (I) ervervet ved å fiksere alle aminosyreresidiene som finnes i den hydrofobe eller hydrofile siden av heliksen og som blir substituert, fortrinnsvis på en konservativ måte, med minst en aminosyreresidie som finnes i den andre siden med en annen aminosyreresidie. Residiene som omfatter hydrofob samling og/eller basisk samling kan også eventuelt bli fiksert ifølge struktur (I) som tidligere diskutert.

En annen utførelsesform av oppfinnelsen, er de endrede eller muterte formene av struktur (I) ervervet ved å substituere minst en aminosyre med en ikke-konservativ aminosyre. De som kjenner fagfeltet vil gjenkjenne at slike substitusioner skulle ikke i det vesentlige endre de amfipatiske og/eller strukturelle egenskapene til heliksen som diskuteres, supra. Derfor, i visse tilfeller kan det være ønskelig å substituere en eller flere par av aminosyrene for å opprettholde nettverksegenskapene til heliksen. Videre veiledning for å selektere egnede aminosyresubstitusioner er tilveiebrakt av peptidsekvensene listet opp i TABELL X (se, avsnitt 8.3, infra).

I ennå en annen utførelsesform av oppfinnelsen, de første en til fire aminosyreresidiene i den N-terminale enden og/eller C-terminale enden av kjernepeptidene fra struktur (I) er substituert med en eller flere aminosyreresidier, eller en eller flere peptidsegmenter, som er kjent til å utvise stabilitet til regioner med α-heliks sekundærstruktur ("ende-cap" residier eller segmenter). Slike ende-cap residier og segmenter er vel kjent innen fagfeltet (se, f.eks. Richardson og Richardson, 1988, Science 240:1648-1652; Harper et al., 1993, Biochemistry 32(30) :7605-7609; Dasgupta og Bell, 1993, Int. J. Peptide Protein Res. 41: 499-511; Seale et al., 1994, Protein Science 3:1741-1745; Doig et al., 1994, Biochemistry 33:3396-3403; Zhou et al., 1994, Proteins 18:1-7; Doig og Baldwin, 1995, Protein Science 4:1325-1336; Odaert et al., 1995, Biochemistry 34:12820-12829; Petrukhov et al., 1996, Biochemistry 35:387-397; Doig et al., 1997,Protein Science 6:147-155). Alternativt kan de første en til fire N-terminale og/eller C-terminale aminosyreresidiene fra struktur (I) bli erstattet med peptido-etterlignende deler som etterligner strukturen og/eller egenskapene til ende-Cap residiene eller segmentene. Egnede ende-cap etterligninger er vel kjent innen fagfeltet, og er beskrevet, for eksempel i Richardson og Richardson, 1988, Science 240:1648-1652; Harper et al., 1993, Biochemistry 32(30) :7605-7609; Dasgupta og Bell, 1993, Int. J. Peptide Protein Res. 41:499-511; Seale etal., 1994, Protein Science 3:1741-1745; Doig et al., 1994,

Biochemistry 33:3396-3403; Zhou et al., 1994, Proteins 18:1-7; Doig og Baldwin, 1995, Protein Science 4:1325-1336; Odaert et al., 1995, Biochemistry 34:12820-12829; Petrukhov et al., 1996, Biochemistry 35:387-397; Doig et al., 1997, Protein Science 6:147-155).

Mens struktur (I) inneholder 22 spesifiserte aminsyreresidieposisioner, skal det forstås at kjernepeptidene fra oppfinnelsen kan inneholde færre enn 22 aminosyreresidier. Forkortede eller internt deleterte former av struktur (I) som inneholder så få som 18 eller til og med 15 aminosyreresidier som i det vesentlige bibeholder karakteristika og egenskaper til amfipatisk heliks dannet ved kjernepeptidene fra struktur (I) er å betrakte som å være innenfor området av den foreliggende oppfinnelsen.

Forkortede former av peptidene fra struktur (I) blir ervervet ved å deletere en eller flere aminosyrer fra N- og/eller C-terminal ende av struktur (I). Internt deleterte former av struktur (I) blir ervervet ved å deltere en eller flere aminosyrer fra interne posisioner inne i peptidet fra struktur (I). De interne aminosyreresidiene som blir deltert kan eller kan ikke være ved-side-av-liggende residier.

De som kjenner fagfeltet vil gjenkjenne at å deletere en intern aminosyreresidie fra et kjernepeptid fra struktur (I) vil forårsake at planet til hydrofile-hydrofobe interfase av heliksen til å rotere med 100° ved punktet for delesion. Siden slike rotasioner kan signifikant endre de amfipatiske egenskapene til det resulterende heliks, er det i en foretrukket uførelsesform av oppfinnelsen aminosyreresidier som er deletert slik at de i det vesentlige opprettholder oppstillingen av planet til den hydrofile-hydrofobe interfasen langs hele langaksen på heliksen.

Dette kan med letthet oppnås ved å deletere et tilstrekkelig antall av ved siden av liggende eller ikke-ved-siden-av-liggende aminosyreresidier slik at en fullstendig heliksdreining blir deletert. En idealisert α-heliks inneholder 3.6 residier pr dreining. Derfor, i en foretrukket utførelsesform. Blir grupper på 3-4 ved siden av liggende eller ikke-ved-siden-av-liggende aminosyreresidier deletert. Om 3 aminosyrer eller 4 aminosyrer blir deltert vil avhenge av posisionen inne i heliksen til den første residien som skal deleteres. Å bestemme egnet antall av ved-siden-av-liggende eller ikke-ved siden-av-liggende aminosyreresidier som utgjør en fullstendig heliksdreining fra ethvert spesielt startpunkt inne i en amfipatisk heliks er godt innenfor evnene til de som kjenner fagfeltet.

På grunn av den formodede viktighet av basisk samling i den C-terminale enden av kjernepeptidene fra struktur (I) i å stabilisere heliksen og viktigheten av den hydrofobe samlingen i å effektuere lipidbinding og LCAT aktivering, er det i foretrukne utførelsesformer fra oppfinnelsen residier som omfatter basiske og hydrofobe samlinger ikke deletert. Derfor i foretrukne utførelsesformer, er ikke residiene 19, 20 og 22 (basisk samling) og residiene 3, 6, 9 og 10 (hydrofob samling) ikke deletert.

Kjernepeptidene fra struktur (I) kan også utvides i en eller begge terminale ender eller internt ved å tilføre aminosyreresidier som ikke i det vesentlige interfererer med, og i noen utførelsesformer til og med øker, de strukturelle og/eller funksionelle egenskapene til peptidene. Forlengede kjernepeptider som inneholder som mange som 23, 25, 26, 20 eller til og med flere aminosyreresidier er å regne som å være innenfor området av den foreliggende oppfinnelsen. Fortrinnsvis, slike forlengede peptider vil i det vesentlige bibeholde nettverk amfipatisitet og andre egenskaper til peptidene fra struktur (I). Selvfølgelig, vil det forstås at å tilføre aminosyrer internt vil en rotere planet til den hydrofob-hydrofile interfasen på insersionspunktet på en måte som er lik den som er beskrevet over for interne delesioner. Derfor, kan betenkeligheter som er diskutert over sammen med interne delesioner også anvendes på interne addisioner.

I en utførelsesform, er kjernepeptidene forlenget i N- og/eller C-terminal ende ved minst en heliksdreining. Fortrinnsvis, vil slike forlengelser stabilisere heliksens sekundærstruktur ved tilstedeværelse av lipider, slik som ende-cap aminosyrer og segmenter tidligere beskrevet. I en spesiell foretrukket utførelsesform, blir kjernepeptidet fra struktur (I) forlenget i den C-terminale ende ved en enkel basisk aminosyreresidie, fortrinnsvis Lys (K).

Også inkludert innenfor området av den foreliggende oppfinnelse er "blokkerte" former av ApoA-I-agonist, dvs., former av ApoA-I agonister hvori den N- og/eller C-terminale enden er blokkert med en del som er i stand til å reagere med N-terminale -NH_2 eller C-terminal -C(O)OH. Det har blitt oppdaget at ved å fjerne N- og/eller C-terminale ladninger fra ApoA-I agonister fra oppfinnelsen som inneholder 18 eller færre aminosyreresidier (ved å syntetisere N-asylerte peptidaminder/ester/hydrazider/ alkoholer og substitusioner derav) resulterer i agonister som utviser og i noen utførelsesformer til og med utvider aktiviteten fra den ublokkerte formen av agonisten. I noen utførelsesformer som inneholder 22 eller flere aminosyre, resulterte blokkering av N- eller C-terminal ende i ApoA-I agonister som utviser lavere aktivitet enn ublokkerte former. Imidlertid, ved å blokkere både N- og C-terminal ende av ApoA-I agonister

sammensatt av 22 eller flere aminosyrer forventes det at aktiviteten blir gjenopprettet. Derfor i en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen, blir enten den N- og/eller C-terminale ende (fortrinnsvis begge termini) av kjernepeptidene som inneholder 18 eller færre aminosyrer blokkert, mens N- og C-termini av peptidene som inneholder 22 eller flere aminosyrer blir enten begge blokkert eller begge ikke blokkert. Typiske N-terminale blokkeringsgrupper inkluderer RC(O)-, hvor R er -H, (C_1-C_6) alkyl, (C_1-C_6 alkenyl, (C_1-C_6) alkynyl, (C_5-C_{20} aryl, (C_6-C_{26}) alkaryl, 5-20 leddet heteroaryl eller 6-26 leddet alkheteroaryl. Foretrukket N-terminale blokkeringsgrupper inkluderer acetyl, formyl og dancyl.Typiske C-terminale blokkeringsgrupper inkluderer -C(O)NRR og -C(O)OR hvor hver R er uavhengig definert som over. Foretrukkede C-terminale blokkeringsgrupper inkluderer de hvor hver R er uavhengig metyl. Uten å bli tatt til inntekt til noen spesiell teori, tror man at slike terminale blokkeringsgrupper stabiliserer α-heliksen ved tilstedeværelse av lipider (se f.eks. Venkatachelapathi et al., 1993, PROTEINS: Structure, Function and Genetics 15:349-359).

Den native strukturen til ApoA-I inneholder åtte heliksenheter som man tror virker sammen for å binde lipider (Nakagawa et al., 1985, J. Am. Chem. Soc. 107:7087-7092; Anantharamaiah et al., 1985, J. Biol. Chem. 260:10248-10262; Vanloo et al., 1991, J. Lipid Res. 32:1253-1264; Mendez et al., 1994, J. Clin, Invest. 94:1698-1705; Palgunari et al., 1996, Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol. 16:328-338; Demoor et al., 1996, Eur. J. Biochem. 239:74-84). Derfor, inkluderer også foreliggende oppfinnelse ApoA-I-agonister omfattet av dimerer, trimerer, tetramerer og til og med høyere ordens-polymerer ("multimere") av kjernepeptidene beskrevet heri. Slike multimerer kan være i form av tandemrepetisioner, forgrenede nettverk eller kombinasioner derav.
Kjernepeptidene kan være direkte knyttet til hverandre eller separert med en eller flere linkere.
Kjernepeptidene som omfatter multimerer kan være peptider fra struktur (I), analoger av struktur (I) og muterte former av struktur (I), forkortede eller interndelterte former av struktur (I), forlengede former av struktur (I) og/eller kombinasioner derav.
Kjernepeptidene kan være forbundet på en hode-til-hale-måte (dvs., den N-terminale enden til den C-terminale enden), en hode-til-hode-måte (dvs., den N-terminale enden til den N-terminale enden), og en hale-til-hale-måte (dvs., den C-terminale enden til den C-terminale enden), eller kombinasioner derav.

I en utførelsesform av oppfinnelsen, er multimerene tandemrepeteringer av to, tre, fire og opp til omtrent ti kjernepeptider. Fortrinnsvis, er multimerene tandemrepetisioner på

fra 2 til 8 kjernepeptider. Derfor, i en utførelsesform, omfatter ApoA-I agonistene fra oppfinnelsen multimerer som har følgende strukturelle formel:

(II) HH $[LL_m\text{-}HH]_nLL_m\text{-}HH$

hvori:

hver m er uavhengig et heltall fra 0 til 1, fortrinnsvis 1;

n er et heltall fra 0 til 10, fortrinnsvis 0 til 8;

hver "HH" representerer uavhengig et kjernepeptid eller peptidanalog av strukturen (I) eller et mutert, forkortert, internt deletert eller forlenget form derav som beskrevet heri;

hver "LL" representerer uavhengig en linker; og

hver " - " representerer uavhengig en kovalent binding.

I struktur (II) kan linkeren være ethvert bifunksionelt molekyl i stand til kovalent å binde to peptider til hverandre. Derfor, er egnede linkere bifunksionelle molekyler hvori de funksionelle gruppene er i stand til å være kovalent bundet til N- og/eller C-terminal ende av peptidet. Funksionelle grupper som er egnet for binding til N- eller C-terminal ende av peptidene er vel kjent innen fagfeltet, det er også egnet kjemi for å effektuere slik kovalent bindingsdannelse.

Linkeren kan være fleksibel, rigid eller semi-rigid, avhengig av ønskede egenskaper til multimeren. Egnede linkere inkluderer, for eksempel, aminosyreresidier slike som Pro eller Gly eller peptidsegmenter som inneholder fra omtrent 2 til omtrent 5, 10, 15 eller 20 eller til og med flere aminosyrer, bifunksionelle organiske forbindelser slik som $H_2N(CH_2)_nCOOH$ hvor n er et heltall fra 1 til 13, og dets like. Eksempler på slike linkere, såvel som metoder for å lage slike linkere og peptider som inkorporerer slike linkere er vel kjent innen fagfeltet (se, f.eks. Hünig et al., 1974, Chem. Ber. 100:3039-3044; Basak et al., 1994, Bioconjug. Chem. 5(4):301-305).

I en foretrukket uførelsesform av oppfinnelsen, er tandemrepetisionene internt skilt av en enkel prolinresidie. I de tilfellene hvor kjernepeptidene er terminert i deres N- eller

C-terminale ende med prolin, slik som f.eks., hvor X_1 i struktur (I) er Pro (P) eller D-Pro (p), m i struktur (II) er fortrinnsvis 0. I de tilfellene hvor kjernepeptidene ikke inneholder en N- eller C-terminal prolin, er LL fortrinnnsvis Pro (P) eller D-Pro (p) og m er fortrinnsvis 1.

I visse utførelsesformer av oppfinnelsen, kan det være ønskelig å anvende kuttbare linkere som tillater frigjørelse av en eller flere helikssegmenter (HH) under visse betingelser. Egnede kuttingslinkere inkluderer peptider som har aminosyrersekvenser som blir gjenkjent av proteaser, oligonukleotider som blir kuttet av endonukleaser og organiske forbindelser som kan bli kuttet via kjemiske midler, slik som under sure, basiske eller andre betingelser. Fortrinnsvis vil kuttingsbetingelsene være relativt midle slik at de ikke denaturerer eller på annen måte degraderer helikssegmentene og/eller ikke-kuttede linkere som utgjør multimerisk ApoA-I agonister.

Peptid og oligonukleotidlinkere kan bli selektivt kuttet, såvel som metode for å kutte linkere er vel kjent og vil være tydelig for de som kjenner fagfeltet. Egnede organiske forbindelseslinkere som kan selektivt kutte vil være tydelig for de som kjenner fagfeltet, og inkludere de som er beskrevet, for eksempel i WO 94/08051, såvel som referansene sitert deri.

I en foretrukket utførelsesform, er linkerne som anvendes peptider som er substrater for endogene sirkulatoriske enzymer, som derved tillater de multimeriske ApoA-I agonistene å bli selektivt kuttet in vivo. Endogene enzymer som er egnet for kutting av linkere inkluderer, for eksempel, proapolipoprotein A-I propeptidase. Egnede enzymer såvel som peptidsegmenter som virker som substrater for slike enzymer, er vel kjent innen fagfeltet (se f.eks. Edelstein et al., 1983, J. Biol. Chem. 258:11430-11433; Zanis, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2574-2578).

Som diskutert over, er et nøkkeltrekk av kjernepeptidene fra oppfinnelsen deres evne til å danne intermolekylære hydrogenbindinger eller saltbroer når de blir arrangert på en antiparallell måte. Derfor, i en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen, blir linkere av tilstrekkelig lengde og fleksibilitet brukt for å tillate helikssegmenter (HH) av struktur (II) på å bli oppstilt på en antiparallell måte å danne intermolekylære hydrogenbindinger eller saltbroer ved tilstedeværelse av lipider. Linkere med tilstrekkelig lengde og fleksibilitet inkluderer, men er ikke begrenset til, Pro (P), Gly (G), Cys-Cys, H_2N-$(CH_2)_n$-C(O)OH hvor n er 1 til 12, fortrinnsvis 4 til 6; H_2N-aryl-C(O)OH og karbohydrater.

Alternativt kan man siden de native apolipoproteinene tillater kooperativ binding mellom antiparallelle helikssegmenter, inkludere peptidlinkerne som korresponderer i primærsekvens til peptidsegmentene som forbinder ved siden av liggende helikser av de native apolipoproteiner, for eksempel, ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III, ApoD, ApoE og ApoJ som med letthet kan blir brukt for å kople kjernepeptidene. Disse sekvensene er mer kjent innen fagfeltet (se f.eks. 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).

Andre linkere som tillater dannelse av intermolekulære hydrogenbindinger eller saltbroer mellom tandemrepeteringer av antiparallelle helikssegmenter inkluderer peptidreversdreininger slik som β-dreininger og γ-dreininger, såvel organiske molekyler som etterligner strukturene til peptid β-dreininger og/eller γ-dreininger. Generelt, er reversdreininger segmenter av peptider som revererer retningen av polypeptidkjeden slik at den tillater et enkelt polypeptidkjede å innta regioner med antiparallelle β-sheet eller antiparallelle α-heliksstruktur. β-Dreininger er generelt sammensatt av fire aminosyreresidier og γ-dreininger er generelt sammensatt av tre aminosyreresidier.

Konformasionene og sekvensene til mange peptid β-dreininger har blitt godt beskrevet innen fagfeltet og inkluderer, for eksempel uten begrensning, type-I, type-I', type-II, type-II', type-III, type-III', type-IV, type-V, type-V', type-VIa, type-VIb, type-VII og type-VIII (se, 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; Sibanda et al., 1989, J.Mol Biol. 206:759-777; Tramontano et al., 1989, Proteins: Struct.Funct. Genet. 6:382-394).

Spesifikke konformasioner av korte peptiddreininger slik som β-dreininger avhenger primært av posisionene til visse aminosyreresidier i dreiningen (vanligvis Gly, Asn eller Pro). Generelt, er type-I β-drening kompatibel med enhver annen aminosyreresidie i posisioner 1 til 4 til dreiningen, med unntak av at Pro kan ikke forekomme i posision 3. Gly forekommer hyppigst i posision 4 og Pro forekommer hyppigst i posision 2 i begge type-I og type-II dreininger. Asp, Asn, Ser og Cys-residier forekommer ofte i posision 1, hvor deres sidekjeder ofte hydrogenbinder til NH i residien 3.

I type-II dreininger, forekommer Gly og Asn oftest i posision 3, siden de inntar den påkrevde "backbone"-vinkelen lettest. Ideelt, har type-I' dreininger Gly i posisionene 2

og 3, og type-II' dreninger har Gly i posision 2. Type-III dreininger kan generelt ha flest aminosyreresidier, men type-III' dreininger krever vanligvis Gly i posisionene 2 og 3. Type-VIa og VIb dreininger har generelt en *cis* peptidbinding og Pro som en intern residie. For en oversikt over forskjellige typer av sekvenser av β-dreininger i proteiner og peptider kan leseren slå opp i Wilmot et al., 1988, J. Mol. Biol. 203:221-232.

Konformasionen og sekvensene til mange peptider γ-dreininger har også blitt godt beskrevet innen fagfeltet (se f.eks. 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; Tramontano et al., 1989, Proteins: Struct. Funct. Genet. 6:382-394). Alle disse typene av β-dreininger og γ-dreiningsstrukturer og deres korresponderende sekvenser, såvel som nylig oppdagede peptid β-dreininger og γ-dreiningsstrukturer og sekvenser, er spesielt omfattet av oppfinnelsen.

Alternativt kan linken (LL) omfatte et organisk molekyl eller del som etterligner strukturen til peptidet β-dreining eller γ-dreining. Slik β-drening og/eller γ-dreining etterlignende deler, såvel som metoder for å syntetisere peptider som inneholder slike deler, er vel kjent innen fagfeltet og inkluderer, blant andre, de som er beskrevet i Giannis og Kolter, 1993 Angew. Chem. Intl. Utg. Eng. 32:1244-1267; Kahn et al., 1988, J.Molecular Recognition 1:75-79: og Kahn et al., 1987, Tetrahedron Lett. 28:1623-1626.

I ennå en annen utførelsesform av oppfinnelsen, er multimerene i form av forgrenede nettverk (se f.eks. FIG. 7). Slike nettverk kan lett erverves gjennom anvendelse av multifunksionslinkerdeler som tillater mer enn to heliksenheter å være festet til en enkel linkerdel. Derfor, anvender forgrenede nettverk molekyler som har tre, fire eller til og med flere funksionelle grupper som er i stand til kovalent å binde til N- og/eller C-terminale ende av et peptid. Egnede linkdeler inkluderer, for eksepel, aminosyreresidier som har sidekjeder som bærer hydroksyl, sulfonyl, amino, karboksyl, amid og/eller esterfunksionaliteter, slik som, for eksempel Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q), Lys (K), Arg (R), Orn, Asp (D) og Glu (E); eller andre organiske molekyler som inneholder slike funksionelle grupper.

De heliske segmentene bundet til en enkel linkerdel trenger å være forbundet via like termini. I noen utførelsesformer, er de heliske segmentene forbundet til en enkel linkerdel for slik å bli arrangert på en antiparallell måte, f.eks. noen av heliksene er festet via deres N-terminale ende, og andre via deres C-terminale ende.

Helikssegmenter kan bli festet direkte til linkerdelen, eller kan være i avstand fra linkerdelen med en eller flere bifunksionelle linkere (LL), som tidligere beskrevet.

Ved å referere til FIG. 7A og 7B kan det sees at et forgrenet nettverk kan bli beskrevet i antallet av "knuter" som omfatter nettet, hvor hver multifunksionell linkerdel utgjør en knute. I FIG. 7A og 7B er helikssegmenter (dvs., kjernepeptider fra oppfinnelsen) illustrert som sylindere, og multifunksionelle linkerdeler (eller knuter) som sirkler (•), hvor antallet av linjer som går fra sirklene indikerer "orden" (eller antall av funksionelle grupper) av den multifunksionelle linkerdelen.

Antallet av knuter i nettet vil generelt avhenge av det totale antalle av helikssegmenter og vil typisk være fra omtrent 1 til 2. Selvfølgelig, vil det være best at for et gitt antall av ønskede helikssegmenter, at nettverk som har høyere ordenslinkerdeler vil ha færre knuter. For eksempel, med referanse til FIG. 7A og 7B, har et tertiærordensnettverk (dvs., et nettverk som har trifunksionell linkingsdeler) av syv heliksenheter har tre knuter (FIG. 7A), mens et kvaternært ordensnett (dvs., et nettverk som tetrafunksionell linkerdeler) av syv heliksenheter bare ha to knuter (FIG. 7B).

Nettverkene kan være av lik orden, dvs., nettverket hvori alle knutene er, for eksempel, trifunksionelle eller tetrafunksionelle koplingsenheter, eller kan være en blanding av orden, f.eks., nettverk hvor knutene er blandinger av, for eksempel, trifunksionelle og tetrafunksionelle koplingsenheter. Selvfølgelig, skal det forstås at selv i enhetlig ordensnettverk, trenger ikke koplingsenhetene å være identiske. En tertiærordens-nettverk kan omfatte, for eksempel, to, tre, fire eller til og med flere forskjellige trifunksionelle koplingsdeler.

På samme måte som lineære multimerer, kan helikssegmentene som omfatter det forgrenede nettverket være, men behøver ikke å være, identiske.

Et eksempel på en slik blandet orden av forgrenet nettverk er illustrert i FIG. 7C. I FIG. 7C, er helikssegmentene (dvs., kjernepeptidene fra oppfinnelsen) illustrert som sylindere og multifunksionelle koplingsdeler som sirkler (•) hvor antall av linjer som utgår fra sirkelen indikerer "orden" (eller antall av funksionelle grupper) på den multifunksionelle koplingsdelen. Linjene som forbinder helikssegmentene representerer bifunksionelle linkere LL som tidligere beskrevet. Helikssegmentene som omfatter

forgrenede nettverk kan være tandemrepeterte av kjernepeptider, som tidligere beskrevet.

I en illustrativ utførelsesform, er de forgrenede nettverkene fra oppfinnelsen beskrevet av formelen:

(III) $X\text{-}N_{ya}\text{-}X_{(ya\text{-}1)}+N_{yb}\text{-}X_{(yb\text{-}1)})_p$

hvori

hver X er uavhengig $HH+LL_m–HH+_nLL_m–HH$;

hver HH er uavhengig kjernepeptid av struktur (I) eller en analog eller mutert, forkortet, internt deletert eller forlenget form derav som beskrevet heri;

hver LL er uavhengig en bifunksionell linker;

hver m er uavhengig et heltall fra 0 til 1;

hver n er uavhengig et heltall fra 0 til 8;

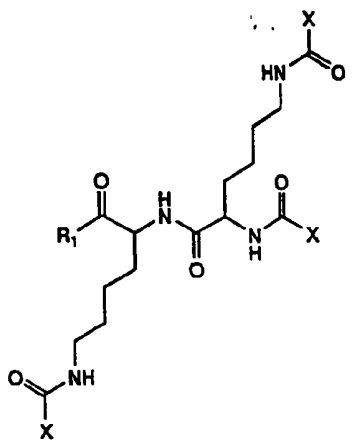
N_{ya} og N_{yb} er hver uavhengig en multifunksionell koplingsdel hvor Y_a og Y_b representerer antallet av funksionelle grupper på N_{ya} og N_{yb}, respektivt: hver Y_a eller Y_b er uavhengig et heltall fra 3 til 8;

p er et heltall fra 0 til 7; og

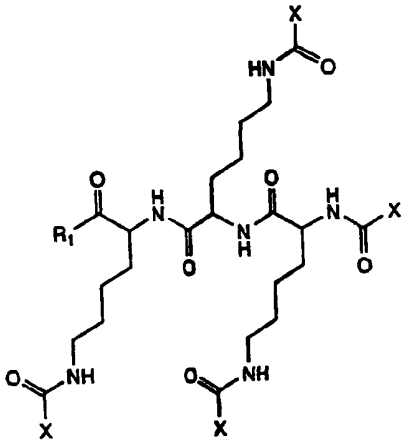
hver "–" betegner uavhengig en kovalent binding.

En foretrukket utførelsesform, omfatter det forgrenede nettverk et "Lys-tre", dvs., et nettverk hvori multifujksionell koplingsenhet er en eller flere Lys (K) residier (se, f.eks. FIG. 7D).

I en illustrativ utførelsesform, er "Lys-treet" forgrenede nettverk av oppfinnelsen beskrevet ved formelen:



eller



(IV) (V)

hvori:

hver X er uavhengig HH+LL_m–HH+$_nLL_m$–HH;

hver HH er uavhengig et kjernepeptid eller peptidanalog av struktur (I) eller et mutert, forkortet, internt deletert eller forlenget form derav som beskrevet heri;

hver LL er uavhengig en bifunksionell linker;

hver n er uavhengig et h eltall fra 0 til 8;

hver m er uavhengig et heltall fra 0 til 1;

R_1 er -OR eller -NRR; og

hver R er uavhengig -H, (C_1-C_6) alkyl, (C_1-C_6) alkenyl, (C_1-C_6) alkynyl; (C_5.C_{20}) aryl (C_6-C_{26}) alkaryl, 5-20 leddet heteroaryl eller 6-26 leddet alkheteroaryl.

5.1.1 ANALYSE AV STRUKTUR OG FUNKSION

Strukturen og funksionen til kjernepeptidene eller peptidanaloger fra oppfinnelsen, såvel som ApoA-I agonister sammensatt av slike kjernepeptider, inkluderer de multimere formene beskrevet over, kan bli analysert for å selektere aktive agonister eller etterligninger av ApoA-I. For eksempel, kan kjernepeptidene eller peptidanalogene bli analysert for deres evne til å danne α-helikser ved tilstedeværelse av lipider, for å binde lipider, for å danne komplekser med lipider, for å aktivere LCAt, for å fremme kolesterolutstrømning, etc.

Metoder og analyser for å analysere strukturen og/eller funksionene av peptidene er vel kjent innen fagfeltet. Foretrukkede metoder er tilveiebrakt i utarbeidelseseksemplene, infra. For eksempel, kan sirkulær dikroisme (CD) og nukleær magnetisk resonans (NMR) analyser beskrevet i avsnitt 7, infra, kan bli brukt for å analysere strukturen av peptidene eller peptidanaloger - spesielt grad av helisitet ved tilstedeværelse av lipider. Evnen til å binde lipider kan bli bestemt ved å bruke fluorescens spektroskopyanalyse beskrevet i avsnitt 7, infra. Evnen til peptidene og/eller peptidanalogene til å akvitere LCAT kan lett bli bestemt ved å bruke LCAT aktivering beskrevet i avsnitt 8, infra. In vitro og in vivo analyser beskrevet i avsnittene 9, 10 og 11, infra, kan bli brukt til å evaluere halveringstid, distribuering, kolesterolutstrømning og effekter på RCT.

Generelt, er kjernepeptidene og/eller peptidanaloger ifølge oppfinnelsen som utviser egenskapene listet opp i TABELL IV, infra, betraktet å være aktive.

TABELL IV
EGENSKAPER HOS AKTIVE PEPTIDER

EGENSKAP	OMRÅDE	FORETRUKKET OMRÅDE
% Helisitet ved tilstedeværelse av lipider (Ri=30) (ublokkert 22-aminosyreresidie peptider)	≥ 60%	≥ 80%
% Helisitet ved tilstedeværelse av lipider (Ri=30) (ublokkert 18-aminosyreresidiepeptider	≥ 40%	≥ 60%
% Helisitet ved tilstedeværelse av lipider (Ri=30 (blokkert 18-aminosyreresidiepeptier og kortere peptider)	≥ 60%	≥ 80%
Lipidbinding (ved tilstedeværelse av SUV)	0.5 - 10μM peptid R_i=1-50	
LCAT aktivering	≥ 38%	≥ 80%

R_i er lipid: peptid molar ratio.

Som illustrert i arbeidseksemplene, infra, kjernepeptidene som utviser en høy grad av LCAT aktivering (≥ 38%) utviser generelt signifikant α-heliksstruktur ved tilstedeværelse av lipidiske små unilamellære vesikler (SUVer) (≥ 60% heliksstruktur i tilfelle av ublokkerte peptider som inneholder 22 eller flere aminosyreresidier og blokkerte peptider som inneholder 18 eller færre aminosyreresidier; ≥ 40% heliksstrukturer i tilfelle av ublokkerte peptider som inneholder 18 eller færre aminosyrer) og de peptider som utviser liten eller ingen LCAT aktivering utviser liten α-heliksstruktur. Imidlertid, vil i visse tilfeller, peptider som utviser signifikant heliksstruktur ved tilstedeværelse av lipider ikke ha signifikant effekt på LCAT.

På samme måte, når kjernepeptidene som utviser signifikant LCAT aktivering bindes til lipider, vil i visse tilfeller peptider som utviser lipidbinding ikke ha signifikant effekt på LCAT aktiviteten.

Som en konsekvens, vil de som kjenner fagfeltet forstå at mens evnen til kjernepeptidene beskrevet heri til å danne α-helikser (i tilstedeværelse av lipider) og å binde lipider er kritisk for aktiviteten, vil i mange tilfeller disse egenskapene ikke være tilstrekkelig. Derfor, i en foretrukket utførelsesform er kjernepeptidene fra oppfinnelsen utsatt for en serie av screeninger for å selektere kjernepeptider som utviser signifikant farmakologisk aktivitet.

I et første trinn, blir kjernepeptidet screenet for dets evne til å danne α-heliks ved tilstedeværelse av lipider ved å bruke CD-analyse beskreveti avsnitt 7, infra. Disse peptidene som er minst 40% heliske (ublokkerte peptider som inneholder 18 eller færre aminosyrer) eller 60% heliske (blokkerte peptider som inneholder 18 eller færre aminosyrer; ublokkerte peptider som inneholder 22 eller flere aminosyrer) i tilstedeværelse av lipider (i en konsentrasion på omtrent 5 μM og en lipid:peptid molarratio på omtrent 30) blir deretter screenet for deres evne til å binde lipider ved å bruke fluorescensanalyse beskrevet i avsnitt 7, infra. Selvfølgelig, vil bare de kjernepeptidene som inneholder fluorescens Trp (W) eller Nal residie screenes for lipidbinding via fluorescens. Imidlertid, for peptider som ikke inneholder fluorescensresidier, er binding til lipider tydelig når helisiteten øker ved tilstedeværelse av lipider.

Kjernepeptider som utviser lipidbinding ved tilstedeværelse av SUV (0.5-10 μM peptid; lipid:peptid molar ratio i området fra 1 til 50) blir deretter screenet for farmakologisk aktivitet. Selvfølgelig, vil den farmakologiske aktiviteten som blir screenet være avhengig av den ønskelige bruken av ApoA-I agonistene. I en foretrukket utførelsesform, blir kjernpeptidene screenet for deres evne til å aktivere LCAT, siden peptider som aktiverer LCAT er spesielt nyttige i metoder beskrevet heri. Kjernepeptider kan utvise minst omtrent 38% LCAT aktivering sammenlignet med nativt humant ApoA-I (som bestemt ved å bruke LCAT aktiveringsanalyse beskrevet i avsnitt 8, infra), er foretrukket, med kjernepeptider som utviser 50%, 60%, 70% 80% eller til og med 90% eller mer som spesielt foretrukket.

5.1.2 FORETRUKKEDE UTFØRELSESFORMER

ApoA-I agonister for oppfinnelsen kan ytterligere bli definert ved foretrukne utførelsesformer.

I en foretrukket utførelsesform, er ApoA-I agonistene 22 aminosyreresdiepeptider iflølge struktur (I) eller den N-terminale acylert og/eller C-terminal amidert eller esterifiserte former derav.

I en annen utførelsesform, er ApoA-I agonistene 22 aminosyreresidiepeptider ifølge struktur (I), eller N-terminal acylert og/eller C-terminal amidert eller esterifiserte former derav, hvori:

X_1 er Pro (P), Gly (G), Ala (A), Asn (N) eller D-pro (p);
X_2 er Ala (A9, Val (V) eller Leu (L);
X_5 er Leu (L);
X_6 er Phe (F);
X_{11} er Glu (E);
X_{19} er Lys (K);
X_{20} er Lys (K); og/eller
X_{22} er Lys (K), og hver av X_3, X_4, X_7, X_8, X_9, X_{10}, X_{12}, X_{13}, X_{14}, X_{15}, X_{16}, X_{17}, X_{18} og X_{21} er som tidligere definert for struktur (I).

Spesielt foretrukket ApoA-I agonister ifølge dette aspektet av oppfinnelsen er de hvori X_2 er Val (V); og/eller X_{18} er Gln (Q).

I ennå en annen foretrukket utførelsesform, er ApoA-I agonister 22 aminosyreresidie-peptider ifølge struktur (I), eller den N-terminale asylerte og/eller C-terminale amiderte eller esterifiserte former derav, hvori en av X_{10}, X_{13} eller X_{14} er Gly (G) og de andre av X_{10}, X_{13} og X_{14} er andre enn Gly (G). Når X_{14} er Gly (G), X_7 er fortrinnsvis Glu (E).

Spesielt foretrukket ApoA-I agonister ifølge dette aspektet av oppfinnelsen er peptider selektert fra gruppen bestående av:

peptid 148:	PVLELFENLLERLGDALQKKLK	(SEQ ID NO:148)
peptid 151:	PVLELFENLGERLLDALQKKLK	(SEQ ID NO:151)
peptid 154:	PVLELFENLLERGLDALQKKLK	(SEQ ID NO:154)

og N-terminale asylerte og/eller C-terminale amiderte ellerr esterifisert former derav.

Utførelsesformer som inneholder interne glysinresidier kan lett syntetiseres i høyt utbytte ved segmentkonsensering, for derved å tilveiebringe signifikante fordeler for storskalaproduksion. Segmentkondensering, dvs., å sette sammen små konstituente

peptidkjeder for å danne en større peptidkjede, har blitt brukt for å fremstille mange biologisk aktive peptider, inklusiv 44-aminosyreresidie som etterligner ApoA-I (se f.eks. Nakagawa et al., 1985, J. Am. Chem. Soc. 107:7087-7083; Nokihara et al., 1989, Peptides 1988:166-168; Kneib-Cordonnier et al., 1990, Int. J. Pept. Protein Res. 35:527-538), og betraktes som det mest kostnadseffektive metoden for høyutbyttesyntese av kjernepeptider fra oppfinnelsen.

Fordeler av syntese via segmentkondensering inkluderer evnene til å kondensere predannede segmenter i løsningsfasen og enkelheten i rensningen av sluttproduktet. Ulemper ved metoden inkluderer lav koplingseffektivitet og utbytte i kondenseringstrinnet og lav løselighet av visse peptidsekvenser.

Koplingseffektiviteten av kondenseringstrinnet kan signifikant økes ved å øke koplingstiden. Typisk, økning i koplingstiden resulterer i økt rasemisering av produktet (Sieber et al., 1970 Helv. Chim. Acta 53:2135-2150). Imidlertid, siden glysin mangler et kiralt senter gjennomgår det ikke rasemisering (prolinresidier, på grunn av sterisk hindring, gjennomgår liten eller ingen rasemisering ved lange koplingstider). Derfor, kan utførelsesformer som inneholder interne glysinresidier bli syntetisert med høyt utbytte via segmentkondensering ved syntetisering av konstituentsegmenter som tar fordel av det faktum at glysinresidier ikke gjennomgår rasemisering. Derfor, tilveiebringe utførelsesformer som inneholder interne glysinresidier signifikante syntetiske fordeler ved storskalafremstilling.

I ennå en anne foretrukket utførelsesform, er ApoA-I agonister 22-aminosyreresidiepeptider ifølge struktur (I) eller den N-terminale asylerte og/eller C-terminale amiderte eller esterifiserte former derav, hvori hver av X_{10}, X_{13} og X_{14} er en annen enn Gly (G).

I ennå en annen foretrukket uførelsesform, er ApoA-I agonister endrede eller muterte former av peptidene ifølge struktur (I) eller den N-terminale asylerte og/eller C-terminale amiderte eller esterifiserte former derav, hvori:

X_4 er en annen enn Asp (D);
X_5 er en annen enn Phe (F);
X_6 er en annen enn Trp (W);
X_7 er en annen enn Leu (L) eller Asp (D);
X_9 er en annen enn Gly (G) eller Trp (W);
X_{12} er en annen enn Lys (K);

X_{13} er en annen enn Trp (W);
X_{14} er en annen enn Trp (W);
X_{15} er en annen enn Glu (E);
X_{16} er en annen enn Trp (W) eller Leu (L); og/eller
X_{17} er en annen enn Trp (W).

I ennå en annen utførelsesform, er ApoA-I agonistene 22 aminosyreresidiepeptider ifølge struktur (I), eller den N-terminale asylerte og/eller C-terminale amiderte elelr esterifiserte former derav, hvori X_7 er Leu (L), X_{10} er Trp (W), X_1 er andre enn Gly (G) og/eller X_{14} er andre enn Gly (G). En spesielt foretrukket peptid ifølge dette aspektet for oppfinnelsen er peptid **155** (PVLELFLNLWERLLDALQKKLK; SEQ ID NO:155).

I en annen foretrukket ufførelsesform, er ApoA-I agonistene 22 aminosyreresidie-peptider, eller den N-terminale asylerte og/eller C-terminale amiderte eller esterifiserte former derav, hvori minst en av X_{19}, X_{20} eller X_{22} er en annen enn Orn. Mer å foretrekke, at minst to av X_{19}, X_{20} og X_{22} er en annen enn Orn. Mest foretrekkbart, hver av X_{19}, X_{20} og X_{22} er en annen enn Orn.

I ennå en annen foretrukket utførelsesform, er ApoA-I agonister selektert fra gruppen av peptider fremsatt under:

peptid **144:** pVLELFENLLERLLDALQKKLK (SEQ ID NO: 144);
peptid **145:** GVLELFENLLERLLDALQKKLK (SEQ ID NO: 145);
peptid **145:** PVLELFENLLERLLDALQKKLK (SEQ ID NO: 146);
peptid **147:** PVLELFENLLERLFDALQKKLK (SEQ ID NO: 147);
peptid **148:** PVLELFENLLERLGDALQKKLK (SEQ ID NO: 148);
peptid **149:** PVLELFENLWERLLDALQKKLK (SEQ ID NO: 149);
peptid **150:** PLLELFENLLERLLDALQKKLK (SEQ ID NO: 150);
peptid **151:** PVLELFENLGERLLDALQKKLK (SEQ ID NO: 151);
peptid **152:** PVFELFENLLERLLDALQKKLK (SEQ ID NO: 152);
peptid **153:** AVLELFENLLERLLDALQKKLK (SEQ ID NO: 153);
peptid **154:** PVLELFENLLERGLDALQKKLK (SEQ ID NO: 154);
peptid **155:** PVLELFLNLWERLLDALQKKLK (SEQ ID NO: 1559;
peptid **186:** PVLELFEQLLERLLDALQKKLK (SEQ ID NO: 186);
peptid **187:** PVLELFENLLERLLDALNKKLK (SEQ ID NO: 187);
peptid **188:** PVLELFENLLDRLLDALQKKLK (SEQ ID NO: 188);
peptid **189:** DVLELFENLLERLLDALQKKLK (SEQ ID NO: 189);

og den N-terminale asylerte og/eller N-terminale amiderte eller esterifiserte former derav.

I ennå en annen utførelsesform, er ApoA-I-agonisten selektert fra gruppen av peptider fremsatt under:

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

og den N-terminale asylerte og/eller C-terminale amiderte eller esterifiserte former derav.

I ennå en annen foretrukket utførelsesform, er ApoA-I agonister multimere former ifølge strukturene II, III og/eller IV hvor hver HH er uavhengig et peptid ifølge struktur (I) eller en N-terminal asylert og/eller C-terminal amidert eller esterifisert form derav, eller enhver av foretrukne peptider ifølge strukturen (I) beskrevet heri.

I ennå en annen foretrukket utførelsesform, er kjernepeptidene som utgjør ApoA-I agonistene ikke en av de følgende peptidene:

peptid **75**:	PVLDEFREKLNEELEALKQKLK	(SEQ ID NO:75);
peptid **94**:	PVLDEFREKLNEALEALKQKLK	(SEQ ID NO:94);
peptid **109**:	PVLDEFREKLNERLEALKQKLK	(SEQ ID NO:109);
peptid **237**:	LDDLLQKWAEAFNQLLKK	(SEQ ID NO:237);
peptid **238**:	EWLKAFYEKVLEKLKELF*	(SEQ ID NO:238);
peptid **241**:	DWFKAFYDKVFEKFKEFF	(SEQ ID NO:241);

peptid **242**:	GIKKFLGSIWKFIKAFVG	(SEQ ID NO:242);
peptid **243**:	DWFKAFYDKVAEKFKEAF	(SEQ ID NO:243);
peptid **244**:	DWLKAFYDKVAEKLKEAF	(SEQ ID NO:244);
peptid **245**:	DWLKAFYDKVFEKFKEFF	(SEQ ID NO:245);
peptid **246**:	EWLEAFYKKVLEKLKELF	(SEQ ID NO:246);
peptid **247**:	DWFKAFYDKFFEKFKEFF	(SEQ ID NO:247);
peptid **248**:	EWLKAFYEKVLEKLKELF	(SEQ ID NO:248);
peptid **249**:	EWLKAEYEKVEEKLKELF*	(SEQ ID NO:249);
peptid **250**:	EWLKAEYEKVLEKLKELF*	(SEQ ID NO:250); og
peptid **251**:	EWLKAFYKKVLEKLKELF*	(SEQ ID NO:251).

Til slutt i en foretrukket utførelsesform, er ApoA-I agonistene ikke fra peptidene listet opp i TABELL X (avsnitt 8.3, infra) som utviser en LCAT aktiveringsaktivitet på mindre enn 38% sammenlignet med nativt humant ApoA-I.

5.2 SYNTESE OG RENSNING AV ApoA-I PEPTIDAGONISTENE

Kjernepeptidene fra oppfinnelsen kan bli fremstilt ved å bruke omtrent enhver teknikk som er kjent innen fagfeltet for fremstilling av peptider. For eksempel, kan peptidene bli fremstilt ved å bruke konvensionell trinnvis løsning eller fastfasepeptidsyntese, eller rekombinante DNA teknikker.

5.2.1 KJEMISK SYNTESE

Kjernepeptider kan bli fremstilt ved å bruke konvensionell trinnvis løsning eller fastfasesynteser (se f.eks. Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, Williams et al., Utg. 1997, CRC Press, Boca Raton Florida, og referanser sitert deri; Solid Phase Peptide Synthesis; A Practical Approach, Atherton & Sheppard, Utg., 1989, IRL Press, Oxford, England og referanser sitert heri).

Alternativt, kan peptidene fra oppfinnelsen bli fremstilt ved segmentkondensering, som beskrevet for eksempel i Liu et al 1996, Tetrahedron Lett. 37 (7): 933-936; Baca, et al., 1995, J. Am. Chem. Soc. 117:1881-1887; Tam et al., 1995, Int. J. Peptide Protein Res. 45:209-216; Schnölzer og Kent, 1992, Science 256:221225; Liu og Tam, 1994, J. Am. Chem. Soc. 116(10):4149-4153; Liu og Tam, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA

91:6584-6588; Yamashiro og Li, 1988, Int. J. Peptide Protein Res. 31:322-334). Segmentkondensering er en spesielt nyttig metode for å syntetisere utførelsesformer som inneholder interne glysin residier. Ande metoder som er nyttige for syntetisering av peptidene fra oppfinnelsen er beskrevet i Nakagawa et al., 1985, J. Am. Chem. Soc. 107:7087-7092.

ApoA-I agonister som inneholder N- og/eller C-terminale blokkeringsgrupper kan fremstilles ved å bruke standardteknikker innen organisk kjemi. For eksempel, er metoder for asylering av en N-terminal ende hos et peptid eller amidering eller esterifisering av den C-terminale enden til et peptid vel kjente innen fagfeltet. Måter for å utføre andre modifiseringer av N- og/eller C-terminal ende vil være tydelig for de som kjenner fagfeltet, det vil også metoder for å beskytte enhver sidekjedefunksionalitet som kan være nødvendig for å feste på terminale blokkeringsgrupper.

Farmasøytiske akseptable salter ("counter" ioner) kan lett bli fremstilt ved ionebytte-kromaotgrafi eller andre metoder vel kjent innen fagfeltet.

Forbindelser i følge oppfinnelsen som er i form av tandemmultimerer kan lett syntetiseres ved å tilsette linker(e) til peptidkjeden i det egnede trinnet i syntesen. Alternativt, kan helikssegmentene syntetiseres og hvert segment kan reagere med linkeren. Selvfølgelig vil de aktuelle metodene for syntese avhenge av sammensetningen til linkeren. Egnede beskyttende fremgangsmåter og kjemi er vel kjent, og vil være kjent for en fagperson.

Forbindelser fra oppfinnelsen som er i form av forgrenede nettverk kan lett bli syntetisert ved å bruke trimere og tetramere resiner og kjemi beskrevet i Tam, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5409-5413 og Demoor et al., 1996, Eur. J. Biochem. 239:74-84. Modifisering av syntetiske resiner og strategier for å syntetisere forgrenede nettverk av høyere eller lavere orden, eller som inneholder kombinasioner av forskjellige kjernepeptidhelikssegmenter, er godt innenfor evnen til den som kjenner fagfeltet peptidkjemi og/eller organisk kjemi.

Dannelse av disulfidbindinger, hvis ønskelig, blir generelt utført ved tilstedeværelse av milde oksyderende midler. Kjemisk oksyderingsmidler kan bli brukt, eller forbindelsene kan ganske enkelt bli eksponert til atmosfærisk oksygen for å effektuere disse koplingene. Forskjellige metoder er kjent innen fagfeltet, inklusiv de som er beskrevet, for eksempel av Tam et al., 1979, Synthesis 955-957; Stewart et al., 1984, Solid Phase

Peptide Synthesis, 2. Utg., Pierce Chemical Company Rockford, IL; Ahmed et al., 18975, J. Biol. Chem. 250:8477-8482; og Pennington et al., 1991 Peptides 1990 164-166, Giralt og Andreu, Utg., SCOM Leiden, The Netherlands. Et ytterligere alternativ er beskrevet av Kamber et al., 1980, Helv. Chim. Acta 63:899-915. En metode utført på fast støttemateriale er beskrevet av Albericio, 1985, Int. J. Peptide Protein Res. 26:92-97. Enhver av disse metodene kan brukes for å danne disulfidkoplinger i peptidene fra oppfinnelsen.

5.2.2 REKOMBINANT SYNTESE

Hvis peptidet kun er sammensatt av genkodede aminosyrer, eller en del av peptidet er sammensatt på den måten, kan peptidet eller relevant del også bli syntetisert ved å bruke konvensionelle rekombinante genetiske teknikker. For rekombinant produksion, blir en polynukleotidsekvens som koder for peptidet satt inn i en egnet ekspresionsbærer, dvs., en vektor som inneholder de nødvendige elementer for transkripsion og translasion av den innsatte kodende sekvensen, eller i tilfelle av en RNA viral vektor, de nødvendige elementer for replikasion og translasion. Ekspresionsvektoren blir deretter transfektert inn i en egnet målcelle som vil uttrykke peptidet. Avhengig av ekspresionssystemet som blir brukt, blir det uttrykte peptidet isolert ved prosedyrer som er veletablert innen fagfeltet. Metoder for rekombinant protein- og peptidproduksion er vel kjent innen fagfeltet (se, f.eks. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning A Laboratory Manua, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.; og Susubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y)

For å øke effektiviteten av produksion, kan polynukleotidene blir designet slik at de koder for multiple enheter av peptidet separert ved enzymatiske kutteseter - enten homopolymerer (repeterende peptidenheter) eller heteropolymerer (forskjellige peptider bundet sammen) kan bli konstruert på denne måten. Det resulterende polypeptidet kan bli kuttet (f.eks. ved behandling med det egnede enzymet) for å gjenvinne peptidenhetene. Dette kan øke utbytte av peptider som drives av en enkelt promoter. I en foretrukket utførelsesform, kan et polysistronisk polynukleotid designes slik at et enkelt mRNA blir transkribert som koder for multiple peptider (dvs., homopolymerer eller heteropolymerer) hver kodende region er operativt koplet til en cap-uavhengig translasionskontrollsekvens; f.eks. et internt ribosom startsete (IRES). Når den blir brukt i passende virale ekspresionssystemer, blir translasionen av hvert peptid kodet for av mRNA, rettet internt i transkriptet; f.eks. ved IRES. Den polysistroniske konstruksionen diregerer transkripsionen av et enkelt, stort polysistronisk mRNA som, igjen, diregerer

translasionen av multiple, individuelle peptider. Denne fremgangsmåten eliminerer produksion og enzymatisk prosessering av polyproteiner og kan signifikant øke utbytte av peptider drevet av en enkelt promoter.

Mange forskjellige vert-ekspresionsvektorsystemer kan bli benyttet for å uttrykke peptidene beskrevet heri. Disse inkluderer, men er ikke begrenset til, mikroorganismer slik som bakterier, transformert med rekombinant bakteriofag DNA eller plasmid DNA ekspresionsvektorer som inneholder en egnet kodende sekvens; gjær eller filamentøse sopp transformert med rekombinant gjær eller soppekspresionsvektorer som inneholder den egnede kodende sekvensen; insektscellesystemer infisert med rekombinant virusekspresionsvektorer (f.eks. baculovirus) som inneholder en egnet kodende sekvens; plantecellesystemer infisert med rekombinant virusekspresionsvektorer (f.eks. blomkål-mosaikkvirus eller tobakk-mosaikkvirus) eller transformert med rekombinant plasmidekspresionsvektorer (f.eks., Ti-plasmidet) som inneholder en egnet kodende sekvens; eller dyrecellesystemer.

Ekspresionselementene fra ekspresionssystemene varierer i deres styrke og spesifisitet. Avhengig av vert-vektorsystemet som benyttes, ethvert av antallet av egnet transkripsions- og translasionselementer, inklusiv konstitutive og induserbare promoterer, kan bli brukt i ekspresionsvektoren. For eksempel, når en kloner i bakteriesystemer, kan induserbare promoterer slik som pL fra bakteriofage λ, plac, ptrp, ptac (ptrp-lac hybridpromoter) og lignende bli brukt; når en kloner i insektcellesystemer, kan promoterer slik som baculovirus-polyhedronpromoter bli brukt; når en kloner i plantecellesystemer, kan promoterer avledet fra genomet til planteceller (f.eks. varmesjokkpromoterer; promoterer for den lille subenheten til RUBISCO; promoteren for klorofyll a/b-bindende protein) eller fra plantevirus (f.eks. 35S RNA promoteren fra CamV; kappeproteinpromoteren fra TMV) kan bli brukt; når en kloner i mammalske cellesystemer, kan promoterer avledet fra genomet til mamalske celler (f.eks. metallotioineinprometor) eller fra mammalske virus (f.eks. adenovirus senepromoter; vaksinia virus 7.5 K-promoter) kan blir brukt; når en danner cellelinjer som inneholder multiple kopier av ekspresionsprodukt, SV50-, BPV- og EBV-baserte vektorer kan bli brukt med en egnet seleksionsmarkør.

I tilfeller hvor plantekspresionsvektorer blir brukt, kan ekspresionen av sekvensene som koder for peptidene fra oppfinnelsen bli drevet av ethvert av et antall av promoterer. For eksempel, virale promoterer slik som 35S RNA og 19S RNA promoterer fra CaMV (Brisson et al., 1984, Nature 319:511-514), eller kappeproteinpromoteren til TMV

(Takamatsu et al., 1987, EMBO J. 6:307-311) kan bli brukt; alternativt, planteprornoterer slik som den lille subenheten til RUBISCO (Coruzzi et al., 1984, EMBO J. 3:1671-1680; Broglie et al., 1984, Science 224:838-843) eller varmesjokkpromoterene, f.eks. soyabønner hspl7.5-E eller hsp17.3-B /Gurley et al., 1986, Mol Cell. Biol. 6:559-565) kan bli brukt. Disse konstruksionene kan bli introdusert inn i plantecellene ved å bruke Ti-plasmidene, Ri-plasmidene, plantevirusvektorer, direkte DNA transformasion, mikroinjeksion, elektroforering, etc. For oversikt over disse teknikker se, f.eks. Weissbach & Weissbach, 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, s. 421-463; og Grierson & Corey, 1988, Plant Molecular Biology, 2. Utg., Blackie, London, kap. 7-9.

Et insektsekspresionssystem som kan brukes for å produsere peptider fra oppfinnelsen, brukes *Autographa californica*, nukleær polyhydrosis virus (AcNPV) som en vektor for å uttrykke fremmede gener. Viruset vokser i *Spodoptera frugiperda* celler. En kodende sekvens kan klones inn i ikke-essensielle regioner (for eksempel polyhedrongener) til viruset og plasseres under kontroll av AcNPV-promoter (for eksempel, polyhedronpromoter). Vellykket innsetting av den kodende sekvensen vil resultere i inaktivering av polyhedrongenet og produksion av ikke-okludert rekombinant virus (dvs., som mangler proteinkappen kodet for av polyhedrongenet). Disse rekombinante virusene blir deretter brukt får å infisere *Spdoptera frugiperda* celler hvori det innsatte genet blir uttrykt (f.eks. se Smith et al., 1983, J. Virol. 46:584; Smith, U.S. Patent No. 4.215.051). Ytterligere eksempler på dette ekspresionssystemet kan finnes i Current Protocols in Molecular Biology, Vo. 2, Ausubel et al., utg., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience.

I mammalske vertsceller, kan et antall viralt baserte ekspresionssystemer bli benyttet. I tilfelle hvor et adenovirus blir brukt som en ekspresionsvektor kan en kodende sekvens ligeres til en adenovirustranskripsion/translasionskontrollkompleks, f.eks. sen promoter og tripartitt ledersekvens. Dette kimære genet kan deretter bli satt inn i adenovirusgenomet ved *n vitro* eller *in vivo* rekombinasion. Insersion i en ikke-essensiell region hos det virale genomet (f.eks. region E1 eller E3) vil resultere i et rekombinant virus som er viabelt og i stand til å uttrykke peptidet i infuserte verter (f.eks. se Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81:3655-3659). Alternativt, kan vaksinia 7.5 K-promoter bli brukt, se f.eks. Mackett et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79:7415-7419; Mackett et al., 1984, J. Virol. 49:857-864; Panicali et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. 79:4927-4931).

Andre ekspresionssystemer for å produsere peptider fra oppfinnelsen vil være kjent for en fagperson.

5.2.3 RENSNING AV PEPTIDER

Peptidene fra oppfinnelsen kan bli renset ved kjente teknikker slik som revers-fasekromatografi høyutførelsesflytende kromatografi, ionebyttekromatografi, gelelektroforese, affinitetskromatografi og lignende. Aktuelle betingelser som brukes for å rense et spesiellt peptid vil avhenge, delvis, av syntesestrategi og av faktorer slik som nettoladning, hydrofobisitet, hydrofilisitet, etc., og vil være kjent for fagpersoner. Multimere forgrenede peptider kan bli renset, f.eks., ved ionebytte eller størrelseseksprесionskromatografi.

For affinitetskromatografirensning, kan ethvert antistoff med spesifikke bindinger til peptidet bli brukt. For produksion av antistoffer, kan forskjellige vertsdyr inklusiv, men ikke begrenset til, kaniner, mus, rotter, etc., blir immunisert ved injeksion med et peptid. Peptidet kan være festet til en egnet bærer, slik som BSA, ved metoder hvor sidekjedefunksionell gruppe eller linkere er festet til en sidekjedegruppe. Forskjellige adjuvanter kan brukes for å øke den immunologiske responsen, avhengig av vertsartene, inklusiv, men ikke begrenset til Freund's (fullstendig og ufullstendig) mineralgeler slik som aluminiumhydroksyd, overflateaktive substanser slik som lysolecitin, pluronpolyoler, polyanioner, peptider, oljeemulsioner, "keyhole limpet" hemocyanin, dinitrofenol, og potensielt nyttige humane adjuvanter slik som BCG (bacilli Calmette-Guerin) og *Corynebacterium parvum.*

Monoklonale antistoffer til et peptid kan fremstilles ved å bruke enhver teknikk tilveiebrakt for produksion av antistoffmolekyler ved kontinuerlige cellelinjer i kultur. Disse inkluderer, men er ikke begrenset til hybridomateknikk i utgangspunktet beskrevet av Cohler og Milstein, 1975, Nature 256:495.497, eller Kaprowski, U.S. patent nr. 4.376.110; human B-cellehybridomateknikk, Kosbor et al., 1983, Immunology Today 4:72; Cote et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:2026-2030); og EBV-hybrodomateknikk (Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., s. 77-96 (1985)). I tillegg, teknikker utviklet for produksion av "kimære antistoffer" Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81-6851-6855; Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314:452-454, Boss, U.S. patent nr. 4.816.397; Cabilly, U.S. patent nr. 4.816.567; ved å spleise genene

fra et museantistoffmolekyl til egnet antigenspesifisitet sammen med gener fra et humant antistoffmolekyl av egnet biologisk aktivitet som kan bli brukt. Eller "humanisert" antistoffer kan bli fremstilt (se, f.eks. Queen, U.S. patent nr. 5.585.089). Alternativt, kan teknikker beskrevet for produksion av enkle kjedeantistoffer (U.S. Patent nr. 4.946.779) bli tilpasset for å produsere peptidspesifikke enkeltkjedeantistoffer.

Antistoffragmentet som inneholder delesioner av spesifikke bindingsseter kan dannes ved kjente teknikker. For eksempel, inkluderer slike fragmenter, men er ikke begrenset til $F(ab')_2$-fragmenter, som kan bli produsert ved pepsinkutting av antistoffmolekylet og Fab-fragmentene, som kan dannes ved å redusere disulfidbroene til $F(ab')_2$-fragmentene. Alternativt, kan Fab-ekspresionsbibliotekene bli konstruert (Huse et al., 1989, Science 246:1275-1281) for å gi en rask og enkel identifisering av monoklonale Fab-fragmenter med ønsket spesifisitet for peptidet av interesse.

Antistoffet eller antistoffragmentet spesifikt for det ønskede peptidet kan bli bundet, for eksempel, til agarose og antistoffagarosekomplekset bli brukt i immunokromatografi for å rense peptider fra oppfinnelsen. Se, 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 FARMASØYTISKE FORMULERINGER OG METODER FOR BEHANDLING

ApoA-I agonistene fra oppfinnelsen kan bli brukt for å behandle enhver sykdom i dyr, spesielt pattedyr inklusiv mennesker, for økende serum HDL konsentrasion, aktivering av LCAT og for å fremme kolesterolstrømning og RCT. Slike betingelser inkluderer, men er ikke begrenset til hyperlipidemi, og spesielt hyperkolesterolemi, og kardiovaskulær sykdom slik som aterosklerose (inklusiv behandling og forebygging av aterosklerose); restenose (f.eks. å forebygge eller behandle ateroskleroseplakk som utvikles som en konsekvens av medisinske prosedyrer slik som ballongangioplasti); og andre sykdommer, slik som endotoksemi, som ofte resulterer i septisk sjokk. ApoA-I agonistene kan bli brukt alene eller i kombinasionsterapi med andre medikamenter for å behandle foregående tilstander. Slike terapier inkluderer, men er ikke begrenset til samtidig eller sekvensiell administrering av medikamentene som er involvert.

For eksempel, i behandling av hyperkolesterolemi eller aterosklerose, kan ApoA-I-agonistformuleringen bli administrert sammen med enhver eller flere av kolesterolsenkende terapier som for tiden er i bruk; f.eks., gallesaltresiner, niasin, og/eller statiner. Et slikt kombinert regime kan produsere spesielt fordelaktige terapeutiske effekter siden hvert medikament virker på forskjellige mål i kolesterolsyntesen og transport; dvs., gallesalt-resider virker inn på kolesterolresirkulering, kylomikron og LDL populasioner; niasin virker primært på VLDL og LDL populasionen; statinene inhiberer kolesterolsyntese, minsker LDL populasionen (og muligens øker LDL reseptorekspresion); mens ApoA-I agonister affekterer RCT, øker HDL, øker LCAT aktivitet og fremmer kolesterol-utstrømning.

I en annen utførelsesform, kan ApoA-I agonistene blir brukt sammen med filtrater for å behandle hyperlipidemi, hyperkolesterolemi og/eller kardiovaskulær sykdom slik som aterosklerose.

I ennå en annen utførelsesform, kan ApoA-I agonistene fra oppfinnelsen bli brukt i kombinasion med anti-mikrobielle midler og anti-aniflammatoriske midler som for tiden blir brukt for å behandle septisk sjokk og indusert ved endotoksin.

ApoA-I agonistene fra oppfinnelsen kan bli formulert som peptider eller peptid-lipid-komplekser som kan bli administrert til individene på forskjellige måter for å avlevere ApoA-I agonisten i sirkulasion. Eksempelformuleringer og behandlingsregimer er beskrevet under.

5.3.1 ApoA-I AGONISTER OG PEPETID/LIPIDKOMPLEKS SOM AKTIVT INGREDIENS

ApoA-I agonistpeptidene kan syntetiseres eller fremstilles ved å bruke enhver teknikk beskrevet i avsnitt 5.2 og i underavsnitt. Stabile fremstillinger som har en lang upåvirket tilstand kan fremstilles ved lyofilisering av peptidene - enten å fremstille volum for reformulering, eller å fremstille individuelle aliquoter eller doseenheter som kan bli rekonstituert ved rehydrering med sterilt vann eller en egnet steril bufret løsning forut for administrering til individet.

I visse utførelsesformer, kan det foretrekkes å formulere og administrere APOA-I AGONISten i et peptid-lipidkompleks. Denne tilnærmingen har flere fordeler siden komplekset skal ha en økt halveringstid i sirkulasion, spesielt når komplekset har lignende størrelse og tetthet til HDL, og spesielt pre-β-1 eller pre-β-2 HDL populasioner. Peptid-lipidkompleksene kan med letthet fremstilles ved enhver av metodene beskrevet under. Stabile fremstillinger som har en lang upåvirkningstid kan fremstilles ved lyofilisering, hvor ko-lyofiliseringsprosedyren beskrevet under er den foretrukne tilnærmingen. De lyofiliserte lipidkompleksene kan bli brukt for å fremstille volum for farmasøytisk reformulering, eller å fremstille individuelle aliquoter eller doseenheter som kan bli rekonstituert ved rehydrering med sterilt vann eller en egnet bufret løsning forut for administrering til et individ.

Mange forskjellige metoder vel kjent innen fagfeltet kan bli brukt for å fremstille peptid-lipid-vesikler eller komplekser. Et antall av tilgjengelige teknikker for å fremstille liposomer eller proteoliposomer kan bli brukt. For eksempel, kan peptider bli kosonikert (ved å bruke et bad eller en propesonikator) med egnede lipider for å danne komplekser. Alternativt kan peptidet bli kombinert med preformede lipidvesikler som resulterer i spontan dannelse av peptid-lipidkomplekset. I ennå et annet alternativ, kan peptid-lipidkompleksene bli dannet ved en detergentdialysemetode; f.eks., en blanding hvor peptidet, lipidet og detergentet blir dialysert for å fjerne detergente og rekonstituert eller danne peptid-lipidkomplekser (f.eks., se Ionas et al., 1986, Methods in Enzymol. 128:553-528).

Mens foregående tilnærminger er mulig, presenterer hver metode sine egne spesielle produksionsproblemer når det gjelder kostnad, utbytte, reproduserbarhet og sikkerhet. Søkerne har utviklet en enkelt metode for å fremstille peptid eller protein-fosfolipid-komplekser som har karakteristika i HDL. Denne metoden kan bli brukt for å fremstille ApoA-I-peptid-lipidkomplekset, og har følgende fordeler: (1) Det meste eller alle inkluderte ingredienser er brukt for å danne de designede kompleksene, for derved å unngå sløsing av startmaterialet som er vanlig ved andre metoder. (2) Lyofiliserte forbindelser blir dannet som er svært stabile under lagring. De resulterende kompleksene kan bli rekonstituert umiddelbart før anvendelse. (3) De resulterende kompleksene som vanligvis behøves, behøver ikke ytterligere rensning etter dannelse og før anvendelse. (4) Toksiske forbindelser, inklusiv detergenter slik som kolat, er unngått. Dessuten, kan produksionsmetoden lett skaleres opp og er egnet for GMP-fremstilling (dvs., i et endotoksinfritt miljø).

I samsvar med den foretrukne metoden, blir peptidet og lipidet kombinert i et løsningsmiddelsystem som ko-oppløser hver ingrediens og kan fullstendig fjernes ved lyofilisering. Løsningsmiddelpar må selekteres nøye for å sikre ko-oppløselighet av både det amfipatiske peptidet og lipidet. I en utførelsesform, kan proteinet(ene) eller peptidet(ene) som skal inkorporeres inn i partiklene bli løst i vandig eller organisk løsningsmiddel eller blanding av løsningsmidler (løsningsmiddel 2). (Fosfo) lipid-komponenten blir løst i et vandig eller organisk løsningsmiddel eller blanding av løsningsmidler (løsningsmiddel 2) som er blandbar med løsningsmiddel 1, og de to løsningene blir blandet. Alternativt, kan peptidet og lipidet bli inkorporert inn i et ko-løsningsmiddelsystem; dvs., en blanding av de blandbare løsningsmidlene. En egnet proporsion av peptidet (proteinet) til lipidene blir først bestemt empirisk slik at de resulterende kompleksene utviser egnede fysiske og kjemiske egenskaper; dvs., vanligvis (men ikke nødvendigvis) i samme størrelse som HDL. Den resulterende blandingen blir frosset og lyofilisert til den blir tørr. Noen ganger må et ytterligere løsningsmiddel bli tilsatt til blandingen for å lette lyofiliseringen. Dette lyofiliserte produktet kan lagres i lange perioder og vil forbli stabilt. I arbeidseksemplene beskrevet infra, ble peptid 146 (SEQ ID NO:146) og fosfolipider løst separat i metanol, kombinert, deretter blandet med xylen før lyofilisering. Peptidet og lipidet kan begge bli tilsatt til en blanding til de to løsningsmidlene. Alternativt, kan en løsning av peptidet løst i metanol bli blandet med en løsning av lipid løst i xylen. Man bør være forsiktig med å eliminere salt fra løsningssystemet for å unngå utsalting av peptidet. Den resulterende løsning som inneholder peptidet og lipid ko-løst i metanol/xylen blir lyofilisert for å danne et pulver.

Det lyofiliserte produktet kan bli rekonstituert for å erverve en løsning eller suspension av peptid-lipidkompleks. Det lyofiliserte pulveret blir rehydrert med en vandig løsning til et egnet volum (ofte 5 mg peptid/ml som er enkelt for intravenøs injeksion). I en foretrukket utførelsesform, blir det lyofiliserte pulveret rehydrert med fosfatbufret saltvann eller en fysiologisk saltvannsløsning. Blandingen kan behøve å ristes eller vortex-sentrifugering for å lette rehydreringen, og i de fleste tilfeller, kan rekonstitusionstrinnet bli utført ved romtemperatur den samme eller høyere enn den fase-transisionstemperaturen til lipidkomponenten i kompleksene. Innen minuttet, vil en klar fremstilling av rekonstituert lipid-proteinkomplekser være resultatet.

En aliquot av resulterende rekonstituerte fremstilling kan karakteriseres for å bekrefte at kompleksene i fremstillingen har den ønskede størrelsesdistribusion; f.eks., størrelsesdistribusion av HDL. Gelfiltreringskromatografi kan bli brukt på dette punkt. I arbeidseksemplene beskrevet infra, ble et Pharmacia Superose 6 FPLC gelfiltreringskro-

matografisystem brukt. Bufferen som ble brukt inneholdt 150 mM NaCl i 50 mM fosfatbuffer, pH 7.4. Et typisk prøvevolum er 20 til 200 mikroliter av kompleksene som inneholder 5 mg peptid/ml. Kolonnegjennomstrømningsraten er 0.5 ml/min. En serie av proteiner av kjent molekylvekt og Stokes' diameter såvel som humant HDL ble brukt som standarder for å kalibrere kolonnen. Proteinene og lipoprotein-kompleksene blir målt ved absorbans eller spredning av lys ved bølgelengder 254 eller 280 nm.

ApoA-I agonistene fra oppfinnelsen kan danne kompleks med forskjellige lipider, inklusiv mettede, umettede, naturlige og syntetiske lipider og/eller fosfolipider. Egnede lipider inkluderer, men er ikke begrenset til, små alkylkjedefosfolipider, eggfosfatidylkolin, soyabønnefosfatidylkolin, dipalmitoylfosfatidylkolin, dimyristoylfosfatidylkolin, disterearoylfosfatidylkolin 1-myristoyl-2-plamitoylfosfatidylkolin, 1-malitoyl-2-myristoylfosfatidylkolin, 1-palmitoyl-2-myristoylfosfatidylkolin, 1-palmitoyl-2- stearoylfosfatidylkolin, 1-stearoyl-2-palmitoylfosfatidylkolin, dioleoylfosfatidylkolin dioleofosfatidyletanolamin, dilauroylfosfatidylglyserol fosfatidylkolin, fosfatidylserin, fosfatidyletanolamin, fosfatidylinositol, sfingomyelin, sfingolipider, fosfatidylglyserol, disosfatidylglyserol, dimyristoylfosfatidylglyserol, dipalmitoylfosfatidylglyserol, distearoylfosfatidylglyserol, dioleoylfosfatidylglyserol, dimyristoylfosfatidsyre, dipalmitoylfosfatidsyre, dimyristoylfosfatidyletanolamin, dipalmitoylfosfatidyletanolamin, dimyristoylfosfatidylserin, dipalmitoylfosfatidylserin, hjernefosfatidylserin, hjernespingomyelin, dipalmitoylsfingomyelin, distearoylsfingomyelin, fosfatidsyre, galaktocerebrosid, gangliosid, cerebrosid, dilaurylfosfatidylkolin, (1,3)-D-mannosyl-(1,3)diglyserid, aminofenylglykosid, 3-kolesteryl-6'-(glykosyltio)heksyleterglykolipider, og kolesterol og dets derivater.

Søkerne har oppdaget at når ApoA-I agonister fra oppfinnelsen er i kompleks med sfingomyelin, blir alle HDL fra pre-β-lignende partikler fjernet. Følgelig, i en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen, er ApoA-I agonister administrert som et kompleks med sfingomyelin.

5.3.2 METODER FOR BEHANDLING

ApoA-I peptidagonister eller peptid-lipidkomplekser i følge oppfinnelsen kan administreres ved enhver egnet måte som sikrer biotilgjengelighet i sirkulasion. Dette

kan best oppnås ved parenterale måter for administrering, inklusiv intravenøs (IV), intramuskulær (IM), intradermal, subkutan (SC) og intraperitonal (IP) injeksioner. Imidlertid, kan andre måter for administrering bli brukt. For eksempel, absorpsion gjennom magetarmsystemet kan fullføres ved orale måter for administrering (inklusiv, men ikke begrenset til fordøyelse, buccal og sublinguale måter) forutsatt at man har egnede formuleringer (f.eks., enteriske overtrekk) som blir brukt for å unngå eller minimalisere degradering av den aktivte ingrediensen, f.eks., i det harske miljøet i oralmucosa, mage og/eller tynntarmen. Alternativt, kan administrering via mukøst vev slik som vaginale og rektale måter for administrering bli utnyttet for å unngå eller minimalisere degradering i magetarmkanalen. Ennå et annet alternativ, kan formuleringene fra oppfinnelsen administrert transkutant (f.eks., transdermalt), eller ved inhalering. De foretrukne måtene kan variere med tilstand, alder og i overensstemmelse med resipienten.

Aktuell dose av ApoA-I agonister eller peptid-lipidkompleks brukt vil variere med måten for administrering, og vil måtte justeres for å oppnå sirkulerende plasmakonsentrasioner på 100 mg/l til 2 g/l. Data ervervet i dyremodellsystemer, beskrevet heri viser at ApoA-I agonister fra oppfinnelsen assosiert med HDL komponenten, og har en projisert halveringstid i mennesket på omtrent fem dager. Derfor, i en utførelsesform, kan ApoA-I agonistene bli administrert ved injeksion i en dose på mellom 0.5 mg/kg til 100 mg/kg en gang i uken. I en annen utførelsesform, kan ønskelig serumsnivåer opprettholdes ved kontinuerlig infusion eller ved periodisk infusion som gir omtrent 0.5 mg/kg/time til 100 mg/kg/time.

Toksisitet og terapeutisk effektivitet av de forskjellige ApoA-I agonistene kan bli bestemt ved å bruke standard farmasøytiske prosedyrer i cellekultur eller eksperimenteringsdyr for å bestemme LD_{50} (letal dose til 50% av populasionen) og ED_{50} dose som er terapeutisk effektiv i 50% av populasionen). Doseratioen mellom toksisk og terapeutisk effekt er den terapeutiske indeksen og kan uttrykkes som ratio LD_{50}/ED_{50}. ApoA-I peptidagonistene som utviser større terapeutiske indisier er foretrukket.

5.3.3 FARMASØYTISKE FORMULERINGER

Den farmasøytiske formuleringen fra oppfinnelsen inneholder ApoA-I peptidagonist eller peptid-lipidkompleks som aktiv ingrediens i en farmasøytisk akseptabel bærer egnet for administrering og avlevering in vivo. Siden peptidene kan inneholde sure

og/eller basiske terminale ender og/eller sidekjeder, kan peptidene bli inkludert i formuleringer i enten form av frie syrer eller baser, eller i form av farmasøytiske akseptable salter.

Injiserbare fremstillinger inkluderer sterile suspensioner, løsninger eller emulsioner av den aktive ingrediensen i vandig eller oljeløsningsmidler. Sammensetningene kan også inneholde formuleringsmidler, slik som suspenderende, stabiliserende og/eller disperserende middel. Formuleringene for injeksion kan være tilstede i enhetsdoseform, f.eks., i en ampuller eller i multidosebeholdere, og kan inneholde tilsatte konserverings-midler. Alternativt, kan injiserbar formulering tilveiebringes i pulverform for rekonstituering med et egnet løsningsmiddel, inklusiv, men ikke begrenset til, sterilt pyrogenfritt vann, buffer, dekstroseløsning, etc., før bruk. ApoA-I agonisten kan blir lyofilisert, eller ko-lyofilisert peptid-lipidkompleks kan blir fremstilt. De lagrede fremstillingene kan blir supplert i enhetsdoseformer og rekonstituert for bruk in vivo.

For forlenget avlevering, kan den aktive ingrediensen blir formulert som en depotfremstilling, for administrering ved implantering, f.eks. subkutant, intradermalt, eller intramuskulær injeksion. Derfor kan den aktive ingrediensen bli formulert ved egnede polymere eller hydrofobe materialer (f.eks., som en emulsion i en akseptabel olje) eller ionebytteresiner, eller som sparsomme løselige derivater; f.eks., som sparsomt løselig saltform av ApoA-I agonisten.

Alternativt, kan transdermale avleveringssystemer fremstilt som tilfestede skiver eller "patch" som langsomt frigir den aktive ingrediensen for perkutan absorpsion bli brukt. Permeringsforsterkere kan blir brukt for å lette transdermal penetrasion av den aktive ingrediensen. En spesiell fordel kan oppnås ved å inkorporere ApoA-I agonistene fra oppfinnelsen eller peptid-lipidkompleks inn i et nitroglyserin "patch" for anvendelse hos pasienter med iskemisk hjertesykdom og hyperkolesterolemi.

For oral administrering, kan farmasøytiske sammensetninger ta form av, for eksempel, tabletter eller kapsler fremstilt ved konvensionelle metoder med farmasøytisk akseptable eksepienter slik som bindingsmidler (f.eks., pregelatinisert maisstivelse, polyvinylpyrrolidon eller hydroksypropylmetylcellulose); fyllere (f.eks., laktose, mikrokrystallinsk cellulose eller kalsiumhydrogenfosfat); lubrikanter (f.eks., magnesiumstearat, talkum eller silisiumdioksid); disintegranter (f.eks., potetstivelse eller natriumstivelseglysolat); eller fuktighetsmidler (f.eks., natriumlaurylsulfat). Tablettene kan bli trukket ved metoder vel kjent innen fagfeltet. Flytende fremstillinger

for oral administrering kan ta form av, for eksempel, løsninger, siruper eller suspensioner eller de kan bli presentert som et tørt produkt for konstituering med vann eller andre egnede bindemidler før anvendelse. Slike flytende fremstillingen kan bli fremstilt ved konvensionelle måter med farmasøytisk akseptable tilsetninger slik som suspenderingsmidler (f.eks., sorbitolsirup, cellulosederivater eller hydrogenert spisbart fett); emulsifierende midler (f.eks., lekitin eller akasia): ikke-vandige bindemidler (f.eks., mandelolje, oljeestere, etylalkohol eller fraksionerte vegetabilske oljer); og konserveringsmidler (f.eks., metyl eller propyl-p-hydroksybenzoater eller sorbinsyre). Fremstillingene kan også inneholde buffersalter, smak, farge og søtningsmidler som er passende. Fremstillinger for oral administrering kan være egnet formulert ved å gi kontrollert frigivelse av den aktive forbindelsen. For buccal administrering, kan sammensetningene ta form av tabletter eller pastiller formulert på konvensionell måte. For rektale og vaginale måter for administrering, kan den aktive ingrediensen bli formulert som løsninger (for retensionstarmskyllinger) suppositorier eller salver.

For administrering ved inhalering, kan den aktive ingrediensen med letthet bli avlevert i form av en aerosolspray presentert fra trykkisolerte pakninger eller en forstøver med anvendelse av et egnet drivmiddel, f.eks., diklorodifluorometan, triklorofluorometan, diklorotetrafluoroetan, karbondioksid eller annen egnet gass. I tilfelle av en trykkisolert aerosol kan doseenheten blir bestemt ved å tilveiebringe en ventil for å avlevere en utmålt mengde. Kapslene og innsatsene av f.eks. gelatin for anvendelse som inhaleringsapparat eller insufflator kan bli formulert å inneholde en pulverblanding av forbindelsen og en egnet pulverbase slik som laktose eller stivelse.

Sammensetningene kan, hvis ønskelig, bli presentert i en pakke eller en beholderinnretning som kan inneholde en eller flere enhetsdoseformer som inneholder den aktive ingrediensen. Pakken kan for eksempel omfatte metall eller plastikkfolie, slik som "blister" pakke. Pakken eller beholderinnretningen kan følges av instruksioner for administrering.

5.4 ANDRE ANVENDELSER

ApoA-I agonister fra oppfinnelsen kan bli brukt i analyser in vitro for å måle serumholdig HDL, f.eks., for diagnostiske formål. Fordi ApoA-I agonistene assosiert med HDL komponenten i serum, kan agonistene blir brukt som "markører" for HDL populasionen. Dessuten kan agonistene blir brukt som markører for subpopulasionen av

HDL som er effektive i RCT. Agonisten kan bli tilsatt til eller blandet med en pasientserumprøve; etter en egnet inkubasionstid, kan HDL komponenten blir analysert ved å detektere inkorporert ApoA-I agonist. Dette kan bli fullført ved å bruke merkede agonister (f.eks., radiomerkede, fluorescensmerkede, enzymmerkede, farger, etc.), eller ved immunoanalyser ved å bruke antistoffer (eller antistoffragmenter) spesifikke for agonistene.

Alternativt, kan merket agonist bli brukt i avbildningsprosedyrer (f.eks., CAT scanninger, MRI scanninger) for å visualisere deres sirkulatoriske system, eller for å måle RCT, eller for å visualisere akkumulering av HDL i fettstreker, aterosklerotiske lesioner, etc. (hvor HDL skulle være aktiv i kolesterolutstrømning).

6. EKSEMPEL: SYNTESE AV PEPTIDAGONISTER FRA ApoA-I

Peptidene beskrevet i TABELL X (avsnitt 8.3, infra) ble syntetisert og karakterisert som beskrevet i avsnittene under. Peptidene ble også analysert strukturelt og funksionelt som beskrevet i avsnittene 7 og 8 infra.

6.1 SYNTESE AV KJERNEPEPTIDENE

Peptidene ble syntetisert på fastfase ifølge Merrifield technique (Merrifield, 1969, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154) ved å bruke 0.25 mmol ρ-alkoksybenzylalkohol resin (HMP resin) (Wang, 1973, J. Am. Chem. Soc. 95:1328-1333) og Fmoc kjemi. All syntese ble utført på et Applied Biosystems ABI modell (430A automatisert peptidsyntetiseringsmaskin (Perking-Elmer, Foster city, CA). Oppløsning og aktiveringstider brukt for hver koplingssyklus er vist i TABELL V under:

TABELL V
ENKEL KOPLINGSAKTIVATORSYKLUS

Syklusnavn	Aminosyrenes navn	Oppløsnings-Middel	Tid	Aktiveringstid	Overføringstider *
afmc 31	Asn (trt), His (trt), Lys (Box), Trp	~0.4ml DCM ~1.2ml NMP ~1.0 ml HOBt/NMP	~7 min.	~51 min.	1=50 sek. 2=36 sek.
afmc 32	Arg (Pmc), Gln (trt); Aıb	~0.8ml DCM ~1.2ml NMP ~1.0ml HOBt/NMP	~32 mın.	~51 min.	1=60 sek. 2=40 sek.
afmc 33	Ala, Asp (OtBu) Glu (OtBu),Glu Ile, Leu, Met,phe,Pro	~0.4ml DCM ~0.8ml NMP ~0.1ml HOBt/NMP	~4min.	~36.5 min	1=38 sek. 2=27 sek.
Afmc 34	Val	~0.4ml DCM ~0.8ml NMP ~ HOBt/NMP	~4 min.	~61.5 min.	1=38 sek. 2=27 sek.
* 1=Overføring fra innsatsen til aktivatoren. 2=Overføring fra aktivatoren til innsatsen.					
DCC er dicykloheksylkarbodiimid			BOC er t-butyloksykarbonyl		
HOBt er 1-hydroksybenzotriazol			Pmc er pentametylkroman-6-sulfonyl		
NMP er N-metylpyrrolidon			OtBu er t-butylester trt er trityl		

Resinene ble vasket med NMP mellom hvert koplingstrinn. Protokollen for en syntesesyklus er vist under i TABELL VI:

TABELL VI
KOPLINGSPROTOKOLL FOR EN SYNTESESYKLUS

Arbeidsoperasion	Tid (min.)
1. Deprotektering (10% piperıdin i NMPI	20
2. Vask (NMP	5
3. Kopling (4 ekvivalenter, Fmoc-aminosyre-HOBT-ester i NMP, preaktivert 50 min.)	61
4. Vask	3
5. Resinprøve (valgfritt)	3
Total	92

Alle aminosyrer med unntak av Fmoc-β-(1-naftyl)alanin ble koplet på denne måten. Fmoc-β-(1-naftyl)alanin ble koplet manuelt. For manuell kopling ble 1 mmol Fmoc-β-(1-naftyl)alanin og 1 mmol 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyluroniumtetrafluoroborat (TBTU) løst i 5 ml NMP og blandet med peptidresin.

Deretter, ble 2 mmol av N-etyldiisopropylamin tilsatt, blandingen ble risten i 2 timer og peptidresinen vasket 6 ganger med 10 ml NMP. Koplingseffektiviteten ble målt ved å bruke Kaiser-test (Kaiser, 1970, Anal. Biochem. 34:59577), og koplingen ble repetert hvis nødvendig. Etter kopling av naftylalanin, ble det gjenværende av syntesen utfelt automatisk som beskrevet over.

6.2 SYNTESE AV PEPTIDAMIDER

Hvor indikert i TABELL X (avsnitt 8.3, infra), peptidamidene ble syntetisert ved å bruke en Rink-amidresin som inneholdt Fmoc-Rink-amingrep 4-(2',4'-dimetylfenyl)-Fmoc-fenoksymetyl (Rink, 1987, Tetrahedron Lett. 28:3787-3790) og synteseprotokollene beskrevet i avsnitt 6.1, supra.

6.3 SYNTESE AV N-TERMINAL ASYLERTE PEPTIDER

Hvor indikert i TABELL X (avsnitt 8.3, infra), N-terminal asylerte former av peptidene ble fremstilt ved å eksponere resinbundet peptid fremstilt som beskrevet i avsnitt 6.1 eller 6.2, supra, til et egnet asyleringsmiddel.

For N-terminal asetylerte peptider, ble 15 ml eddikanhydridløsning (10% v/v i NMP) tilsatt til hvert gram av resinbundet peptid, blandingen ble risten i 5 min. og resinen gjenvunnet ved filtrering. Den gjenvunnende resinen ble vasket tre ganger med NMP (15 ml) og tre ganger med etanol (15 ml).

6.4 KUTTING OG DEPROTEKTERING

Følgende synteser, av peptidene beskrevet i avsnittene 6.1, 6.2 og 6.3, supra, ble kuttet fra resinet og deprotektert med en kuttingsløsning som inneholdt 92.5% trifluoreddiksyre (TFA)/3.7% i anisol/3.75% dodekantiol (v/v/v). For å effektuere

kuttingen ble 10 ml av kuttingsløsningen tilsatt til 0.25 mmol peptidresin og omrørt i 1.5 time ved romtemperatur. Resinen ble fjerne via filtrering og det kuttede/deprotekterte peptidet presipitert med dietyleter, vasket med eter og tørket in vacuo.

Kuttcocktailen for peptider som inneholdt Trp (W), såvel som for peptidamider, var sammensatt av 86.5% TFA, 4.5% H_2O, 4.5% 1,2-etanditiol, 4.5% anisol og 3% fenol.

6.5 RENSNING

De urene, kuttede peptidene i avsnitt 6.4 ble renset ved reversfase HPLC. Renheten til hvert peptid ble bekreftet ved forskjellige analytiske teknikker (analytisk HPLC, capillar elektroforese). Kapillar elektroforese). Kapillar elektroforese ble utført på sammensmeltet silikakapillarer på 70 cm's lengde og en intern diameter på 75 µm (Thermo Separation Products). Separasionene ble utført ved 25°C, 15 kV, kjøringstid 35 min., i to forskjellige buffersystemer: Buffer 1 (20 mM $Na_2B_4O_7$, pH 9.2) og Buffer 2 (10 mM Na_2HPO_4, pH 2.5). HPLC separasioner ble utført på Nucleosil 7C18 eller Nucleosil 7C4 kolonner (Macherey og Nagel, Germany), 250 x 21 mm, med en gjennomstrømningsrate på 8 ml/min. Gradientselueringen ble utført ved å bruke en blanding av 0.1 TFA i vann (løsning A) og 0.1% TFA i acetonitril (løsning B). Gradientene som ble brukt ble justert for å møte behovet til hvert peptid.

6.6 KARAKTERISERING

Masse og aminosyreanalyse av de rensede peptidene beskrevet i avsnitt 6.5. ble bekreftet via massespektrometri og aminosyreanalyse, respektiv, som beskrevet under. Edman degradering ble brukt for sekvensering.

6.6.1 LC-MS

En standard kommersielt tilgjengelig trykkstadiumskvadruppel-massespektrometer (model TSQ 700; Finnigan MAT, San Jose CA, USA) ble brukt for massebestemmelser. En pneumatisk assistert elektrospray (ESI) interfase ble brukt for prøveintroduksion til atmosfærisk trykk ioniseringskilde av massespektrometeret. Interfasesprayen ble anvendt ved et positivt potensial på 4.5 kV. Temperaturen til stålkapillaret ble holdt til

200°C mens manifoldet var ved 70°C. Positive ioner dannet ved denne ioneevaporeringsprosessen gikk inn i analysatoren til massespektrometeret. "Multiplieren" ble justert til 1000 V. Analysedelen av massespektrometeret var ved 4E-6. Alle akvisisioner ble utført med en oppløsning på < lu.

Peptidene ble analyser ved direkte infusion av de rensede peptidene ved å bruke en ABI (Applied Biosystems) mikroboresystem som besto av en sprøytepumpe (modell 140 B), en UV-detektor (modell 785A) og en ovn/injektor (modell 112A). Løsningsmiddelsystemet besto av vann (løsningsmiddel A) og acetonitril (løsningsmiddel B), som hver inneholdt 0.1% TFA. Peptidene ble infusert ved å bruke enten en gradient eller isokratiske betingelser og eluert fra en Aquapore C18-kolonne. Strømningsraten var typisk 300 µl/min. Konsentrasionen av hvert peptid var omtrent 0.03 mg/ml, hvor 20 µl ble injisert (f.eks., 30 pmol).

Fullscannings-MS-eksperimentet ble ervervet ved å scanne kvadruppel 1 fra m/z 500-1500 i 4s. Data ble oppnådd ved å bruke Alpha DEC-stasion og ble prosessert ved å bruke software-pakke tilveiebrakt av Finnigan MAT (BIOWORKS).

6.6.2 AMINOSYREANALYSE

Aminosyreanalyse ble utført på en ABI (Applied Biosystems) 420 aminosyre-analyseringsmaskin. Dette systemet besto av tre moduler: et hydrolyse- og derivateringsinstrument, en reversfase-HPLC og et datasystem. Peptidprøven ble påsatt, (3 ganger i triplikat) på porøse glassplater og deretter hydrolysert under gassfase-betingelser (155°C, 90 min.) Etter fjerning av HCL, ble resulterende aminosyrer konvertert til PTC-AA (fenyltiokarbamoyl-aminosyrer) ved å bruke PITC (fenylisotiocyanat). Etter overføring til HPC-prøveløkke ble de resulterende blandingene fraksionert på en Aquapore C18-kolonne ved å bruke gradientmetoden (løsningsmiddel A: 50 mmol ammoniumacetat (NH_4AC), pH 5.4 i vann; løsningsmiddel B: 32 mmol av natriumacetat (NaOAc) i vandig acetonitril) under betingelser av temperaturkontroll. HPLC-data ble prosessert ved bruk av softwarepakken tilveiebrakt av Applied Biosystems. Kvantifisering ble utført relativt til peptidstandard levert Applied Biosystems.

6.7 SYNTESE AV FORGRENEDE NETTVERK

Tetrameriske kjernpeptidylresin og trimerisk kjernepeptidylresin blir syntetisert som beskrevet i Demoor et al., 1996, Eur. J. Biochem. 239:74-84. Tetramerisk og trimeriske kjernematriks fortsatt koplet til 4-metyl benzhydralaminresin blir deretter brukt som initiell peptidylresin for automatisert syntese av kjernepeptider som tidligere beskrevet.

Forgrenede nettverk som inneholder helikssegmenter fra forskjellige aminosyresammensetninger kan bli syntetisert ved å bruke ortogonalsyntese og beskyttende strategier vel kjent innen fagfeltet.

7. EKSEMPEL: STRUKTURELLE OG LIPIDBINDINGSANALYSE AV ApoA-I PEPTIDER

Strukturelle og lipidbindende karakteristika av rensede peptider syntetisert som beskrevet i avsnitt 6, supra, ble bestemt ved sirkulær dikroisme (CD), fluorescensspektroskopi og nukleær magnetisk resonans (NMR).

7.1 SIRKULÆR DIKROISME

Dette eksemplet beskriver en foretrukket metode for å bestemme grad av helisitet i kjernepeptidene fra oppfinnelsen både fritt i buffer og ved tilstedeværelse av lipider.

7.1.1 EKSPERIMENTELL METODE

Lang UV-sirkulær dikroismespektrum ble tatt opp mellom 190 og 260 nm (i 0.5 nm eller 0.2 nm inkrementer) med en AVIV62DS spektrometer (AVIV Associates, Lakewood, NJ, USA) utstyrt med en termoelektrisk celleholder og prøvebytter. Instrumentet ble kalibrert med (+) -10- kamporinsyre. Mellom en og tre scannere ble samlet inn for hver prøve, ved å bruke 10 cm, 5 cm, 1 cm og 0.1 cm veilengdekvartssupraceller, respektiv, for peptidkonsentrasioner på 10^{-7} M til 10^{-4} M. Båndvidden ble fiksert ved 1.5 nm og scanningshastigheten til 1 sek pr bølgelengdetrinn. Rapportert data er gjennomsnittet av minst 2 eller 3 uavhengige målinger.

Etter bakgrunnssubstraksion, ble spektre konvertert til molar elliptisitet (θ) pr residie i deg. cm^{-2} $dmol^{-1}$. Peptidkonsentrasionen ble bestemt ved aminosyreanalyse og også ved absorpsionsspektrometri på en Perkin Elmer Lambda 17 UV/synlig spektrofotometer når peptidet inneholdet en kromofor /tryptofan, dansyl, naftylalanin).

CD-spektrum ble ervervet med fritt, ubundet peptid (5 µM i 5 mM fosfatbuffer, pH 7.4); med peptid-SUV-komplekser (20:1 EPC:Chol., Ri=30 og Ri=50); med pepetidmicelle-komplekser (1-myristoyl-2-hydroksy-sn-glysero-3-fosfatidylkolin, (Ri=100); og med fritt, ubundet peptid med tilstedeværelse av 2,2,2-trifluoretanol (TFE) (5 µM peptid, 90% vol TFE).

SUV ble ervervet ved å dispersere lipidene (10 mM, 20:1 EPC:Chol., Avanti Polar Lipids, AL) i fosfatbuffer (5 mM, pH 7.4) med N_2 bobling i 5 min., etterfulgt av sonikering (1.5 timer) i et badsonikator. Homogeniteten til fremstillingen ble sjekket ved FPLC.

Miceller ble ervervet ved å dispersere lipid (6 mM 1-myristoyl-2-hydroksy-sn-glysero-3-fosfatidylkolin, Avanti Polar Lipids, AL) i fosfatbuffer (5 mM, pH 7.4) med boblende N_2 i 5 min., etterfulgt av vortex-sentrifugering.

For å erverve peptid-SUV-komplekser, ble SUV tilsatt til peptidet (5 µM i 4 mM fosfatbuffer, pH 7.4) ved et fosfolipid-peptid-molarratio (Ri) på 30 eller 50.

For å erverve peptid-micellekompleksene, ble micellene tilsatt til peptidet (5 µM i 5 mM fosfatbuffer, pH 7.4) med en Ri på 100.

Alle spektrene ble opptegnet ved 37°C.

7.1.2 HELISITETBESTEMMELSE

Grad av helisitet til peptidene i forskjellige tilstander ble bestemt fra gjennomsnittsresidieelliptisitet ved 222 nm (Chen et al., 1974, Biochemistry 13:3350-3359) eller ved å sammenligne CD-spektra ervervet til referansespektra tilgjengelig på databaser (16 heliksreferansespektra fra Provencher & Glockner, 1981, Biochemistry 20:33-37; denaturert proteinreferansespektra fra Venyaminov et al., 1993, Anal. Biochem. 214:17-24) ved å bruke CONTIN kurvetilpasningsalorytmeversion 2DP, CD-

1 pack (aug. 1982) (Provencher, 1982, Comput. Phys. Commun. 27:213-227, 229-242). Akseptabel tilpasning ble bestemt ved å bruke statistisk analysemetodologi tilveiebrakt ved CONTIN agorytme. Feilen til alle metodene var ±5% helisitet.

Peptid **146** (SEQ ID NO:146) inneholder en svært høy α-heliksinnhold (86% helisitet) i buffer ved en konsentrasion på 5 μM. Helisiteten til peptid **146** (SEQ ID NO:146) øker ved tilstedeværelse av både SUV (100% helisitet) og miceller (100% helisitet) og også ved tilstedeværelse av TFE (95% helisitet), som er et løsningsmiddel som, på grunn av å ha signifikant lavere dielektrisk konstant (ε=26,7) enn vann (ε=78.4), stabiliserer α-helikser og intrapeptidhydrogenbindinger ved konsentrasioner mellom 5 - 90% (v/v).

Ved referanse til TABELL X, avsnitt 8.3, infra, kan det sees at de peptidene som utviser en høy grad av LCAT aktivering (≥38%) generelt utviser signifikant α-heliksstruktur ved tilstedeværelse av lipider (≥60%) heliksstruktur i tilfelle av ublokkerte peptider som inneholdt 22 eller flere aminosyrer eller blokkerte peptider som inneholdt 18 eller færre aminosyrer; ≥40% heliksstruktur i tilfelle av ublokkerte peptider som innehold 18 eller færre aminosyrer), mens peptider som utviser liten eller ingen LCAT aktivering utviser liten α-heliksstruktur. Imidlertid, i noen tilfeller, peptider som inneholder signifikant α-heliksstruktur ved tilstedeværelse av lipider utviser ikke signifikant LCAT aktivering. Som en konsekvens, er evnen til kjernepeptidene fra oppfinnelsen å adoptere en α-heliksstruktur i tilstedeværelse av lipider betraktet som et kritisk trekk til kjernepeptidene fra oppfinnelsen, siden evnen til å danne en α-heliks ved tilstedeværelse av lipider ser ut til å være en forutsetning for LCAT aktivering.

7.2 FLUORESCENSSPEKTROSKOPI

De lipidbindende egenskapene til peptidene syntetisert i avsnitt 6, supra, ble testet med fluorescensmålinger med merkede peptider i tilfelle av tryptofan (Trp eller W) eller naftylalanin (Nal). Fluorescensspekteret ble avtegnet på en Fluoromax fra Spex (Jobin-Yvon) utstyrt emd en Xenon-lampe på 150W, to monokromatorer (eksitasion og emision), en fotomultipliserer R.928 for deteksion av det sensitive i rødt opp til 850 nm og en termoelektrisk magnetisk omrørt celleholder. Quartz Suprasil kuvetter ble brukt for målinger i det mikromolære konsentrasionsområdet. En innretning for variable sprekker (fra 0.4 til 5 nm) tillot modulering av insident og emiterte intensiteter ifølge konsentrasionene til peptidene som ble brukt. De rapporterte verdiene er generelt gjennomsnittet av 2 til 4 spektra. Peptidkonsentrasionen blir bestemt ved

absorpsionsspektrometri på en Philips PU 8800 ved å bruke absorpsionsbåndet til Trp ($\varepsilon_{280\ nm}$=5,550 $M^{-1}cm^{-1}$ i Tris-buffer) eller Nal ($\varepsilon_{224\ nm}$=92,770 $m^{-1}cm^{-1}$ i metanol).

Fluorscensspektra til peptidene ble målt mellom 290 nm og 450 nm i Tris-HCl-buffer (20 mM, pH=7.5), ved tilstedeværelse og fravær av lipidiske vesikler. De små unilamellære vesiklene ble dannet etter rehydrering i buffer av de lyofiliserte fosfolipidene, dispersion av tupp-sonifikering under en N_2-strøm. Lipidene som ble brukt var enten Egg PC/Chol. (20:1) eller POPC/Chol. (20:1). Spektra ble målt ved en peptidkonsentrasion på 2 μM og en temperatur på 37°C. Fluorescensreferansestandard i tilfelle av Tfp var N-acetyltryptofanylamid (NATA).

Lipidbindingsstudier ble utført gjennom progressiv lipidvesikkeltilsetning til peptidet i løsning ved 2 μM (sprekker:5nm i eksitasion og 1.5 nm i emision). Fortynningseffektene ble tatt med i beregning for fluorescensintensitetbestemmelse. Lipidkonsentrasionene varierte fra 10 til 600 μM og den molare ratio av lipid til peptid (Ri) varierte fra 5 til 300. Bølgelengden for eksitasion var satt til 280 nm for både Trp og Nal.

7.2.1 FLUORESCENS SPEKTRALANALYSE

Dataene ble direkte nedtegnet og behandlet ved en IBM-PC koplet til spektrofluorimeter gjennom DM3000F software fra Spex. Spekteret ble korrigert ved subtraksion av løsningsmiddelets bidrag og ved anvendelse av en koeffisient gitt ved konstruktoren hvor det ble tatt med i beregning variasionen til fotomultipliseringsresponsen versus bølgelengden.

Fluorescensspektra av peptidene ble karakterisert ved bølgelengden ved deres maksimum av fluorescensemision og deres kvantumsutbytte sammenlignet med NATA i tilfelle av peptider merket med tryptofan. Prosessen for binding til lipidene ble analysert ved å beregne skifte i bølgelengde ved maksimum fluorescensemision, (λ_{max}), og variasionen av relativ fluorescensintensitet av emision versus lipidkonsentrasion. Den relative fluorescensintensiteten er definert som følgende ratio: $(I-I_0)_{\lambda max}/I_{0\lambda max}$. I og I_0 er begge målt ved (λ_{max}) korresponderende til det initielle frie stadie til peptidet, dvs., uten lipider. I er intensiteten ved et definert lipid til peptidratio og I_0 er samme parameter målt ved fravær av lipider. Fraværet av disse variasionene er relevant ved fravær av interaksioner av peptidene med lipider.

7.2.2 RESULTATER OG DISKUSION

De lipidbindende egenskapene til peptid **149** (PVLELFENLWERLLDALQKKLK; SEQ ID NO:149), som er lik primærsekvensen til peptid **146** (SEQ ID NO:146) med unntak av at de inneholder en W (Trp) residie i posision 10, er presentert i TABELL VII.

TABELL VI

BINDINGSEGENSKAPER TIL PEPTID 149 (SEQ ID NO:149) TIL LIPIDISKE VESIKLER MÅLT VED FLUORESCENS

Lipid: peptid molar ratio (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	32

I buffer ved en konsentrasion på 2 μM, er maksimum av tryptofanfluorescensemision (λ_{max}) av peptid **149** (SEQ ID NO:149) 347 nm. Dette korresponderer til et tryptofan som er relativt eksponert til vandig miljø når de blir sammenlignet med NATA (λ max=350 nm). Peptid **149** (SEQ ID NO:149) binder svært effektivt til EPC/chol (20:1) små unilamellære vesikler som demonstrert ved "the burying" av tryptofan (bølgelengden for tryptofan-maksimumsfluorescens-emisionsskift fra 347 nm til 325 nm) og høy-fluorescensintensitetseksaltasion (se tabell VII). "The burying" av tryptofanresidien er maksimal for et lipid til peptidmolarratio på omtrent 30.

Andre peptider som utviste en høy grad av helisitet ved tilstedeværelse av lipider (≥60%) for ublokkerte peptider på ≥ 22 aminosyrer, eller blokkerte peptider på ≥ 18 aminosyrer; ≥ 40% for ublokkerte peptider på ≥ 18 aminosyrer) som målt ved sirkulær dikroisme som beskrevet i avsnitt 7.1, supra, demonstrerte også god lipidbinding. Selvfølgelig, blant alle disse peptidene selektert ved sirkulær dikroismescreening, ble bare de som kunne følges ved fluorescens testet for deres lipidbindingsegenskaper.

7.3 NUKLEÆR MAGNETISK RESONANS (NMR)

Dette eksemplet beskriver en NMR-metode for å analyse strukturen til kjernepeptidene fra oppfinnelsen.

7.3.1 NMR PRØVEPREPARERING

Prøvene ble preparert ved å løse 5 mg av peptidet i 90% H_2O/10% D_2O som inneholdt spormengder av 2,2-dimetyl-2-sila-5-pentansulfonat (DSS) som en intern kjemisk skiftreferanse. Noen av prøvene inneholdt trifluoretanol (TFE) (uttrykt som % volum). Det totale prøvevolumet var 500 µl og konsentrasionen av peptidet var omtrent 5 mM.

7.3.2 NMR SPEKTROSKOPI

^1H NMR spektra ble utført ved 500 MHz ved å bruke DRX500 spektrometer utstyrt med en B-VT2000 temperaturkontrollenhet. En- og to-dimensionale eksperimenter ble utført ved å bruke standard pulssekvenser. (Two Dimensional NMR Spectroscopy, Eds. W.R. Croasmun og RMK Carlson, 1994, VCH Publishers, New York, USA). Vannsuppresion ble oppnådd med lavtrykkspresaturering i 2 sek. Todimensionale eksperimenter ble utført i den fasesensitive metoden ved å bruke tidsproporsionalitetsfaseinkrementasion (TPPI) og en spektral vidde på 6000 Hz i begge dimensioner. Typisk, ble 40 scanninger tilført samtidig for 400 t_1 inkrementer med 2048 datapunkter. Dataene ble prosessert ved å bruke FELIX95 software (Molecular Simulations) på en INDIGO2 arbeidsstasion (Silicon Graphics). Data ble zero-fylt for å gi en 2K x 2K datamatriks og apodisert ved en 45° skift "squared sine-bell"-funksion.

7.3.3 NMR MÅLING

Fullstendig protonresonansmålinger ble ervervet ved å anvende sekvensiell målingsteknikk ved å bruke DQFCOSY, TOCSY og NOESY spektra som beskrevet i litteraturen (Wüthrich, NMR of Proteins and Nucleic Acids, 1986, John Wiley & Sons, New York, USA). Sekundære kjemiske skift ble beregnet for HN og Hα-protoner ved å subtrahere beregnet tilfeldig kveil-kjemiske skift (Wishart og Sykes, 1994, Method. Enz. 239:363.392) fra de korresponderende eksperimentelle verdiene.

7.3.4 RESULTATER OG DISKUSION

Generell betraktning. Amfipatisk helikspeptider som tenderer til å aggregere i vandig løsning ved høye konsentrasioner som er nødvendig for NMR spektroskopi, gjør det vanskelig å erverve høyresolusionsspektra. For eksempel, NMR spektra for eksempelkjernepeptidet **146** (SEQ ID NO:146) i vann utviser svært brede linjer. Derfor, kan ikke resonansen til hver aminosyreresidie bli oppløst. Tilsetting av TFE til prøven forbedrer oppløsningen av spektrumet. TFE er kjent å løse opp peptidene, og i tillegg stabilisere helikskonformasioner til peptider som har helikstilbøylighet. Funnene fra NMR spektroskopi er vist for peptid **146** (SEQ ID NO:146) som et representativt eksempel. Konsensus 22-mer fra Segrest (SEQ ID NO:75) ble studert i sammenligning.

Sekundære kjemiske skift. Protonkjemiske skift av aminosyrene avhenger både av type av residie og av lokal sekundær struktur inne i et peptid eller protein (Szlagyi, 1995, Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy 27:325-443). Derfor, er identifisering av regulær sekundærstruktur mulig ved å sammenligne eksperimentelle skift med beregnede verdier for tilfeldig kveil-konformasion.

Dannelse av en α-heliks resulterer typisk i en "upfield" (negativ) skift for Hα resonans. Observasion av en "upfield" Hα skift for flere sekvensielle residier blir generelt tatt som bevis for en heliksstruktur. Hα sekundære skift for peptid **146** (SEQ ID NO:146) i 25% TFE ved 295 K viste et signifikant negativt skift for residiene 4 til 19 (FIG: 8A) som viser en sterkt helisk konformasion.

Kjemiske skift for amidhydrogener fra aminosyreresidier som finnes i regioner til α-heliks er også i skift "upfield" med hensyn på kjemiske skift observert for tilfeldig kveiling. I tillegg, kan en periodisitet av HN skift bli observert, og det reflekterer perioden til heliksdreiningene. Amplituden til skiftvariasionen langs sekvensen er relatert til amfifatisitet til et helikspeptid. Høyere hydrofobisk moment fører til en mer uttalt oscillasion (Zhou et al., 1992, J. Am. Chem. Soc. 114:4320-4326). HN sekundære skift for peptid **146** (SEQ ID NO:146) i 25% TFE ved 295 K viser en oscillatorisk oppførsel i overensstemmelse med den amfipatiske egenskapen til heliksen (FIG. 8B).

Aminosyreerstatningene fører til en mer utartet periodisitet langs hele sekvensen (FIG. 8B). Mønsteret reflekterer klart den sterke amfipatiske egenskapen til peptid **146** (SEQ ID NO:146) sammenlignet med Segrest's konsensus 22-mer (SEQ ID NO:75). Med referanse til FIG. 8C, hvor distribueringen av aminosyrene på en idealisert α-heliks hvor

hydrofobe residier er skravert og hydrofile residier representeres som åpne sirkler, er plottet sammen med amidprotonsekundære kjemiske skift for peptid **146** (SEQ ID NO:146). De eksperimentelle verdiene er knyttet sammen med en jevn linje for å gjøre det klarere. NMR skiftene kartlegger heliksstrukturen, og eksistensen av 5-6 heliks-dreininger kan diskuteres.

Sekundærskiftet til en amidproton er influert av lengden på hydrogenbindingen til karbonyloksygen en dreining vekk fra heliksen. Derfor, reflekterer periodisiteten av observert kjemisk skift verdier som er forskjellig fra hydrogenbindingslengder. Denne forskjellen er assosiert med en generell bøyd helisk form av helikshovedkjeden. De hydrofobe residiene er på den konkave siden. De sekundære skiftene til peptid **146** (SEQ ID NO:146) indikerer en bøyd α-helikskonformasion.

8. EKSEMPEL: LCAT AKTIVERINGSANALYSE

Peptidene syntetisert som beskrevet i avsnitt 6, supra, ble analysert in vitro for deres evne til å aktivere LCAT. I LCAT analysen, substratvesikler (små unilamellære vesikler eller "SUVs") består av egg fosfatidylkolin (EPC) eller 1-palmitoyl-2-oleyl-fosfatidyl-kolin (POPC) og radiomerket kolesterol blir preinkubert med ekvivalente masser enten av peptidet eller ApoA-1 (isolert fra humant plasma). Reaksionene blir initiert ved tilsetting av LCAT (renset fra humant plasma). Reaksionen blir initiert ved tilsetting av LCAT (renset fra humant plasma). Nativt ApoA-I, som ble brukt som positiv kontroll, representerer 100% aktiveringsaktivitet. "Spesifikk aktivitet" (dvs., enheter av aktivitet (LCAT aktivering)/enhet av masse) av peptidene kan bli beregnet som konsentrasionen av peptid som oppnår maksimum LCAT aktivering. For eksempel, en serie av konsentrasioner av peptidet (f.eks., en begrensende fortynning) kan bli analysert til å bestemme "den spesifikke aktiviteten" for peptidet - konsentrasionen som oppnår maksimal LCAT aktivitet (dvs., prosentvis konversion av kolesterol til kolesterolester) ved et spesifikt tidspunkt i analysen (f.eks., 1 time). Når plotting-prosentkonversionen av kolesterol ved, f.eks., 1 time, mot konsentrasionen av peptidet som ble brukt, kan "den spesifikke aktiviteten" bli identifisert som konsentrasion av peptid som oppnår et platå på den plottede kurven.

8.1 FREMSTILLING AV SUBSTRATVESIKLER

Vesiklene brukt i LCAT analysen er SUV sammensatt av egg fosfatidylkolin (EPC) eller 1-palmitoyl-2-oleyl-fosfatidylkolin (POPC) og kolesterol med en molar ratio på 20:1. For å fremstille en vesikkel grunnløsning tilstrekkelig til 40 analyser, ble 7.7 mg EPC (eller 7.6 mg POPC; 10 μmol), 78 μg (0.2 μmol) 4-^{14} kolesterol, 116 μg kolesterol (0.3 μmol) løst i 5 ml xylen og lyofilisert. Deretter, blir 4 ml av analysebufferen tilsatt til tørt pulver og sonikert under nitrogenatmosfære ved 4°C. Sonikeringsbetingelser: Branson 250 sonikator, 10 mm tupp, 6 x 5 minutter; Analysebuffer: 10 mM Tris, 0.14 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4). Den sonikerte blandingen blir sentrifugert 6 ganger i 5 minutter hver gang ved 14.000 rpm (16.000 x g) for å fjerne titanpartikler. Den resulterende klare løsningen blir brukt til enzymanalyse.

8.2 RENSNING AV LCAT

For LCAT rensning, ble dekstransulfat/Mg^{2+} behandling av humant plasma brukt for å erverve lipoproteinmanglende serum (LPDS), som bli sekvensielt kromatografert på fenylsefarose, Affigelblue, ConcanavalinA sefarose og anti-ApoA-I affinitets-kromatografi, som er summert for en representativ rensning i TABELL IX, under:

TABELL IX

LCAT RENSNING

Fraksjon	Totalt volum (ml)	Totalt protein (mg)	Total aktivitet (nml CE/mg*hr)	Utbytte (%)	Rensning (dobbel)
Plasma	550	44550	63706		
LPDS	500	31000	62620	98	1.4
Fenyl sefarose	210	363	51909	82	100
Affigel blue	95	153	25092	39	115
ConA sefarose	43	36	11245	18	220
Anti-A-I affinitet	120	3.5	5500	9	1109

8.2.1 FREMSTILLING AV LPDS

For å fremstille LPDS, blir 500 ml plasma tilsatt til 50 ml dekstransulfat (MW=500000) løsning. Omrørt i 20 minutter. Sentrifugering i 30 minutter ved 3000 rpm (16.000 x g) ved 4°C. Bruk supernatanten (LPDS) for ytterligere rensning (ca 500 ml).

8.2.2 FENYLSEFAROSEKROMATOGRAFI

Følgende materialer og betingelser ble brukt for fenylsefarosekromatografi.

fast fase:	Fenylsefarose rask gjennomstrømning, høy substansgrad, Pharmacia
kolonne:	XK26/40, gelsjikthøyde: 3 cm, V=ca. 175 ml
gjennomstrømningsrater:	200 ml/time (prøve)
vasking:	200 ml/time (buffer)
eluering:	80 ml/time (destillert vann)
buffer:	10 mM Tris, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 7.4, 0.01% natriumazid.

Ekvilibrer kolonnen i Tris-buffer, tilsett 29 g NaCl til 500 ml LPDS og sett det på kolonnen. Vaske med flere volum av Tris-buffer inntil absorpsionen ved 280 nm bølgelengde er omtrent ved baselinjen, deretter start elueringen med destillert vann. Fraksionene som inneholder proteiner blir samlet opp (oppsamlingsstørrelse: 180 ml) og brukt til Affigelblue-kromatografi.

8.2.3 AFFIGELBLUE-KROMATOGRAFI

Fenylsefaroseoppsamlingen blir dialysert over natt ved 40°C mot 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.01% natriumazid. Oppsamlingsvolumet blir redusert ved ultrafiltrering (Amicon YM30) til 50-60 ml og satt på en Affigelblue-kolonne.

fastfase:	Affigelblue, Biorad, 153-7301 kolonne, XK26/20, gelsjikthøyde: ca 13 cm; kolonnevolum: omtrent 70 ml.
gjennomstrømningsrater:	ved påsetting: 15 ml/time
vasking: 50 ml/time	

Ekvilibreringskolonne i Tris-buffer. Sett på fenylsefaroseoppsamlingen på kolonnen. Start i parallell å samle fra fraksionene. Vask med Tris-buffer. De oppsamlede fraksioner (170 ml) ble brukt for ConA-kromatografi.

8.2.4 ConA-KROMATOGRAFI

Affigelblue-oppsamlingene ble redusert i Amicon (YM30) til 30-40 ml og dialysert mot ConA-oppstartsbuffer (1mM Tris HCl pH 7.4; 1mM $MgCl_2$, 1mM $MnCl_2$, 1mM $CaCl_2$, 0.01% Na-azid) over natt ved 4°C.

fast fase: ConA-sefarose (Pharmacia)
kolonne: XK26/20, gelsjikthøyde: 14 cm (75 ml)
gjennomstrømningsrater: påsetting 40 ml/time
vasking: (med startbuffer): 80 ml/time
eluering: 5o ml/time, 0.2M metyl-α-D-mannosid i 1mM Tris, pH 7.4.

Proteinfraksionene fra mannosidelueringene ble samlet (110 ml) og volumet ble redusert ved ultrafiltrering (YM30) til 44 ml. ConA-oppsamlingen ble delt i 2ml aliquoter, som ble lagret ved -20°C.

8.2.5 ANTI-ApoA-I AFFINITETSKROMATOGRAFI

Anti-ApoA-I affinitetskromatografi ble utført på Affigel-Hz materiale (Biorad) til hvilket anti-ApoA-I abs hadde blitt koplet kovalent.

kolonne: XK16/20, V=16 ml. Kolonnen ble ekvilibrert med PBS pH 7.4. To ml av ConA-oppsamlingen ble dialysert i 2 timer mot PBS før påsetting på kolonnen.

gjennomstrømningsrater: påsetting: 15 ml/time vasking (PBS) 40 ml/time.

De oppsamlede proteinfraksioner (V=14) ble brukt for LCAT analyse.

Kolonnen blir regenerert med 0.1 M sitratbuffer (pH 4.5) for å eluere bundet A-I (100 ml), og umiddelbart etter denne prosedyren reekvilibrert med PBS.

8.3 RESULTATER

Resultatene av LCAT aktiveringsanalyse er presentert i TABELL X, infra.

TABELL X

LCAT-AKTIVERING UTVIST VED EKSEMPELKJERNEPEPTIDER

PEPTID		AMINOSYRESEKVENS	AKTIVITET (%LCAT)	He (%) FRI	He (%) "mics"	He (%) SUV	He(%)
1	(SEQ ID NO:1)	PVLDLFRELLNELLEZLKQKLK	120%	77	85	81	69
2	(SEQ ID NO:2)	GVLDLFRELLNELLEALKQKLKK	105%				
3	(SEQ ID NO:3)	PVLDLFRELLNELLEWLKQKLK	98%	70	95	80	95
4	(SEQ ID NO:4)	PVLDLFRELLNELLEALKQKLK	93%	80	95	97	94
5	(SEQ ID NO:5)	pVLDLFRELLNELLEALKQKLKK	90%				
6	(SEQ ID NO:6)	PVLDLFRELLNEXLEALKQKLK	80%	57	93	70	99
7	(SEQ ID NO:7)	PVLDLFKELLNELLEALKQKLK	83%	77	89	85	73
8	(SEQ ID NO:8)	PVLDLFRELLNEGLEALKQKLK	83%	20	90	61	93
9	(SEQ ID NO:9)	PVLDLFRELGNELLEALKQKLK	83%				
10	(SEQ ID NO:10)	PVLDLFRELLNELLEAZKQKLK	79%	60	87	70	71
11	(SEQ ID NO:11)	PVLDLFKELLQELLEALKQKLK	72%				
12	(SEQ ID NO:12)	PVLDLFRELLNELLEAGKQKLK	70%				
13	(SEQ ID NO:13)	GVLDLFRELLNEGLEALKQKLK	67%				
14	(SEQ ID NO:14)	PVLDLFRELLNELLEALOQOLO	61%	70	96	80	
15	(SEQ ID NO:15)	PVLDLFRELWNELLEALKQKLK	60%	55	60	64	68
16	(SEQ ID NO:16)	PVLDLLRELLNELLEALKQKLK	59%				
17	(SEQ ID NO:17)	PVLELFKELLQELLEALKQKLK	59%				

PEPTID		AMINOSYRESEKVENS	AKTIVITET (%) LCAT	He (%) FRI	He (%) "mics"	He (%) SUV	He (%) TFE
18	(SEQ ID NO:18)	GVLDLFRELLNELLEALKQKLK	58%				
19	(SEQ ID NO:19)	pVLDLFRELLNEGLEALKQKLK	58%				
20	(SEQ ID NO:20)	PVLDLFREGLNELLEALKQKLK	57%				
21	(SEQ ID NO:21)	pVLDLFRELLNELLEALKQKLK	57%				
22	(SEQ ID NO:22)	PVLDLFRELLNELLEGLKQKLK	54%				
23	(SEQ ID NO:23)	PLLELFKELLQELLEALKQKLK	54%				
24	(SEQ ID NO:24)	PVLDLFRELLNELLEALQKKLK	53%				
25	(SEQ ID NO:25)	PVLDFFRELLNEXLEALKQKLK	51%	46	82		93
26	(SEQ ID NO:26)	PVLDLFRELLNELLELLKQKLK	47%				
27	(SEQ ID NO:27)	PVLDLFRELLNELZEALKQKLK	44%	72	92	82	81
28	(SEQ ID NO:28)	PVLDLFRELLNELWEALKQKLK	40%	82	98	90	81
29	(SEQ ID NO:29)	AVLDLFRELLNELLEALKQKLK	39%				
30	(SEQ ID NO:30)	PVLDLFRELLNELLEALKQKLK'	38%	85	90	98	90
31	(SEQ ID NO:31)	PVLDLFLELLNEWLEALKQKLK	34%	49	98	90	
32	(SEQ ID NO:32)	XVLDLFRELLNELLEALKQKLK	33%				
33	(SEQ ID NO:33)	PVLDLFREKLNELLEALKQKLK	33%				
34	(SEQ ID NO:34)	PVLDZFRELLNELLEALKQKLK	32%	58	67	6862	
35	(SEQ ID NO:35)	PVLDWFRELLNELLEALKQKLK	31%	49 (SP)	59	61	
36	(SEQ ID NO:36)	PLLELLKELLQELLEALKQKLK	31%	95	100		95

PEPTID		AMINOSYRESEKVENS	AKTIVITET (%) LCAT	He (%) FRI	He (%) "MICS"	He (%) SUV	He (%) TFE
37	(SEQ ID NO:37)	PVLDLFREWLNELLEALKQKLK	29%	65	75	76	73
38	(SEQ ID NO:38)	PVLDLFRELLNEWLEAWKQKLK	29%	25	49	21	49
39	(SEQ ID NO:39)	PVLDLFRELLEELLKALKKKLK	25%	66	69	68	72
40	(SEQ ID NO:40)	PVLDLFNELLRELLEALQKKLK	25%	66	84	79	77
41	(SEQ ID NO:41)	PVLDLWRELLNEXLEALKQKLK	25%	53	73	85	69
42	(SEQ ID NO:42)	PVLDEFREKLNEXWEALKQKLK	25%	15	74	27	76
43	(SEQ ID NO:43)	PVLDEFREKLWEXLEALKQKLK	25%				
44	(SEQ ID NO:44)	p v l d e f r e k l n e X l e a l k q k l k	25%	20	86		
45	(SEQ ID NO:45)	PVLDEFREKLNEXLEALKQKLK	24%	24	84	25	86
46	(SEQ ID NO:46)	PVLDLFREKLNEXLEALKQKLK	23%	30	86	58	85
47	(SEQ ID NO:47)	~VLDLFRELLNEGLEALKQKLK	23%				
48	(SEQ ID NO:48)	pvLDLFRELLNELLEALKQKLK	22%				
49	(SEQ ID NO:49)	PVLDLFRNLLEKLLEALEQKLK	22%	57	65	52	57
50	(SEQ ID NO.50)	PVLDLFRELLWEXLEALKQKLK	21%	68	84	89	76
51	(SEQ ID NO:51)	PVLDLFWELLNEXLEALKQKLK	20%	63	82	81	73
52	(SEQ ID NO:52)	PVWDEFREKLNEXLEALKQKLK	20%	sp	sp	sp	
53	(SEQ ID NO:53)	VVLDLFRELLNELLEALKQKLK	19%				
54	(SEQ ID NO:54)	PVLDLFRELLNEWLEALKQKLK	19%	76	71	84	78
55	(SEQ ID NO.55)	P~~~LFRELLNELLEALKQKLK	19%	38	72	78	75

PEPTID		AMINOSYRESEKVENS	AKTIVITET (%) LCAT	He (%) FRI	He (%) "mics"	He (%) SUV	He (%) TFE
56	(SEQ ID NO:56)	PVLDLFRELLNELLEALKQKKK	18%				
57	(SEQ ID NO:57)	PVLDLFRNLLEELLKALEQKLK	18%				
58	(SEQ ID NO:58)	PVLDEFREKLNEXLEALKQKL~	18%				
59	(SEQ ID NO:59)	LVLDLFRELLNELLEALKQKLK	17%				
60	(SEQ ID NO:60)	PVLDLFRELLNELLEALKQ~~~	16%	39	83	66	84
61	(SEQ ID NO:61)	PVLDEFRWKLNEXLEALKQKLK	16%				
62	(SEQ ID NO:62)	PVLDEWREKLNEXLEALKQKLK	16%				
63	(SEQ ID NO:63)	PVLDFFREKLNEXLEALKQKLK	16%				
64	(SEQ ID NO:64)	PWLDEFREKLNEXLEALKQKLK	15%				
65	(SEQ ID NO:65)	~VLDEFREKLNEXLEALKQKLK	15%				
66	(SEQ ID NO:66)	PVLDLFRNLLEELLEALQKKLK	15%	64	82	66	70
67	(SEQ ID NO:67)	~VLDLFRELLNELLEALKQKLK	14%	81	90	84	94
68	(SEQ ID NO:68)	PVLDEFRELLKEXLEALKQKLK	14%				
69	(SEQ ID NO:69)	PVLDEFRKKLNEXLEALKQKLK	13%				
70	(SEQ ID NO:70)	PVLDEFRELLYEXLEALKQKLK	12%	27	78	33	66
71	(SEQ ID NO:71)	PVLDEFREKLNELXEALKQKLK	11%				
72	(SEQ ID NO:72)	PVLDLFRELLNEXLWALKQKLK	11%	sp	sp	sp	
73	(SEQ ID NO:73)	PVLDEFWEKLNEXLEALKQKLK	10%				
74	(SEQ ID NO:74)	PVLDKFREKLNEXLEALKQKLK	10%				

PEPTID		AMINOSYRESEKVENS	AKTIVITET (%)LCAT	He (%) FRI	He (%) "mics"	He (%) SUV	He (%) TFE
75[1/]	(SEQ ID NO:75)	PVLDEFREKLNEELEALKQKLK	10%	18	28	23	55
76	(SEQ ID NO:76)	PVLDEFRELLFEXLEALKQKLK	9%	41	88		66
77	(SEQ ID NO:77)	PVLDEFREKLNKXLEALKQKLK	9%				
78	(SEQ ID NO:78)	PVLDEFRDKLNEXLEALKQKLK					
79	(SEQ ID NO:79)	PVLDEFRELLNELLEALKQKLK	9%				
80	(SEQ ID NO:80)	PVLDLFERLLNELLEALQKKLK	9%				
81	(SEQ ID NO:81)	PVLDEFREKLNWXLEALKQKLK					
82	(SEQ ID NO:82)	~~LDEFREKLNEXLEALKQKLK	8%				
83	(SEQ ID NO:83)	PVLDEFREKLNEXLEALWQKLK					
84	(SEQ ID NO:84)	PVLDEFREKLNELLEALKQKLK	7%				
85	(SEQ ID NO:85)	P~LDLFRELLNELLEALKQKLK	7%	58	61	64	69
86	(SEQ ID NO:86)	PVLELFERLLDELLNALQKKLK	7%				
87	(SEQ ID NO:87)	p l l e l l k e l l q e l l e a l k q k l k	7%	100		100	
88	(SEQ ID NO:88)	PVLDKFRELLNEXLEALKQKLK	7%				
89	(SEQ ID NO:89)	PVLDEFREKLNEXLWALKQKLK	6%				
90	(SEQ ID NO:90)	~~DEFREKLNEXLEALKQKLK	6%				
91	(SEQ ID NO:91	PVLDEFRELLNEXLEALKQKLK	6%	43	100		100

[1/] Segrest's konsensus 22-mer peptid (Anantharamaiah et al., 1990 Arteriosclerosis 10(1):95-105)

PEPTID		AMINOSYRESEKVENS	AKTIVITET (%)LCAT	He (%) FRI	He (%) "mics"	He (%) SUV	He (%) TFE
92	(SEQ ID NO:92)	PVLDEFRELYNEXLEALKQKLK	5%				
93	(SEQ ID NO:93)	PVLDEFREKLNEXLKALKQKLK	5%				
94[2/]	(SEQ ID NO:94)	PVLDEFREKLNEALEALKQKLK	5%	18	70	27	63
95	(SEQ ID NO:95)	PVLDLFRELLNLXLEALKQKLK	5%		sp	sp	
96	(SEQ ID NO:96)	p v l d l f r e l l n e X l e a l k k l k	5%	52	85	63	81
97	(SEQ ID NO:97)	PVLDLFRELLNELLE~~~~~~~	4%				
98	(SEQ ID NO:98	PVLDLFRELLNEELEALKQKLK	2%				
99	(SEQ ID NO:99)	KLKQKLAELLENLLERFLDLVP	2%	72	88	80	80
100	(SEQ ID NO:100)	p v l d l f r e l l n e l l e a l k q k l k	2%	83	92		98
101	(SEQ ID NO:101)	PVLDLFRELLNWXLEALKQKLK	2%		sp	sp	
102	(SEQ ID NO:102)	PVLDLFRELLNLXLEALKEKLK	2%	sp			
103	(SEQ ID NO:103)	PVLDEFRELLNEELEALKQKLK	1%				
104	(SEQ ID NO:104)	P~~~~~~~LLNELLEALKQKLK	1%	21	49	29	55
105	(SEQ ID NO:105)	PAADAFREAANEAAEAAKQKAK	1%	29	28	32	65
106	(SEQ ID NO:106)	PVLDLFREKLNEELEALKQKLK	0%				
107	(SEQ ID NO:107)	k l k q k l a e l l e n l l e r f l d l v p	0%	sp	sp		77
108	(SEQ ID NO:108)	PVLDLFRWLLNEXLEALKQKLK	0%	28	55		54

[2/][A[13]]-konsensus 22-mer peptid (Anantharamaiah et la., 1990, Arteriosclerosis 10(1):95-105).

PEPTID		AMINOSYRESEKVENS	AKTIVITET (%) LCAT	He (%) FRI	He (%) "mics"	He (%) SUV	He (%) TFE
109[37/]	(SEQ ID NO:109)	PVLDEFREKLNERLEALKQKLK	0%	19	45	23	58
110	(SEQ ID NO:110)	PVLDEFREKLNEXXEALKQKLK	0%				
111	(SEQ ID NO:111)	PVLDEFREKLWEXWEALKQKLK	0%				
112	(SEQ ID NO:112)	PVLDEFREKLNEXSEALKQKLK	0%				
113	(SEQ ID NO:113)	PVLDEFREKLNEPLEALKQKLK	0%	6	22		
114	(SEQ ID NO:114)	PVLDEFREKLNEXMEALKQKLK	0%				
115	(SEQ ID NO:115)	PKLDEFREKLNEXLEALKQKLK	0%				
116	(SEQ ID NO:116)	PHLDEFREKLNEXLEALKQKLK	0%				
117	(SEQ ID NO:117)	PELDEFREKLNEXLEALKQKLK	0%				
118	(SEQ ID NO:118)	PVLDEFREKLNEXLEALEQKLK	0%				
119	(SEQ ID NO:119)	PVLDEFREKLNEELEAXKQKLK	0%				
120	(SEQ ID NO:120)	PVLDEFREKLNEELEXLKQKLK	0%				
121	(SEQ ID NO:121)	PVLDEFREKLNEELEALQQKLK	0%				
122	(SEQ ID NO:122)	PVLDEFREKLNEELEWLKQKLK	0%				
123	(SEQ ID NO:123)	QVLDLFRELLNELLEALKQKLK					
124	(SEQ ID NO:124)	PVLDLFOELLNELLEALOQOLO					
125	(SEQ ID NO:125)	NVLDLFRELLNELLEALKQKLK					

[3/] [R^{13}]-konsensus 22-mer peptid (Anantharamaiah et la., 1990, Arteriosclerosis 10(1)95-105).

PEPTID		AMINOSYRESEKVENS	AKTIVITET (%) LCAT	He (%) FRI	He (%) "mics"	He (%) SUV	He (%) TFE
126	(SEQ ID NO:126)	PVLDLFRELLNELGEALKQKLK					
127	(SEQ ID NO:127)	PVLDLFRELLNELLELLKQKLK	47%				
128	(SEQ ID NO:128)	PVLDLFRELLNELLEFLKQKLK					
129	(SEQ ID NO:129)	PVLELFNDLLRELLEALQKKLK					
130	(SEQ ID NO.130)	PVLELFNDLLRELLEALKQKL					
131	(SEQ ID NO:131)	PVLELFKELLNELLDALRQKLK					
132	(SEQ ID NO:132)	PVLDLFRELLENLLEALQKKLK					
133	(SEQ ID NO:133)	PVLELFERLLEDLLQALNKKLK					
134	(SEQ ID NO:134)	PVLELFERLLEDLLKALNQKLK					
135	(SEQ ID NO:135)	DVLDLFRELLNELLEALKQKLK					
136	(SEQ ID NO:136)	PALELFKDLLQELLEALKQKLK					
137	(SEQ ID NO:137)	PVLDLFRELLNEGLEAZKQKLK					
138	(SEQ ID NO:138)	PVLDLFRELLNEGLEWLKQKLK					
139	(SEQ ID NO:139)	PVLDLFRELWNEGLEALKQKLK					
140	(SEQ ID NO:140)	PVLDLFRELLNEGLEALOQOLO					
141	(SEQ ID NO:141)	PVLDFFRELLNEGLEALKQKLK					
142	(SEQ ID NO:142)	PVLELFRELLNEGLEALKQKLK					
143	(SEQ ID NO:143)	PVLDLFRELLNEGLEALKQKLK*					
144	(SEQ ID NO:144)	pVLELFENLLERLLDALQKKLK	111%	89	88		95

PEPTID		AMINOSYRESEKVENS	AKTIVITET (%)LCAT	He (%) FRI	He (%) "mics"	He (%) SUV	He (%) TFE
145	(SEQ ID NO:145)	GVLELFENLLERLLDALQKKLK	100%	55	51		58
146	(SEQ ID NO:146)	PVLELFENLLERLLDALQKKLK	86%	97	100	100	95
147	(SEQ ID NO:147)	PVLELFENLLERLFDALQKKLK	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)	PVLELFLNLWERLLDALQKKLK	38%				
156	(SEQ ID NO:156)	PVLELFLNLLERLLDALQKKLK	35%				
157	(SEQ ID NO:157)	PVLEFFENLLERLLDALQKKLK	30%				
158	(SEQ ID NO:158)	PVLELFLNLLERLLDWLQKKLK	30%				
159	(SEQ ID NO:159)	PVLDLFENLLERLLDALQKKLK	28%				
160	(SEQ ID NO:160)	PVLELFENLLERLLDWLQKKLK	28%	65	73	75	61
161	(SEQ ID NO:161)	PVLELFENLLERLLEALQKKLK	27%				
162	(SEQ ID NO:162)	PVLELFENWLERLLDALQKKLK	27%	68	83	81	
163	(SEQ ID NO:163)	PVLELFENLLERLWDALQKKLK	26%	27	53		55

PEPTID		AMINOSYRESEKVENS	AKTIVITET (%)LCAT	He (%) FRI	He (%) "mics"	He (%) suv	He (%) TFE
164	(SEQ ID NO:164)	PVLELFENLLERLLDAWQKKLK	24%	37	66	51	61
165	(SEQ ID NO:165)	PVLELFENLLERLLDLLQKKLK	23%				
166	(SEQ ID NO:166)	PVLELFLNLLEKLLDALQKKLK	22%				
167	(SEQ ID NO:167)	PVLELFENGLERLLDALQKKLK	18%				
168	(SEQ ID NO:168)	PVLELFEQLLEKLLDALQKKLK	17%				
169	(SEQ ID NO:169)	PVLELFENLLEKLLDALQKKLK	17%				
170	(SEQ ID NO:170)	PVLELFENLLOLLDALQOOLO	17%				
171	(SEQ ID NO:171)	PVLELFENLLEKLLDLLQKKLK	16%				
172	(SEQ ID NO:172)	PVLELFLNLLERLGDALQKKLK	16%				
173	(SEQ ID NO:173)	PVLDLFDNLLDRLLDLLNKKLK	15%				
174	(SEQ ID NO:174)	p v l e l f e n l l e r l l d a l q k k l k	13%				
175	(SEQ ID NO:175)	PVLELFENLLERLLELLNKKLK	13%				
176	(SEQ ID NO:176)	PVLELWENLLERLLDALQKKLK	11%				
177	(SEQ ID NO:177)	GVLELFLNLLERLLDALQKKLK	10%				
178	(SEQ ID NO:178)	PVLELFDNLLEKLLEALQKKLR	9%				
179	(SEQ ID NO:179)	PVLELFDNLLERLLDALQKKLK	8%				
180	(SEQ ID NO.180)	PVLELFDNLLDKLLDALQKKLR	8%				
181	(SEQ ID NO:181)	PVLELFENLLERWLDALOKKLK	8%				
182	(SEQ ID NO:182)	PVLELFENLLEKLLEALQKKLK	7%				

PEPTID		AMINOSYRESEKVENS	AKTIVITET (%)LCAT	He (%) FRI	He (%) "mics"	He (%) SUV	He (%) TFE
183	(SEQ ID NO:183)	PLLELFENLLEKLLDALQKKLK	6%				
184	(SEQ ID NO:184)	PVLELFLNLLERLLDAWQKKLK	4%				
185	(SEQ ID NO:185)	PVLELFENLLERLLDALQOOLO	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)	PVLEFWDNLLDKLLDALQKKLR					
191	(SEQ ID NO:191)	PVLDLLRELLEELKQKLK*	100%				
192	(SEQ ID NO:192)	PVLDLFKELLEELKQKLK*	100%	36			56
193	(SEQ ID NO:193)	PVLDLFRELLEELKQKLK*	96%	34	88	87	87
194	(SEQ ID NO:194)	PVLELFRELLEELKQKLK*	88%	38	93		93
195	(SEQ ID NO:195)	PVLELFKELLEELKQKLK*	87%				
196	(SEQ ID NO:196)	PVLDLFRELLEELKNKLK*	81%				
197	(SEQ ID NO:197)	PLLDLFRELLEELKQKLK*	81%	43	70		69
198	(SEQ ID NO:198)	GVLDLFRELLEELKQKLK*	80%				
199	(SEQ ID NO:199)	PVLDLFRELWEELKQKLK*	76%	35	77	80	79
200	(SEQ ID NO:200)	NVLDLFRELLEELKQKLK*	75%				
201	(SEQ ID NO:201)	PLLDLFKELLEELKQKLK*	74%				

PEPTID		AMINOSYRESEKVENS	AKTIVITET (%)LCAT	He (%) FRI	He (%) "mics"	He (%) SUV	He (%) TFE
202	(SEQ ID NO:202)	PALELFKDLLEELRQKLR*	70%				
203	(SEQ ID NO:203)	AVLDLFRELLEELKQKLK*	66%				
204	(SEQ ID NO:204)	PVLDFFRELLEELKQKLK*	63%				
205	(SEQ ID NO:205)	PVLDLFREWLEELKQKLK*	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)	PVLDLFRELLNELLQKLK	47%	54	71	67	62
210	(SEQ ID NO:210)	PVLDLFRELLEELKQKLK	46%	20	63	37	53
211	(SEQ ID NO:211)	PVLDLFRELLEELOQOLO*	45%				
212	(SEQ ID NO:210)	PVLDLFOELLEELOQOLK*	43%				
213	(SEQ ID NO:213)	PALELFKDLLEEFRQRLK*	42%				
214	(SEQ ID NO:214)	pVLDLFRELLEELKQKLK*	39%				
215	(SEQ ID NO:215)	PVLDLFRELLEEWKQKLK*	38%	28	63	53	68
216	(SEQ ID NO:216)	PVLELFKELLEELKQKLK	35%				
217	(SEQ ID NO:217)	PVLDLFRELLELLKQKLK	30%	52	78	76	70
218	(SEQ ID NO:218)	PVLDLFRELLNELLQKLK*	29%				
219	(SEQ ID NO:219)	PVLDLFRELLNELWQKLK	24%				
220	(SEQ ID NO:220)	PVLDLFRELLEELQKKLK	22%	27	64	54	64

PEPTID		AMINOSYRESEKVENS	AKTIVITET (%)LCAT	He (%) FRI	He (%) "mics"	He (%) SUV	He (%) TFE
221	(SEQ ID NO:221)	DVLDLFRELLEELKQKLK*	12%				
222	(SEQ ID NO:222)	PVLDAFRELLEALLQLKK	8%				
223	(SEQ ID NO:223)	PVLDAFRELLEALAQLKK	8%	21	56	23	51
224	(SEQ ID NO:224)	PVLDLFREGWEELKQKLK	8%				
225	(SEQ ID NO:225)	PVLDAFRELAEALAQLKK	1%				
226	(SEQ ID NO:226)	PVLDAFRELGEALLQLKK	1%				
227	(SEQ ID NO:227)	PVLDLFRELGEELKQKLK*	0%				
228	(SEQ ID NO:228)	PVLDLFREGLEELKQKLK*	0%				
229	(SEQ ID NO:229)	PVLDLFRELLEEGKQKLK*	0%				
230	(SEQ ID NO:230)	PVLELFERLLEDLQKKLK					
231	(SEQ ID NO:231)	PVLDLFRELLEKLEQKLK					
232	(SEQ ID NO:232)	PLLELFKELLEELKQKLK*					
237[4/]	(SEQ ID NO:237)	LDDLLQKWAEAFNQLLKK	11%	30	66	45	
238[5/]	(SEQ ID NO:238)	EWLKAFYEKVLEKLKELF*	19%	49	72	60	58
239[6/]	(SEQ ID NO:239)	EWLEAFYKKVLEKLKELF*	11%	44	49		sp

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

[5/] Ac-18AMOD-C(O)NH_2 peptid (Epand et al., 1987, J. Biol. Chem.262(19):9389-9396).

[6/] Ac-18AM4-C(O)NH_2 peptid (Brasseeur, 1993, Biochim. Biophys. Acta 1170:1-7).

PEPTID		AMINOSYRESEKVENS	AKTIVITET (%)LCAT	He (%) FRI	He (%) "mics"	He (%) SUV	He (%) TFE
240	(SEQ ID NO:240)	DWLKAFYDKVAEKLKEAF*	10%	16	68	59	57
241	(SEQ ID NO:241)	DWFKAFYDKVFEKFKEFF	8%				
242[7/]	(SEQ ID NO:242	GIKKFLGSIWKFIKAFVG	7%				
243	(SEQ ID NO:243)	DWFKAFYDKVAEKFKEAF	5%	10	64	50	
244[8/]	(SEQ ID NO:244)	DWLKAFYDKVAEKLKEAF	5%	9	40	13	48
245	(SEQ ID NO:245)	DWLKAFYDKVFEKFKEFF	4%	38	77	70	sp
246[9/]	(SEQ ID NO:246)	EWLEAFYKKVLEKLKELF	4%	18	44	47	
247	(SEQ ID NO:247)	DWFKAFYDKFFEKFKEFF	3%				
248[10/]	(SEQ ID NO:248)	EWLKAFYEKVLEKLKELF	3%	18	45	13	
249[11/]	(SEQ ID NO:249)	EWLKAEYEKVEEKLKELF*					
250[12/]	(SEQ ID NO:250)	EWLKAEYEKVLEKLKELF*					

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

[8/] 18A peptid (Anantharamaia et al., 1985, J. Biol. Chem. 260(18):10248-10255).

[9/] 18AMA4 peptid (Rosseneu et al., WO93/25581; Corijn et al., 1993, Biochim. Biophys. Acta 1170:8-16).

[10/] [$Glu^{1,8}$, $Leu^{5,11,17}$] 18A peptid (Epand et al., 1987, J. Biol. Chem. 262(19):9389-9396).

[11/] Ac-18AM3-$C(O)NH_2$ (Rosseneu et al., WO93/25581).

[12/] AC 18AM2-$C(O)NH_2$ (Rosseneu et al.; WO93/25581).

PEPTID		AMINOSYRESEKVENS	AKTIVITET (%)LCAT	He (%) FRI	He (%) "mics"	He (%) SUV	He (%) TFE
251[13/]	(SEQ ID NO:251)	EWLKAFYKKVLEKLKELF*					
252	(SEQ ID NO:252)	PVLDLFRELLEQKLK*					
253	(SEQ ID NO:253)	PVLDLFRELLEELKQK*					
254	(SEQ ID NO:254)	PVLDLFRELLEKLKQK*					
255	(SEQ ID NO:255)	PVLDLFRELLEKLQK*					
256	(SEQ ID NO:256)	PVLDLFRELLEALKQK*					
257	(SEQ ID NO:257)	PVLDLFENLLERLKQK*					
258	(SEQ ID NO:258)	PVLDLFRELLNELKQK*					

[13/] AC-18AM1-C(O)NH_2 (Rosseneu et al., WO93/25581

I TABELL X, * indikerer peptider som er N-terminalt asetylert og C-terminalt amidert: [1] indikerer peptider som er N-terminalt dansylert; sp indikerer peptider som utviser oppløselighetsproblemer under de eksperimentelle betingelsene; X er Aib; Z er Nal; O er Orn; He (%) betegner prosenthelisitet; mics betegner miceller; og ~ indikerer deleterte aminosyrer.

9. EKSEMPEL: FARMAKOKINETIKK FOR ApoA-I AGONISTER

Følgende eksperimenter kan bli brukt for å vise at ApoA-I agonister er stabile i sirkulasionen og assosiert med HDL komponenten i plasma.

9.1 SYNTESE AV RADIOMERKEDE PEPTIDER

Radiomerkede peptider blir syntetisert ved å kople en ^{14}C-merket aminosyre som den N-terminale aminosyren. Syntesen blir utført ifølge Lapatsanis, Syntese, 1983, 671-173. I korthet, blir 250 μM av umerket N-terminal aminosyre løst i 225 μl av en 9% Na_2CO_3 løsning og tilsatt til en løsning av (9% Na_2CO_3) med 9.25 Mbq (250 μM) ^{14}C-merket N-terminal aminosyre. Væsken blir avkjølt ned til 0°C, blandet med 600 μM (202 mg) 9-fluorenylmetyl-N-succinimidylkarbonat (Fmoc-Osu) i 0.75 ml DMF og ristet ved romtemperatur i 4 timer. Deretter blir blandingen ekstrahert med dietyleter (2 x 5 ml) og kloroform (1 x 5 ml), den gjenværende vandige fasen blir forsuret med 30% HCl og ekstrahert med kloroform (5 x 8 ml). Den organiske fasen blir tørket over Na2AO4 , filtrert av og volumet ble redusert under nitrogenstrøm til 5 ml. Enheten blir estimert med TLC ($CHCl_3$:MeOH:Hac, 9:1:0.1 v/v/v, stasionær fase RPTLC silikagel 60, Merck, Germany).

Kloroformløsningen som inneholdt ^{14}C-merket Fmoc aminosyre blir brukt direkte for peptidsyntese. En peptidresin som inneholder aminosyrene 2-22 blir syntetisert automatisk som beskrevet i avsnitt 6. Sekvensen til peptidet blir bestemt ved Edman-degradering. Koplingen blir utført som beskrevet i avsnitt 6.1.

9.2 FARMAKOKINETIKK I MUS

I hvert eksperiment, blir 2.5 mg/kg radiomerket peptid injisert intraperitonalt i mus som blir fôret med normal musemat eller eterogenisk Thomas-Harcroft-modifisert diett

(resulterende i svært forhøyet VLDL og IDL-kolesterol). Blodprøvene ble tatt ved forskjellige tidsintervaller for måling av radioaktivitet i plasma.

9.3 STABILITET I HUMANT SERUM

Stabiliteten av ApoA-I agonister fra oppfinnelsen i humant serum blir demonstrert som beskrevet under.

9.3.1 EKSPERIMENTELLE METODER

100 μg av ^{14}C-merket peptid (fremstilt som beskrevet i avsnitt 9.1, supra), ble blandet med 2 ml ferskt humant plasma (ved 37°C) og delipidert enten umiddelbart (kontrollprøve) eller etter 8 dager med inkubering ved 37°C (testprøve). Delipideringen ble utført ved å ekstrahere lipidene med likt volum 2:1 (v/v) kloroform:metanol.

Prøvene ble satt på en reversfase C18 HPLC-kolonne og eluert med en lineær gradient (25-58% over 33 min.) av acetonitril (som inneholdt 0.1% TFA). Elueringsprofiler ble fulgt ved absorbans (220 nm) og radioaktivitet.

9.4 DANNELSE AV PRE-β-LIGNENDE PARTIKLER

Evnen til ApoA-I agonistene fra oppfinnelsen å danne pre-β-lignende partikler er vist som beskrevet under.

9.4.1 EKSPERIMENTELL METODE

Human HDL blir isolert ved KBr tetthetsultrasentrifugering ved en tetthet på d = 1.21 g/ml for å erverve toppfraksionen etterfulgt av Superose 6 gel-filtreringskromatografi for å separere HDL fra andre lipoproteiner. Isolert HDL blir justert til en sluttkonsentrasion på 1.0 mg/ml med et fysiologisk saltvann basert på proteininnhold bestemt av Bradford-proteinanalyse. En aliquot på 300 μl blir fjernet fra den isolerte HDL fremstillingen og inkubert med 100 μl ^{14}C-merket peptid i to timer ved 37°C. Fem separate inkuberinger blir analysert inklusiv en blank som inneholder 100 μl fysiologisk

saltvann og fire fortynninger av ^{14}C-merket peptid: (i) 0.20 µl peptid:HDL, ratio=1:15; (ii) 00.30 µg/µl peptid:HDL, ratio=1:10; (iii) 0.60 µg/µl peptid: HDL, ratio=1:5; og (iv) 1.00 µg/µl peptid:HDL, ratio=1:3. Etter to timers inkubering, ble 200 µl aliquot av prøven (totalt volum=400 µl) satt på en Superose 6 gelfiltreringskolonne for lipoproteinseparering og analyse, og 100 µl ble brukt for å bestemme total radioaktivitet som er satt på kolonnen.

9.5 ASSOSIERING AV ApoA-I AGONISTER MED HUMANE LIPOPROTEINER

9.5.1 EKSPERIMENTELLE METODER

Evnen til ApoA-I agonister fra oppfinnelsen til å assosiere med humant lipoprotein-fraksioner blir bestemt ved å inkubere ^{14}C-merket peptid med hver lipoproteinklasse (HDL, LDL og VLDL) og en blanding av forskjellige lipoproteinklasser.

HDL, LDL og VLDL blir isolert ved KBr-tetthetsgradientultrasentrifugering ved d=1.21 g/ml og renset ved FPLC på en Superose 6B-kolonnestørrelseseksklusionskolonne (kromatografi ble utført med en gjennomstrømningsrate på 0.7 ml/min. og en kjøringsbuffer på 10 mM Tris (pH 8), 115 mM NaCl, 2 mM EDTA og 0.01% NaN_3). ^{14}C-merket peptid blir inkubert med HDL, LDL og VLDL ved en peptid:fosfolipidratio på 1:5 (masseratio) i 2 timer ved 37°C. Mengden som kreves av lipoprotein (volum basert på mengde som behøves for å gi 1000 µg) blir blandet med 0.2 ml av peptid-utgangsløsning (1 mg/ml) og løsningen blir brakt opp til 2.2 ml ved å bruke 0.9% NaCl.

Etter inkubering i 2 timer, ved 37°C, blir en aliquot (0.1 ml) fjernet for flytende scintillasionstelling for å bestemme den totale radioaktiviteten, tettheten til den gjenværende inkuberingsblandingen blir justert til 1.21 g/ml med KBr, og prøvene blir sentrifugert ved 100.000 rpm (300.000 g) i 24 timer ved 4°C i en TLA 100.3 rotor ved å bruke en Beckman-bordultrasentrifuge. Den resulterende supernatanten blir fraksionert ved å fjerne 0.3 ml aliquoter fra toppen av hver prøve for en total på 5 fraksioner, og 0.05 ml av hver fraksion blir brukt for flytende scintillasionstelling. De to toppfraksionene inneholder flytende lipoproteiner, de andre fraksionene (3-5) korresponderer til proteiner/peptider i løsning.

9.6 ApoA-I AGONISTER FRA OPPFINNELSEN BINDES SELEKTIVT HDL LIPIDER I HUMAN PLASMA

9.6.1 EKSPERIMENTELL METODE

For å vise at ApoA-I agonistene fra oppfinnelsen selektivt binder HDL proteiner i human plasma, blir 2 ml human plasma inkubert med 20, 40, 60, 80 og 100 μg av ^{14}C-merked peptid i 2 timer ved 37°C. Lipoproteinene blir separert ved å justere tettheten til 1.21 g/ml og sentrifugering i en TLA 100.3 rotor ved 100.000 rpm (300.000 g) i 36 timer ved 4°C. 900 μl på toppen (300 μl fraksioner) blir tatt for analyse. 50 μl fra hver 300 μl fraksion blir talt for radioaktivitet og 200 μl fra hver fraksion blir analyser ved FPLC (Superose 6/Superose 12 kombinasionskolonne).

10. EKSEMPEL: ApoA-I AGONISTER FREMMER KOLESTEROLUTSTRØMNING

For å vise at ApoA-I agonister fra oppfinnelsen fremmer kolesterolutstrømning, ble HepG2 hepatomaceller platet ut på 6-brønners kulturplater og dyrket til konfluens. Cellene blir merket med ^{3}H-kolesterol ved tørking av kolesterolet, deretter tilsetting av 1% bovinserumalbumin (BSA) i fosfatbufret saltvann (PBS), sonikering av løsningen og tilsetting av 0.2 ml av denne merkingsløsningen og 1.8 ml vekstmedium til cellene, slik at hver celle inneholder 2 μCi av radioaktivitet. Cellen blir inkubert i 24 timer med merkingsmediumet.

Peptid (eller protein): DMPC komplekser blir fremstilt ved en 1:2 peptid (eller protein):DMPC ratio (vekt/vekt). For å fremstille kompleksene, blir peptidet eller nativt ApoA-I protein tilsatt til en DMPC løsning i PBS og inkubert ved romtemperatur over natt, hvorved løsningen vil bli klar. Peptid- eller proteinkonsentrasionen i sluttløsningen er omtrent 1 mg/ml.

Merkingsmediumet blir fjernet fra cellene og cellene blir vasket med PBS forut for tilsetting av kompleksene. 1.6 ml av vekstmedium blir tilsatt til hver brønn, etterfulgt av peptid (eller protein): DMPC kompleks og tilstrekkelig PBS for å bringe sluttvolumet til 2 m pr brønn. Det endelige peptidet eller ApoA-I konsentrasionene er omtrent 1, 2.5, 5, 7.5 og 25 μl/ml medium. Etter 24 timer med inkubering ved 37°C, blir mediumet fjernet og cellene vasket med 2 ml 1% BS/PBS, etterfulgt av 2 vaskinger med 2 ml hver

med PBS. Mengden av ^{3}H-kolesterol som er gått ut i mediumet blir bestemt ved flytende scintillasionstelling.

11. EKSEMPEL: ANVENDELSE AV ApoA-I AGONISTER I DYREMODELLSYSTEMER

Effektiviteten av ApoA-I agonister fra oppfinnelsen ble vist i kaniner. Resultatene viste at administreringen av ApoA-I agonister øker serumkonsentrasionen av HDL lignende partikler.

11.1 FREMSTILLING AV FOSFOLIPID/PEPTIDKOMPLEKSER

Små diskoidale partikler bestående av fosfolipid (DPPC) og peptid **146** (SEQ ID NO:146) ble fremstilt ved å følge kolatdialysemetoden. Fosfolipidenen ble løst i kloroform og tørket under en strøm av nitrogen. Peptidet ble løst i buffer (saltvann) i en konsentrasion på 1-2 mg/ml. Lipidfilmen ble reoppløst i buffer inneholdende kolat (43°C) og peptidløsningen ble tilsatt ved en 3-1 fosfolipid/peptidratio. Blandingen ble inkubert over natt ved 43°C og deretter dialysert ved 43°C (24 timer), i romtemperatur (24 timer) og 4°C (24 timer), med tre bytte av buffer (store volum) ved temperaturpunktet. Kompleksene ble filtersterilisert (0.22 μ) for injeksion og lagring ved 4°C.

11.2 ISOLERING OG KARAKTERISERING AV PEPTID/FOSFOLIPID-PARTIKLER

Partiklene ble separert på en gelfiltreringskolonne (Superose 6 HR). Posisionen til toppen som inneholdt partiklene ble identifisert ved å måle fosfolipidkonsentrasionen i hver fraksion. Fra elueringsvolumet, kan Stokes radius bli bestemt. Konsentrasionen av peptidet i komplekset ble bestemt ved å bestemme fenylalanininnholdet (ved HPLC) etterfulgt av en 16 timers syrehydrolyse.

11.3 INJEKSION I KANINEN

Hvite New Zealand hann kaniner (2.5-3 kg) ble injisert intravenøst med en dose av fosfolipid/peptidkompleks (8 mg/kg kroppsvekt peptid **146** (SEQ ID NO:146) eller 10 mg/kg kroppsvekt ApoA-I, uttrykt som peptid eller proteininnhold) i en enkel bolusinjeksion som ikke overskrider 10-15 ml. Dyrene ble gitt noe beroligende midler før manipuleringene. Blodprøvene (samlet på EDTA) ble tatt før og 5, 15, 30, 60, 240 og 1440 minutter etter injeksion. Hematokrit (Hct) ble bestemt for hver prøve. Prøvene ble aliquotert og lagret ved -20°C før analyse.

11.4 ANALYSE AV KANINSERA

Plasmalipider. Total plasmakolesterol, plasmatriglyserider og plasmafosfolipider ble bestemt enzymatisk ved å bruke kommersielt tilgjengelige analyser ifølge forhandlerens protokoller (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany og Biomérieux, 69280, Marcy-l'étoile, France).

Lipoproteinprofiler. Plasmalipoproteinprofiler fra fraksionene ervervet etter separasionen av plasma til dets lipoproteinfraksioner ble bestemt ved å spinne i en sukrosetetthetsgradient. Fraksionene ble samlet og i hver individuell fraksion ble fosfolipid og kolesterolinnhold målt enzymatisk.

11.5 RESULTATER

Lipoproteinprofilen til kaninene injisert ved 8 mg/kg peptid **146** (SEQ ID NO:146) (i form av peptid/DPPC komplekser) som en funksion av tid er vist i FIG. 9. En vesentlig økning i kolesterol av HDL kolesterolfraksionene (fraksioner >1.06 mg/ml) er tydelig ved 5 min. etter injeksionen og varer i omtrent 24 timer.

Kolesterolet fra de kombinerte HDL fraksionene ervervet ved tetthetsgradientsultra-sentrifugering er vist i TABELL XI, under. Høyeste økning av HDL kolesterol (90%) forekom etter 240 min. Ved 24 timer etter administrering, var økningen fortsatt 71.2%.

Disse data indikerer at administrering av peptid **146**/DPPC komplekser (8 mg/kg) induserer raskt og effektivt mobilisering av perifert kolesterol.

TABELL XI

HDL KOLESTEROL I KANINER ETTER ADMINISTRERING AV
8 MG/KG PEPTID 146 (SEQ ID NO:146) ELLER
10 MG/KG NATIVT ApoA-I

Tid (min.)	Økning i HDL kolesterol (%) nativt ApoA-I	Økning i HDL kolesterol (%) peptid **146**
5	19.3	31.3
15	16	60.4
60	15.8	42.9
240	-24.1	90.2
1440	*	71.2

* dyr som døde forut for tidspunkt.

12. EKSEMPEL: FREMSTILLING AV PEPTID-LIPIDKOMPLEKS VED KO-LYOFILISERINGSTILNÆRMING

Følgende protokoll ble brukt for å fremstille peptid-lipidkomplekser.

Ett mg av peptid **149** (PVLELFENLWERLLDALQKKLK; SEQ ID NO:149) ble løst i 250 µl HLC grad metanol (Perkin Elmer) i en en-ml klart glassrør med kork (Waters #WAT025054). Oppløsning av peptidet ble utført ved at man innimellom vortex-sentrifugerte i en periode på 10 minutter ved romtemperatur. Til denne blandingen ble et aliquot som inneholdt 3 mg dipalmitoyl-fosfatidylkolin (DPPC; Avanti Polar Lipids, 99% renhet, produkt #850355) fra en 100 mg/ml utgangsløsning i metanol ble tilsatt. Volumet til blandingen ble brakt opp til 400 µl ved tilsetting av metanol, og blandingen ble ytterliger vortex-sentrifugert periodisk i en periode på 10 minutter ved romtemperatur. Til røret, ble 200 µl av xylen (Sigma-Aldrich 99% ren, HPLC-grad) tilsatt og rørene ble vortex-sentrifugert i 10 sekunder. To små hull ble stukket i toppen av røret med en 20 gaug-sprøytenål, røret ble frosset i 15 sekunder i flytende nitrogen, og røret ble lyofilisert over natt under vakuum. Til røret ble 200 ml 0.9% NaCl løsning

tilsatt. Røret ble vortex-sentrifugert i 20 sekunder. På dette tidspunktet var løsningen i røret melkeaktig av utseende. Røret ble deretter inkubert i et vannbad i 30 minutter ved 42°C. Løsningen ble klar (dvs., lik vann i utseende) etter få minutters inkubering ved 41°C.

12.1 KARAKTERISERING AV KOMPLEKSER VED SUPEROSE 6 GEL FILTRERINGSKROMATOGRAFI

Peptid-fosfolipidkomplekser som inneholdt peptid **149** (SEQ ID NO:149) ble fremstilt ved ko-lyofilisering som beskrevet over. Fremstillingen inneholdt 1 mg peptid og 3 mg DPPC ved vekt. Etter rekonstituering ble kompleksene i 200 µl av 0.9% NaCl, 20 µl (som inneholdt 100 µg peptid **149**) av kompleksene satt på en Pharmacia Superose 6 kolonne ved å bruke 0.9% NaCl som den flytende fasen med en strømningsrate på 0.5 ml/minutt. Kromatografien ble målt ved absorbans eller spredning av lys ved bølgelengden 280 nm. En ml fraksioner ble samlet. Aliquoter som inneholdt 20 µl av fraksionene ble analysert for fosfolipidinnhold ved å bruke bioMerieux Phospholipides Enzymatique PAO 150 kit (#61491) ifølge instruksioner gitt av forhandleren. Hoveddelen av både fosfolipid og UV absorbans ble gjenvunnet sammen i færre fraksioner med topper på omtrent 15.8 ml. Dette elueringsvolumet korresponderer til Stokes' diameter på 87 Angstrøm.

For sammenligning, ble et separat kromatogram av 20 µl humant HDL_2 kjørt under samme betingelser ved å bruke samme kolonne som peptid **149** kompleksene. HDL_2 ble fremstilt som følger: 300 ml frossen human plasma (Mannheim Blutspenzentrale #1185190) ble tint, justert til tetthet 1.25 med fast kaliumbromid og sentrifugert i 45 timer ved 40.000 RPM ved å bruke en Ti45-rotor (Beckman) ved 20°C. Det flytende laget ble samlet sammen, dialysert mot destillert vann, justert til en tetthet på 1.07 med fast kaliumbromid, sentrifugert som beskrevet over i 70 timer. Bunnlaget (på et nivå på en cm over rørbunnen) ble samlet sammen, brakt opp til 0.0% natriumazid, og lagret ved 4°C i 4 dager inntil kromatografi. Kolonneeluatet ble målt ved absorbans eller spredning av lys ved bølgelengde 254 nm. En serie av proteiner av kjent molekylvekt og Stokes' diameter ble brukt som standarder for å kalibrere kolonnen for beregning av Stokes' diameter for partiklene (Pharmacia Gel Filtration Calibration Kit Instructional Manual, Pharmacia Laboratory Separation, Piscataway, NJ, revidert april 1985). HDL_2 eluert med et retensionsvolum på 14.8 ml korresponderer til en Stokes' diameter på 108 nm.

13. EKSEMPEL: FREMSTILLING AV ANTISTOFFER

For å fremstille antistoffer til ApoA-I agonistene fra oppfinnelsen, blir peptidet konjugert til "keyhole limpet" hemocyanin (KLH; 1 ml peptid til 10 mg KLH). KLH konjugatet (LMG) blir suspendert i fullstendig Freund's adjuvant og injisert inn i kaninen på tidspunkt 0, og "boosted" med 0.25 mg KLH konjugat ved 4 uker og igjen ved 5 uker. Pre-blodprøvningsuttak og seks-ukers post-blodprøvningsuttak blir testet for antistofftiter mot autentisk antigen med ELISA.

Produksions-blodprøvningsuttakene blir samlet fra 2 kaniner hver. Antistoffene rettet eksklusivt mot peptid-antigenet er isolert som følger:

1. Fritt peptid blir festet til cyanogenbromidaktivert Sepharose 4B (Pharmacia) ifølge forhandlerens protokoll.

2. Antisera blir pre-absorbert på en kolonne av irrelevante peptider og en kolonne av irrelevant humant og museserumsproteiner.

3. Pre-absorbert antisera får passere gjennom korresponderende peptidkolonne (se punkt 1).

4. Kolonnene blir vasket med 0.1 M boratbufret saltvann (pH 8.2) og bundede antistoffer blir eluert ved å bruke en lav-pH-gradienttrinn fra pH 4.0 til pH 3.0 til pH 2.0 (0.1 M glysinbuffer) og til slutt med 0.1 M HCl.

5. Det eluerte materialet blir nøytralisert med et overskudd av boratsaltvann, konsentrert ved ultrafiltrering (Amicon, YM30) og dialysert mot boratsaltvann.

6. Proteinkonsentrasionen blir bestemt ved absorbans ved 280 nm.

De resulterende antistoffene blir testet for artsspesifisitet ved å bruke renset humant ApoA-I eller renset muse ApoA-I i en direkte ELISA bindingsanalyse.

P a t e n t k r a v

1.

ApoA-I agonist, k a r a k t e r i s e r t v e d at den utviser minst 38% LCAT-aktiveringsaktivitet sammenlignet med humant ApoA-I og består av:

(i) et peptid med 15 til 29 rester som danner en amfipatisk α-heliks ved tilstedeværelse av lipider og som omfatter den strukturelle formelen (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

eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvori:

X_1 er pro (P), Ala (A), Gly (G), Gln (Q), Asn (N), Asp (D) eller D-Pro (p);
X_2 er en alifatisk rest;
X_3 er Leu (L) eller Phe (F);
X_4 er Glu (E);
X_5 er en alifatisk rest;
X_6 er Leu (L) eller Phe (F);
X_7 er Glu (E) eller Leu (L);
X_8 er Asn (N) eller Gln (Q);
X_9 er Leu (L);
X_{10} er Leu (L), Trp (W) eller Gly (G);
X_{11} er en sur rest;
X_{12} er Arg (R);
X_{13} er Leu (L) eller Gly (G);
X_{14} er Leu (L); Phe (F) eller Gly (G);
X_{15} er Asp (D);
X_{16} er Ala (A);
X_{17} er Leu (L);
X_{18} er Asn (N) eller Gln (Q);
X_{19} er en basisk rest;
X_{20} er en basisk rest;
X_{21} er Leu (L);
X_{22} er en basisk rest;
X_{23} er fraværende eller en basisk rest;
Z_1 er H_2N- eller RC(O)NH.;

Z_2 er -C(O)NRR, -C(O)OR eller -C(O)OH eller et salt derav;

hver R er uavhengig -H, (C_1-C_6) alkyl, (C_1-C_6) alkenyl, (C_1-C_6) alkynyl, (C_5-C_{20}) aryl, (C_6-C_{26}) alkaryl, 5-20 leddet heteroaryl eller 6-26 leddet alkheteroaryl;

hver " - " mellom restene X_n betegner uavhengig en amidkopling, eller

(ii) en deletert form av den strukturelle formelen (I) som danner en amfipatisk α-heliks ved tilstedeværelse av lipider, hvori minst en og opp til åtte av restene 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} og X_{22} er deletert; eller

(iii) en endret form av den strukturelle formelen (I) som danner en amfipatisk α-heliks ved tilstedeværelse av lipider, hvori minst en av restene 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} eller X_{23} er konservativt substituert med en annen rest,

eller nært beslektede derivater med samme biologiske effekt.

2.
ApoA-I agonist ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at de hydrofobe restene er fiksert ifølge den strukturelle formelen (I) og minst en ikke-fiksert rest er konservativt substituert med en annen rest.

3.
ApoA-I agonist ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at

X_1 er Pro (P), D-Pro (p), Gly (G), Asn (N) eller Ala (A);
X_2 er Ala (A), Leu (L) eller Val (V);
X_3 er Leu (L) eller Phe (F);
X_5 er Leu (L);
X_6 er Phe (F);
X_9 er Leu (L);
X_{10} er Leu (L), Trp (W) eller Gly (G);
X_{13} er Leu (L) eller Gly (G);
X_{14} er Leu (L), Phe (F) eller Gly (G);
X_{16} er Ala (A);

X_{17} er Leu (L);
X_{21} er Leu (L); og

minst en av X_4, X_7, X_8, X_{11}, X_{12}, X_{15}, X_{18}, X_{19}, X_{22} og X_{23} er konservativt substituert med en annen rest.

4.
ApoA-I agonist ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at de hydrofile restene er fiksert i samsvar med den strukturelle formel (I) og minst en ikke-fiksert rest er konservativt substituert med en annen rest.

5.
ApoA-I agonist ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at:

X_4 er Glu (E);
X_7 er Glu (E);
X_8 er Asn (N) eller Gln (Q);
X_{11} er Asp (D) eller Glu (E);
X_{12} er Arg (R);
X_{15} er Asp (D);
X_{18} er Asn (N) eller Gln (Q);
X_{19} er Lys (K);
X_{20} er Lys (K);
X_{22} er Lys (K);
X_{23} er fraværende eller Lys (K); og

minst en av X_1, X_2, X_3, X_5, X_6, X_9, X_{10}, X_{13}, X_{14}, X_{16}, X_{17} og X_{21} er konservativt substituert med en annen rest.

6.
ApoA-I agonisten ifølge krav 4, hvori X_3 er Leu (L), eller Phe (F), X_6 er Phe (F), X_9 er Leu (L), X_{10} er Leu (L), Trp (W) eller Gly (G) og minst en av X_1, X_2, X_5, X_{13}, X_{14}, X_{16}, X_{17} og X_{21} er konservativt substituert med en annen rest.

7.
Deletert form av en ApoA-I-agonist, k a r a k t e r i s e r t v e d at ApoA-I-agonisten er i samsvar med krav 1 (ii).

8.

ApoA-I agonist ifølge krav 7, k a r a k t e r i s e r t v e d at en heliksdrening av peptidet er deletert.

9.

ApoA-I agonist ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er et peptid med 22 – 23 rester ifølge den strukturelle formelen (I).

10. 10.

ApoA-I agonist ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at

" - " mellom restene betegner -C(O)NH-;

Z_1 er H_2N-; og

Z_2 er -C(O)OH eller et salt derav.

11.

ApoA-I agonisten ifølge krav 10, k a r a k t e r i s e r t v e d at

X_1 er Pro (P), Ala (A), Gly (G), Asn (N), Asp (D), Gln (Q) eller D-Pro (p);

X_2 er Ala (A), Val (V) eller Leu (L);

X_3 er Leu (L) eller Phe (F);

X_4 er Glu (E);

X_5 er Leu (L);

X_6 er Phe (F);

X_7 er Leu (L) eller Glu (E);

X_8 er Asn (N) eller Gln (Q);

X_9 er Leu (L)

X_{10} er Leu (L), Trp (W) eller Gly (G);

X_{11} er Glu (E);

X_{12} er Arg (R);

X_{13} er Leu (L) eller Gly (G);

X_{14} er Leu (L), Phe (F) eller Gly (G);

X_{15} er Asp (D);

X_{16} er Ala (A);

X_{17} er Leu (L);

X_{18} er Asn (N) eller Gln (Q);

X_{19} er Lys (K);
X_{20} er Lys (K);
X_{21} er Leu (L);
X_{22} er Lys (K); og
X_{23} er fraværende eller Lys (K).

12.
ApoA-I agonist ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at X_{23} er fraværende.

13.
ApoA-I agonist ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at X_{10}, X_{13} og X_{14} er forskjellig fra Gly (G).

14.
ApoA-I-agonist ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at en av X_{10}, X_{13} eller X_{14} er Gly (G) og de andre er forskjellig fra Gly (G).

15.
ApoA-I agonist ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er selektert fra gruppen bestående av:

(SEQ ID:144)	pVLELFENLLERLLDALQKKLK;
(SEQ ID:145)	GVLELFENLLERLLDALQKKLK;
(SEQ ID:146)	PVLELFENLLERLLDALQKKLK;
(SEQ ID NO:147)	PVLELFENLLERLFDALQKKLK;
(SEQ ID NO:148)	PVLELFENLLERLGDALQKKLK;
(SEQ ID NO:149)	PVLELFENLWERLLDALQKKLK;
(SEQ ID NO:150)	PLLELFENLLERLLDALQKKLK;
(SEQ ID NO:151)	PVLELFENLGERLLDALOKKLK;
(SEQ ID NO:152)	PVFELFENLLERLLDALQKKLK;
(SEQ ID NO:153)	AVLELFENLLERLLDALQKKLK;
(SEQ ID NO:154)	PVLELFENLLERGLDALQKKLK;
(SEQ ID NO:155)	PVLELFLNLWERLLDALQKKLK;
(SEQ ID NO:186)	PVLELFEQLLERLLDALQKKLK;
(SEQ ID NO:187)	PVLELFENLLERLLDALNKKLK;
(SEQ ID NO:188)	PVLELFENLLDRLLDALQKKLK;

(SEQ ID NO:189) DVLELFENLLERLLDALQKKLK;

og de N-terminalt acylerte og/eller C-terminalt amiderte eller forestrede formene derav.

16.
Multimer ApoA-I agonist, k a r a k t e r i s e r t v e d at den utviser minst 38% LCAT aktiveringsaktivitet sammenlignet med humant ApoA-I og som har den strukturelle formelen (II):

(II) HH $[LL_m\text{-}HH]_nLL_m\text{-}HH$

eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvori:

hver m er uavhengig et heltall fra 0 til 1;

n er et heltall fra 0 til 10;

hver "HH" er uavhengig et peptid ifølge krav 1;

hver "LL" er uavhengig en bifunksionell linker;

og

hver " - " betegner uavhengig en kovalent binding.

17.
Multimer ApoA-I agonist, k a r a k t e r i s e r t v e d at den utviser minst 38% LCAT aktiveringsaktivitet sammenlignet med humant ApoA-I og har den strukturelle formelen (III):

(III) $X\text{-}N_{ya}\text{-}X_{(ya\text{-}1)}(N_{yb}\text{-}X_{(yb\text{-}1)})_p$

eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvori:

hver X er uavhengig $HH\text{-}(LL_m\text{–}HH)_n\text{-}LL_m\text{–}HH$;

hver HH er uavhengig et peptid ifølge krav 1;

hver LL er uavhengig en bifunksionell linker;

hver m er uavhengig et heltall fra 0 til 1;

hver n er uavhengig et heltall fra 0 til 8;

N_{ya} og N_{yb} er hver uavhengig en multifunksionell koplingsdel hvor y_a og y_b representerer antallet av funksionelle grupper på N_{ya} og N_{yb}, respektivt;

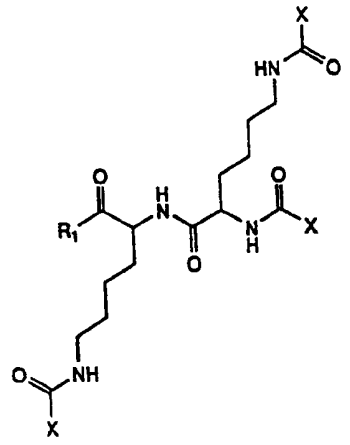
hver y_a eller y_b er uavhengig et heltall fra 3 til 8;

p er et heltall fra 0 til 7; og

hver "–" betegner en uavhengig en kovalent binding.

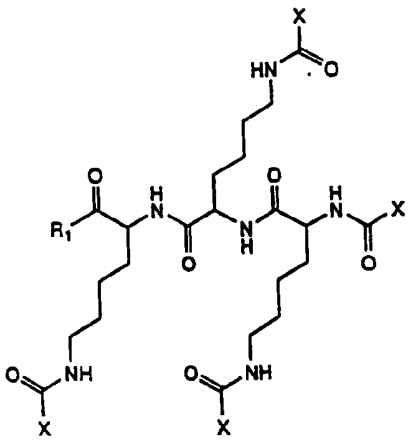
18.

Multimer ApoA-I agonist, k a r a k t e r i s e r t v e d at den utviser minst 38% LCAT aktiveringsaktivitet sammenlignet med humant ApoA-I og har den strukturelle formelen (IV) eller (V):



(IV)

eller



(V)

eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvori:

hver X er uavhengig $HH(LL_m-HH)_nLL_m-HH$;

hver HH er uavhengig et peptid ifølge krav 1;

hver LL er uavhengig en bifunksionell linker;

hver n er uavhengig et heltall fra 0 til 1;

hver m er uavhengig et heltall fra 0 til 8;

R_1 er -OR eller -NRR; og

hver R er uavhengig -H, (C_1-C_6) alkyl, (C_1-C_6) alkenyl, (C_1-C_6) alkynyl; (C_5-C_{20}) aryl (C_6-C_{26}) alkaryl, 5-20 leddet heteroaryl eller 6-26 leddet alkheteroaryl.

19.
Multimer ApoA-I agonist ifølge krav 16, 17 eller 18, k a r a k t e r i s e r t v e d at den bifunksionelle linkeren er avspaltbar.

20.
ApoA-I multimer agonist ifølge krav 16, 17 eller 18, k a r a k t e r i s e r t v e d at n er 0.

21.
Multimer ApoA-I agonist ifølge krav 19, k a r a k t e r i s e r t v e d at m er 0.

22.
Multimer ApoA-I agonist ifølge krav 16, 17 eller 18, k a r a k t e r i s e r t v e d at hver HH er uavhengig en peptid ifølge krav 11.

23.
Multimer ApoA-I agonist ifølge krav 16, 17 eller 18, k a r a k t e r i s e r t v e d at hver HH er uavhengig et peptid ifølge krav 12.

24.
Multimer ApoA-I agonist ifølge krav 16, 17 eller 18, k a r a k t e r i s e r t v e d at hver HH er uavhengig en multimer ifølge krav 16.

25.
ApoA-I agonist-lipidkompleks, k a r a k t e r i s e r t v e d at det består av en ApoA-I agonist og et lipid, hvori ApoA-I agonisten er et peptid ifølge krav 1, en multimer ApoA-I agonist ifølge krav 17, en multimer ApoA-I agonist ifølge krav 18, eller en multimer ApoA-I agonist ifølge krav 19, eller nært beslektede derivater med samme biologiske effekt.

26.
ApoA-I agonist-lipidkompleks ifølge krav 25, k a r a k t e r i s e r t v e d at ApoA-I agonisten er et peptid ifølge krav 9.

27.
ApoA-I agonist-lipidkompleks ifølge krav 25, k a r a k t e r i s e r t v e d at ApoA-I agonisten er et peptid ifølge krav 10.

28.
ApoA-I agonist-lipidkompleks ifølge krav 25, k a r a k t e r i s e r t v e d at ApoA-I agonisten er et peptid ifølge krav 11.

29.
ApoA-I agonist-lipidkompleks ifølge krav 25, k a r a k t e r i s e r t v e d at ApoA-I agonisten er et peptid ifølge krav 15.

30.
ApoA-I agonist-lipidkompleks ifølge krav 25, k a r a k t e r i s e r t v e d at lipidet er sfingomyelin.

31.
ApoA-I agonist-lipidkompleks ifølge krav 25, k a r a k t e r i s e r t v e d at det er i form av et lyofilisert pulver.

32.
ApoA-I agonist-lipidkompleks ifølge krav 25, k a r a k t e r i s e r t v e d at det er i form av en løsning.

33.
Farmasøytisk sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en ApoA-I agonist og en farmasøytisk akseptabel bærer, eksipient eller diluent, hvori ApoA-I agonisten er et peptid ifølge krav 1, en multimer ApoA-I agonist ifølge krav 17, en multimer ApoA-I agonist ifølge krav 18, eller en multimer ApoA-I agonist ifølge krav 19.

34.
Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 33, k a r a k t e r i s e r t v e d at ApoA-I agonisten er et peptid ifølge krav 9.

35.
Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 33, k a r a k t e r i s e r t v e d at ApoA-I agonisten er et peptid ifølge krav 10.

36.
Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 33, k a r a k t e r i s e r t v e d at ApoA-I agonisten er et peptid ifølge krav 11.

37.
Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 34, k a r a k t e r i s e r t v e d at ApoA-I agonisten er et peptid ifølge krav 15.

38.
Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 33, 34, 35, 36 eller 37, k a r a k - t e r i s e r t v e d at ApoA-I agonisten er i form av et ApoA-I agonist-lipidkompleks, hvor nevnte kompleks omfatter ApoA-I agonisten og et lipid.

39.
Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 38, k a r a k t e r i s e r t v e d at ApoA-I agonist-lipidkomplekset er i form av et lyofilisert pulver.

40.
Apo-I agonist ifølge krav 1, for behandling av en pasient som lider av en sykdom assosiert med dyslipidemi.

41.
ApoA-I-agonist ifølge krav 40, k a r a k t e r i s e r t v e d at ApoA-I agonisten er i form av en farmasøytisk sammensetning, hvor nevnte sammensetning omfatter ApoA-I agonisten og en farmasøytisk akseptabel bærer, eksipient eller et fortynningsmiddel.

42.
ApoA-I-agonist ifølge krav 40, k a r a k t e r i s e r t v e d at ApoA-I agonisten er i form av en ApoA-I agonist-lipidkompleks, hvor nevnte kompleks omfatter ApoA-I agonisten og et lipid.

43.
ApoA-I-agonist ifølge krav 40, k a r a k t e r i s e r t v e d at sykdommen assosiert med dyslipidemi er hyperkolesterolemi.

44.
ApoA-I-agonist ifølge krav 40, k a r a k t e r i s e r t v e d at sykdommen assosiert med dyslipidemi er kardiovaskulær sykdom.

45.
ApoA-I-agonist ifølge krav 40, k a r a k t e r i s e r t v e d at sykdommen assosiert med dyslipidemi er aterosklerose.

46.
ApoA-I-agonist ifølge krav 40, k a r a k t e r i s e r t v e d at sykdommen assosiert med dyslipidemi er restenose.

47.
ApoA-I-agonist ifølge krav 40, k a r a k t e r i s e r t v e d at sykdommen assosiert med dyslipidemi er HDL eller ApoA-I mangel.

48.

ApoA-I-agonist ifølge krav 40, k a r a k t e r i s e r t v e d at sykdommen assosiert med dyslipidemi er hypertriglyseridemi.

49.

ApoA-I-agonist ifølge krav 40, k a r a k t e r i s e r t v e d at sykdommen assosiert med dyslipidemi er metabolsk syndrom.

50.

ApoA-I-agonist ifølge krav 41, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte individ er et menneske.

51.

ApoA-I-agonist ifølge krav 41, k a r a k t e r i s e r t v e d at omtrent 0.5 mg/kg til omtrent 100 mg/kg ApoA-I agonist blir administrert til nevnte individ.

SEKVENSLISTER

(1) GENERAL INFORMATION

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

(ii) TITLE OF THE INVENTION: APOLIPOPROTEIN A-I AGONISTS AND THEIR USE TO TREAT DYSLIPIDEMIC DISORDERS

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 254

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
(A) ADDRESSEE. Pennie & Edmonds LLP
(B) STREET 1155 Avenue of the Americas
(C) CITY New York
(D) STATE NY
(E) COUNTRY USA
(F) ZIP 10036-2811

(v) COMPUTER READABLE FORM·
(A) MEDIUM TYPE: Diskette
(B) COMPUTER IBM Compatible
(C) OPERATING SYSTEM. DOS
(D) SOFTWARE. FastSEQ Version 2 0

(vi) CURRENT APPLICATION DATA.
(A) APPLICATION NUMBER· PCT/US98/20326
(B) FILING DATE 28-SEP-1998
(C) CLASSIFICATION.

(vii) PRIOR APPLICATION DATA
(A) APPLICATION NUMBER 08/940,096
(B) FILING DATE 29-SEP-1997

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION
(A) NAME Coruzzi, Laura A
(B) REGISTRATION NUMBER 30,742
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER 9196-0005-228

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION·
(A) TELEPHONE: 650-493-4935
(B) TELEFAX 650-493-5556
(C) TELEX 66141 PENNIE

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 1.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY· linear

(ii) MOLECULE TYPE. None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 4.

```
Pro 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) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 23 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 1
(D) OTHER INFORMATION Xaa = D-Pro

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO:5

```
Xaa 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 Lys
            20
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 6

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE· amino acid
(C) STRANDEDNESS· single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE. None
(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY· Other
(B) LOCATION 13
(D) OTHER INFORMATION. Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 6

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 7.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE 'None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO:7.

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 8

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION· SEQ ID NO:8

```
Pro 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) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9·

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE: None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO 9:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO·10·

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 17
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Naphthylalanine

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION· SEQ ID NO:10·

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 11:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS·
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE. None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 11

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.12

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH· 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY· linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION· SEQ ID NO 12

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 13

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE. None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION· SEQ ID NO 13

```
Gly 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) INFORMATION FOR SEQ ID NO 14

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH· 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE· None
(ix) FEATURE·

(A) NAME/KEY. Other
(B) LOCATION 18
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Orn

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 20
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Orn

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION. 22
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Orn

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO 14

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 15

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS·
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS. single

(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO·15

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 16.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE. None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.16.

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 17.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION. SEQ ID NO 17

```
Pro Val Leu Glu Leu Phe Lys Glu Leu Leu Gln Glu Leu Leu Glu Ala
 1               5                  10                  15
Leu Lys Gln Lys Leu Lys
            20
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 18.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE. None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO:18

Gly 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) INFORMATION FOR SEQ ID NO:19·

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH· 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY· linear

(ii) MOLECULE TYPE: 'None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION. 1
(D) OTHER INFORMATION Xaa = D-Pro

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO·19

Xaa 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) INFORMATION FOR SEQ ID NO:20

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE· amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.20

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:21

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE.

(A) NAME/KEY. Other
(B) LOCATION 1
(D) OTHER INFORMATION Xaa = D-Pro

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.21·

```
Xaa 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) INFORMATION FOR SEQ ID NO:22·

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH· 22 amino acids
(B) TYPE· amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE: None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION· SEQ ID NO 22·

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 23

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 23

```
Pro Leu Leu Glu Leu Phe Lys Glu Leu Leu Gln Glu Leu Leu Glu Ala
 1               5                  10                  15
Leu Lys Gln Lys Leu Lys
            20
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:24

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH· 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE. None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.24·

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.25

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH· 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS· single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE. None
(ix) FEATURE.

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 25

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 26

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH· 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE: None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 26.

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.27

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH· 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION: 14
(D) OTHER INFORMATION: Xaa = Naphthylalanine

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.27.

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.28

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE: None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION. SEQ ID NO:28:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 29:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 29.

Ala 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) INFORMATION FOR SEQ ID NO.30.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY. Other
(B) LOCATION: 1...22
(D) OTHER INFORMATION. N-terminal dansylated peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION· SEQ ID NO 30·

```
Pro 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) INFORMATION FOR SEQ ID NO.31

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY· linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE·

(A) NAME/KEY· Other
(B) LOCATION 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.31

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.32

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY· Other
(B) LOCATION: 1
(D) OTHER INFORMATION· Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION· SEQ ID NO 32

Xaa 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) INFORMATION FOR SEQ ID NO:33.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY- linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO.33

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.34

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE. None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY- Other
(B) LOCATION 5
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Naphthylalanine

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.34

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 35.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 35

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 36:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE: None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION. SEQ ID NO.36

```
Pro Leu Leu Glu Leu Leu Lys Glu Leu Leu Gln Glu Leu Leu Glu Ala
 1               5                  10                  15
Leu Lys Gln Lys Leu Lys
            20
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 37

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH· 22 amino acids
(B) TYPE· amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.37·

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:38

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS·
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY· Other
(B) LOCATION. 13
(D) OTHER INFORMATION: Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO:38.

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO·39:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS·
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS· single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO:39·

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO·40

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS·
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO:40

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 41.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE·

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION. 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO·41

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:42.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE: None
(ix) FEATURE.

(A) NAME/KEY. Other
(B) LOCATION· 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 42

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:43.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY· Other
(B) LOCATION 13
(D) OTHER INFORMATION: Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION. SEQ ID NO·43.

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:44

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE· amino acid

(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE. None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY. Other
(B) LOCATION 1. 22
(D) OTHER INFORMATION· All genetically encoded amino acids are in the D-configuration

(A) NAME/KEY. Other
(B) LOCATION: 13
(D) OTHER INFORMATION: Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION· SEQ ID NO 44:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 45

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE.

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO·45

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 46

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE· amino acid
(C) STRANDEDNESS· single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE: None
(ix) FEATURE.

(A) NAME/KEY: Other
(B) LOCATION 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 46.

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 47:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 21 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE: None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 47

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 48

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE.

(A) NAME/KEY: Other
(B) LOCATION 1
(D) OTHER INFORMATION Xaa = D-Pro

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION: 2
(D) OTHER INFORMATION Xaa = D-Val

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 48

```
Xaa Xaa 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) INFORMATION FOR SEQ ID NO.49.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE: None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION. SEQ ID NO:49

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.50.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 50

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 51

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE. None
(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY. Other
(B) LOCATION. 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION· SEQ ID NO·51

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.52

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS·
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY. linéar

(ii) MOLECULE TYPE: None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY: Other
(B) LOCATION. 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION. SEQ ID NO·52:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.53·

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE. None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 53

```
Val 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) INFORMATION FOR SEQ ID NO 54

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE· None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:54.

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:55

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 19 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO.55

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 56:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:56

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.57:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO.57

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

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.58

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH 21 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION. 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION. SEQ ID NO 58

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 59

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH· 22 amino acids
(B) TYPE· amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION. SEQ ID NO 59

```
Leu 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) INFORMATION FOR SEQ ID NO.60

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH. 19 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 60.

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

Leu Lys Gln

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.61.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION. 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 61

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 62

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION: 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 62·

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 63

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE·

(A) NAME/KEY· Other
(B) LOCATION· 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION· SEQ ID NO 63

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 64.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE· amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 64.

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 65

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH 21 amino acids
(B) TYPE· amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 12
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION. SEQ ID NO 65

Val 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) INFORMATION FOR SEQ ID NO 66

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE: None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:66:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 67

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 21 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO:67:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 68

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE. None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO:68

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 69·

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 69

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 70

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 70

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 71

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE amino acid

(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE.

(A) NAME/KEY: Other
(B) LOCATION 14
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO.71

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 72

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION· SEQ ID NO 72

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 73

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY· linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO·73

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 74

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linéar

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION· 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION. SEQ ID NO.74.

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 75

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO:75

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.76

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE· amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE. None

(ix) FEATURE.

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.76

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 77.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO:77

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 78

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION. 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 78

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

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 79

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:79:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:80

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:80

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:81

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: None
(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Other
(B) LOCATION: 13
(D) OTHER INFORMATION: Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:81

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.82

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH. 20 amino acids
(B) TYPE· amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE·

(A) NAME/KEY· Other
(B) LOCATION 11
(D) OTHER INFORMATION. Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 82

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.83

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH· 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 13
(D) OTHER INFORMATION· Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 83

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 84

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 84

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 85.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH· 21 amino acids
(B) TYPE· amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 85

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 86

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 86:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 87

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH· 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 1 22
(D) OTHER INFORMATION· All amino acids are in the D-configuration

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION· SEQ ID NO 87

```
Pro Leu Leu Glu Leu Leu Lys Glu Leu Leu Gln Glu Leu Leu Glu Ala
 1               5                  10                  15
Leu Lys Gln Lys Leu Lys
            20
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:88:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE: None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.88

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.89

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE.

(A) NAME/KEY. Other
(B) LOCATION: 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION. SEQ ID NO 89

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

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO·90·

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 19 amino acids
(B) TYPE· amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION: 10
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 90.

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 91

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO·91

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 92

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 13
(D) OTHER INFORMATION. Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO 92.

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:93

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION. 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.93

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 94.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO 94

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:95

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE: None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY. Other
(B) LOCATION 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 95

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:96

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE.

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 1 . 22
(D) OTHER INFORMATION All genetically encoded amino acids are in the D-configuration

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:96

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:97

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 15 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 97

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 98

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH· 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 98

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 99

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE· None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 99

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.100

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE· amino acid
(C) STRANDEDNESS· single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE.

(A) NAME/KEY· Other
(B) LOCATION 1. 22
(D) OTHER INFORMATION. All amino acids are in the D-configuration

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION. SEQ ID NO 100

```
Pro 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) INFORMATION FOR SEQ ID NO:101

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS·
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS· single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE.

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION· 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 101

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 102.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH· 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION: 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.102

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 103

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS

(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.103

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.104.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 15 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO.104

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 105:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 105

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.106.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE: None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO:106

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO·107

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY. linéar

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 1. 22
(D) OTHER INFORMATION All amino acids are in the D-configuration

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 107

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 108

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.108

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 109.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS

(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 109

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 110

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS·
(A) LENGTH· 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 14
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 110

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 111

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS·
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE.

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.111

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 112

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH· 22 amino acids
(B) TYPE· amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE. None
(ix) FEATURE·

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.112

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 113

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.113

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO·114

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY: Other
(B) LOCATION. 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 114.

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:115·

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS·
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 13
(D) OTHER INFORMATION. Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO:115

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 116

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS· single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE. None
(ix) FEATURE.

(A) NAME/KEY. Other
(B) LOCATION: 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO·116:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.117

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH· 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE: None
(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY. Other
(B) LOCATION 13
(D) OTHER INFORMATION: Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO:117

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 118

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE·

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION· 13
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO.118

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 119·

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid

(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE· None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION. 17
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION. SEQ ID NO.119

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 120

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS·
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS· single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 16
(D) OTHER INFORMATION· Xaa = Aib

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION· SEQ ID NO 120

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 121

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE. None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:121:

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

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 122.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS·
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.122

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.123

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS·
(A) LENGTH· 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION· SEQ ID NO 123

Gln 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) INFORMATION FOR SEQ ID NO 124

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE· amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY: Other
(B) LOCATION 18
(D) OTHER INFORMATION: Xaa = Orn

(A) NAME/KEY· Other
(B) LOCATION 20
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Orn

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 22
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Orn

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 124

```
Pro Val Leu Asp Leu Phe Xaa Glu Leu Leu Asn Glu Leu Leu Glu Ala
 1               5                  10                  15
Leu Xaa Gln Xaa Leu Xaa
            20
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 125

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.125

```
Asn 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) INFORMATION FOR SEQ ID NO:126

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.126

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:127

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO:127

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 128

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS·
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY. linéar

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION. SEQ ID NO 128

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.129

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION. SEQ ID NO 129

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 130

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 130

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

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 131·

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION. SEQ ID NO 131.

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:132

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE· None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 132

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 133.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH· 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE. None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION. SEQ ID NO:133

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:134

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS

(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 134·

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 135·

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS·
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE. None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 135·

```
Asp 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) INFORMATION FOR SEQ ID NO 136

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 136

```
Pro Ala Leu Glu Leu Phe Lys Asp Leu Leu Gln Glu Leu Leu Glu Ala
 1               5                  10                  15
Leu Lys Gln Lys Leu Lys
            20
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.137

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY· linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY. Other
(B) LOCATION 17
(D) OTHER INFORMATION. Xaa = Naphthylalanine

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 137

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 138.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 138

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 139

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 139·

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 140

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS·
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 18
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Orn

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION: 20
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Orn

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION: 22
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Orn

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 140

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 141

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 141

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 142

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY· linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 142

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

Leu Lys Gln Lys Leu Lys
20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:143.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE·

(A) NAME/KEY: Other
(B) LOCATION. 1. 22
(D) OTHER INFORMATION N-terminal acetylated and C-terminal amidated peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO:143

Pro 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) INFORMATION FOR SEQ ID NO 144

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY. Other
(B) LOCATION 1
(D) OTHER INFORMATION. Xaa = D-Pro

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.144

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 145

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.145.

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 146·

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 146

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.147.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH· 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 147

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.148

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION· SEQ ID NO 148:

```
Pro Val Leu Glu Leu Phe Glu Asn Leu Leu Glu Arg Leu Gly Asp Ala
```

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 149

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE: None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.149

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 150

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 150.

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 151

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE, amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE: None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 151·

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.152

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE. None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION. SEQ ID NO·152:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.153

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE. None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 153

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 154

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION. SEQ ID NO·154

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 155

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO.155.

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 156:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 156

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 157

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 157

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 158

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO 158

```
Pro Val Leu Glu Leu Phe Leu Asn Leu Leu Glu Arg Leu Leu Asp Trp
```

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 159

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 159.

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 160

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY· linear

(ii) MOLECULE TYPE. None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.160

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 161

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE. None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 161

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 162

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE· amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY· linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 162

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:163:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.163

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 164·

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO·164

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 165

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.165

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.166·

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.166

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 167

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS·
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 167

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 168·

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS·
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 168

```
Pro Val Leu Glu Leu Phe Glu Gln Leu Leu Glu Lys Leu Leu Asp Ala
```

1 5 10 15
Leu Gln Lys Lys Leu Lys
20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO·169

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY· linear

(ii) MOLECULE TYPE. None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION· SEQ ID NO.169

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 170

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE: None
(ix) FEATURE.

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 12
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Orn

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 19
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Orn

(A) NAME/KEY· Other
(B) LOCATION 20
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Orn

(A) NAME/KEY. Other
(B) LOCATION 22
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Orn

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION· SEQ ID NO.170

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

Leu Gln Xaa Xaa Leu Xaa
20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:171·

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH· 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO·171

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.172.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH· 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 172

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 173

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS· single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO:173

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO·174·

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE· amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY: Other
(B) LOCATION 1 22
(D) OTHER INFORMATION: All amino acids are in the D-configuration

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION. SEQ ID NO 174·

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO·175

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE· amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.175

```
Pro Val Leu Glu Leu Phe Glu Asn Leu Leu Glu Arg Leu Leu Glu Leu
 1               5                  10                  15
Leu Asn Lys Lys Leu Lys
            20
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 176

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE· None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 176

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.177

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 177

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 178

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 178

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 179·

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE· amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY· linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO·179

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 180

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.180

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 181

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE· amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY· linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 181

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 182:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 182

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 183

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 183

```
Pro Leu Leu Glu Leu Phe Glu Asn Leu Leu Glu Lys Leu Leu Asp Ala
```

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 184

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE: None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.184

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 185

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 19
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Orn

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 20
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Orn

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 22
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Orn

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 185.

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 186.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO:186.

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:187.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS· single
(D) TOPOLOGY· linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION. SEQ ID NO 187

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 188

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 188

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO·189

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 189.

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO·190·

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH. 22 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE· None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 190·

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 191

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 1...18
(D) OTHER INFORMATION N-terminal acetylated and
C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO·191.

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.192

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE: None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 1 18
(D) OTHER INFORMATION N-terminal acetylated and C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION. SEQ ID NO:192

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:193

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 1 . 18
(D) OTHER INFORMATION N-terminal acetylated and C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO 193:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:194:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH. 18 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE. None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY: Other
(B) LOCATION 1 .18
(D) OTHER INFORMATION N-terminal acetylated and C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.194.

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 195

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE: None
(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION. 1. .18
(D) OTHER INFORMATION N-terminal acetylated and C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 195.

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.196

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 1 .18
(D) OTHER INFORMATION: N-terminal acetylated and C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO:196

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:197

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE. amino acid

(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY. Other
(B) LOCATION· 1 . 18
(D) OTHER INFORMATION N-terminal acetylated and C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 197

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO·198

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE. None
(ix) FEATURE.

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 1. .18
(D) OTHER INFORMATION. N-terminal acetylated and C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO·198

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.199.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH· 18 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY· linear

(ii) MOLECULE TYPE: None
(ix) FEATURE·

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 1 . 18
(D) OTHER INFORMATION· N-terminal acetylated and C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.199

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.200.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 18 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE.

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION. 1...18
(D) OTHER INFORMATION N-terminal acetylated and C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.200

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 201

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION· 1 18
(D) OTHER INFORMATION N-terminal acetylated and C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION· SEQ ID NO:201

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.202

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.

(A) LENGTH: 18 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 1.. 18
(D) OTHER INFORMATION: N-terminal acetylated and C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:202

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 203

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION: 1 18
(D) OTHER INFORMATION. N-terminal acetylated and C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 203

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 204:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH. 18 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE. None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 1. 18

(D) OTHER INFORMATION: N-terminal acetylated and
C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.204:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 205

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS·
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE.

(A) NAME/KEY: Other
(B) LOCATION 1 . 18
(D) OTHER INFORMATION. N-terminal acetylated and
C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 205

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 206

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 1 18
(D) OTHER INFORMATION: N-terminal acetylated and
C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 206:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.207

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH· 18 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE. None
(ix) FEATURE:

(A) ·NAME/KEY· Other
(B) LOCATION 1..18
(D) OTHER INFORMATION N-terminal acetylated and C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 207

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.208.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH. 18 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 1. 18
(D) OTHER INFORMATION N-terminal acetylated and C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 208

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 209

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH· 18 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE: None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 209

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.210

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linéar

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 210

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 211

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY· linear

(ii) MOLECULE TYPE. None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 1 18
(D) OTHER INFORMATION N-terminal acetylated and
C-terminal amidated

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 14
(D) OTHER INFORMATION· Xaa = Orn

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION· 16
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Orn

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 18
(D) OTHER INFORMATION: Xaa = Orn

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION· SEQ ID NO 211

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.212

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 1.. 18
(D) OTHER INFORMATION N-terminal acetylated and C-terminal amidated

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 7
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Orn

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION: 14
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Orn

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 16
(D) OTHER INFORMATION Xaa = Orn

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 212

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 213.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY. Other
(B) LOCATION 1 ..18

(D) OTHER INFORMATION N-terminal acetylated and
C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION. SEQ ID NO 213

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.214

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE· None
(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 1 .18
(D) OTHER INFORMATION N-terminal acetylated and
C-terminal amidated

(A) NAME/KEY. Other
(B) LOCATION. 1
(D) OTHER INFORMATION D-configuration of Pro

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 214

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.215

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH. 18 amino acids
(B) TYPE· amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY: Other
(B) LOCATION· 1 18
(D) OTHER INFORMATION N-terminal acetylated and
C-terminal amidated

(xi) $EQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO·215

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 216.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION· SEQ ID NO·216

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 217

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE· amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 217

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 218.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH· 18 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE: None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY: Other
(B) LOCATION 1 18
(D) OTHER INFORMATION: N-terminal acetylated and
C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.218

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 219

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE: None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.219.

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 220

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 220

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.221.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE: None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION: 1 ..18
(D) OTHER INFORMATION: N-terminal acetylated and
C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 221

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 222

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE: None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.222

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 223

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE· None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 223.

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 224

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS·
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION. SEQ ID NO.224

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.225.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH· 18 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:225

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.226.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH. 18 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE: None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION. SEQ ID NO 226

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 227

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE· None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 1 ..18
(D) OTHER INFORMATION N-terminal acetylated and C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 227

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.228.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 18 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE. None
(ix) FEATURE·

(A) NAME/KEY. Other
(B) LOCATION: 1....18
(D) OTHER INFORMATION N-terminal acetylated and C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.228

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.229·

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH· 18 amino acids
(B) TYPE.-amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 1 18
(D) OTHER INFORMATION· N-terminal acetylated and C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION· SEQ ID NO 229

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:230·

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 18 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE: None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION. SEQ ID NO 230·

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.231.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH. 18 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linéar

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION· SEQ ID NO 231

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 232

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE· amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 1 18
(D) OTHER INFORMATION N-terminal acetylated and
C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO 232

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.233

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH
(B) TYPE.
(C) STRANDEDNESS
(D) TOPOLOGY

(ii) MOLECULE TYPE

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO·233

This sequence has been intentionally skipped

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:234

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH
(B) TYPE.
(C) STRANDEDNESS.
(D) TOPOLOGY·

(ii) MOLECULE TYPE ' '

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION· SEQ ID NO.234·

This sequence has been intentionally skipped

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.235:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS·
(A) LENGTH
(B) TYPE
(C) STRANDEDNESS
(D) TOPOLOGY

(ii) MOLECULE TYPE

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.235

This sequence has been intentionally skipped

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 236.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH
(B) TYPE.
(C) STRANDEDNESS
(D) TOPOLOGY.

(ii) MOLECULE TYPE

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.236:

This sequence has been intentionally skipped

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.237

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single

(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE: None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:237

```
Leu Asp Asp Leu Leu Gln Lys Trp Ala Glu Ala Phe Asn Gln Leu Leu
 1               5                  10                  15
Lys Lys
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:238:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 18 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION: 1. .18
(D) OTHER INFORMATION. N-terminal acetylated and C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 238:

```
Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Val Leu Glu Lys Leu Lys Glu
 1               5                  10                  15
Leu Phe
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 239

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE. None
(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Other
(B) LOCATION: 1 ..18
(D) OTHER INFORMATION. N-terminal acetylated and C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION. SEQ ID NO.239:

```
Glu Trp Leu Glu Ala Phe Tyr Lys Lys Val Leu Glu Lys Leu Lys Glu
 1               5                  10                  15
Leu Phe
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO·240

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS·
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY· linear

(ii) MOLECULE TYPE· None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY· Other
(B) LOCATION: 1...18
(D) OTHER INFORMATION: N-terminal acetylated and C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.240

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.241.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE: None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 241.

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.242:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS·
(A) LENGTH. 18 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE· None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:242

Gly Ile Lys Lys Phe Leu Gly Ser Ile Trp Lys Phe Ile Lys Ala Phe
1 5 10 15
Val Gly

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.243.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 18 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO 243·

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:244

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO:244

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.245

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION· SEQ ID NO 245

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:246

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH· 18 amino acids
(B) TYPE amino acid

(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE. None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO.246.

```
Glu Trp Leu Glu Ala Phe Tyr Lys Lys Val Leu Glu Lys Leu Lys Glu
 1               5                  10                  15
Leu Phe
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO·247

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH. 18 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY· linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.247

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 248

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 18 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 248

```
Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Val Leu Glu Lys Leu Lys Glu
 1               5                  10                  15
Leu Phe
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.249

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS·
(A) LENGTH· 18 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS· single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE. None
(ix) FEATURE.

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 1 . 18
(D) OTHER INFORMATION N-terminal acetylated and
C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 249·

```
Glu Trp Leu Lys Ala Glu Tyr Glu Lys Val Glu Glu Lys Leu Lys Glu
 1               5                  10                  15
Leu Phe
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.250·

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS·
(A) LENGTH. 18 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE: None
(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION. 1 18
(D) OTHER INFORMATION N-terminal acetylated and
C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 250

```
Glu Trp Leu Lys Ala Glu Tyr Glu Lys Val Leu Glu Lys Leu Lys Glu
 1               5                  10                  15
Leu Phe
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO·251

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 18 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE· None
(ix) FEATURE·

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 1 .18
(D) OTHER INFORMATION N-terminal acetylated and
C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION. SEQ ID NO 251

```
Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Lys Lys Val Leu Glu Lys Leu Lys Glu
 1               5                  10                  15
Leu Phe
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:252.

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS.
(A) LENGTH 15 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY· linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE.

(A) NAME/KEY· Other
(B) LOCATION· 1 .15
(D) OTHER INFORMATION N-terminal acetylated and C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 252

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 253

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH· 16 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE· None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 1 16
(D) OTHER INFORMATION· N-terminal acetylated and C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO:253

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 254·

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 16 amino acids
(B) TYPE. amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE. None
(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY Other

(B) LOCATION 1...16
(D) OTHER INFORMATION: N-terminal acetylated and C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO.254.

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 255:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH 15 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS. single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION 1...15
(D) OTHER INFORMATION: N-terminal acetylated and C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.255

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:256:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH 16 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY. linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION: 1.. 16
(D) OTHER INFORMATION N-terminal acetylated and C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO 256:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.257

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH: 16 amino acids
(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY· linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY. Other
(B) LOCATION. 1 16
(D) OTHER INFORMATION: N-terminal acetylated and C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO 257:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.258

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS
(A) LENGTH. 16 amino acids
(B) TYPE amino acid
(C) STRANDEDNESS single
(D) TOPOLOGY linear

(ii) MOLECULE TYPE None
(ix) FEATURE

(A) NAME/KEY Other
(B) LOCATION: 1.. 16
(D) OTHER INFORMATION N-terminal acetylated and C-terminal amidated

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO.258.

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

AMFIFATISK α-HELIKS

HYDROFOB RESIDIE

HYDROFIL RESIDIE

HELIKS HJUL

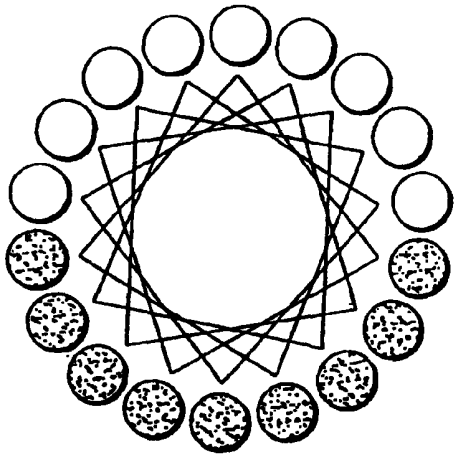


FIG. 1A

AMFIFATISK α-HELIKS

HYDROFOB RESIDIE

HYDROFIL RESIDIE

HELIKS NETT

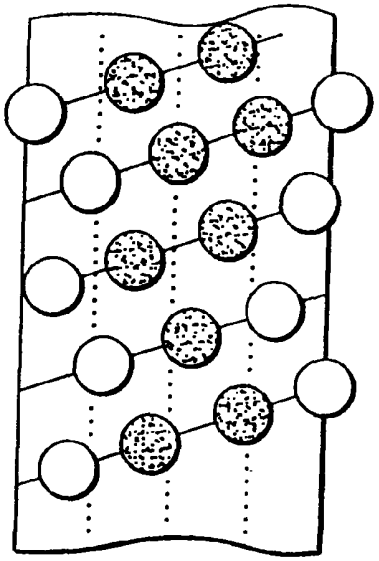


FIG. 1B

AMFIFATISK α-HELIKS

HYDROFOB RESIDIE

HYDROFIL RESIDIE

HELIKS SYLINDER

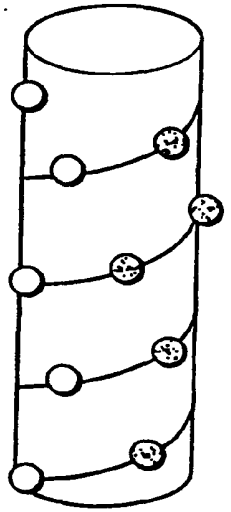


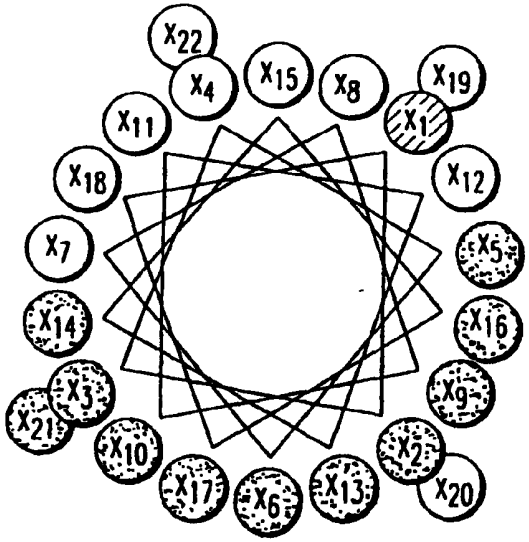
FIG. 1C

STRUKTUR (1)

HYDROFIL

HYDROFOB

HYDROFOB ELLER HYDROFIL



HELIKS HJUL

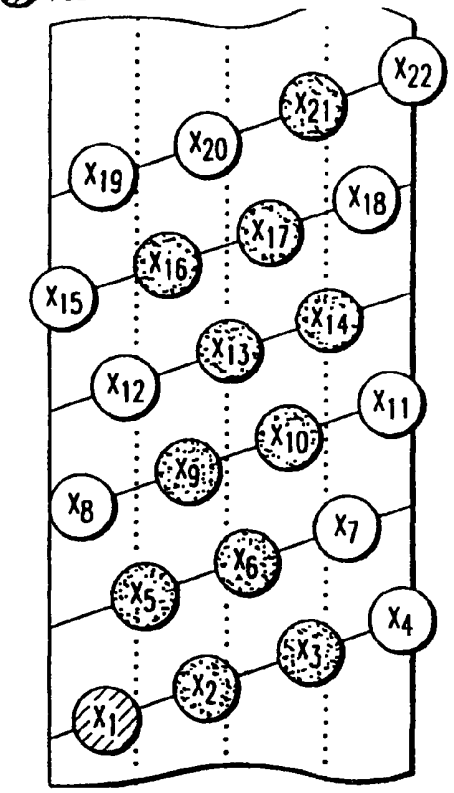
FIG.2A

STRUKTUR (1)

HYDROFIL

HYDROFOB

HYDROFOB ELLER HYDROFIL



HYDROFOB SIDE SENTRERT

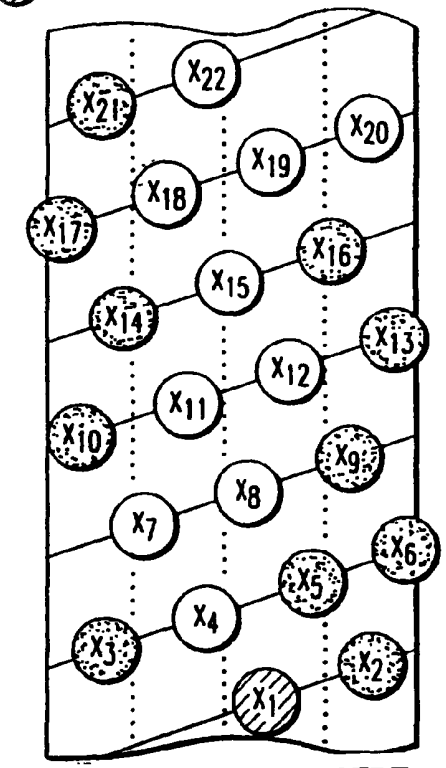
FIG.2B

STRUKTUR (1)

HYDROFIL

HYDROFOB

HYDROFOB ELLER HYDROFIL



HYDROFIL SIDE SENTRERT

FIG.2C

HYDROFIL SIDE SENTRERT

KONSENSUS 22-MER

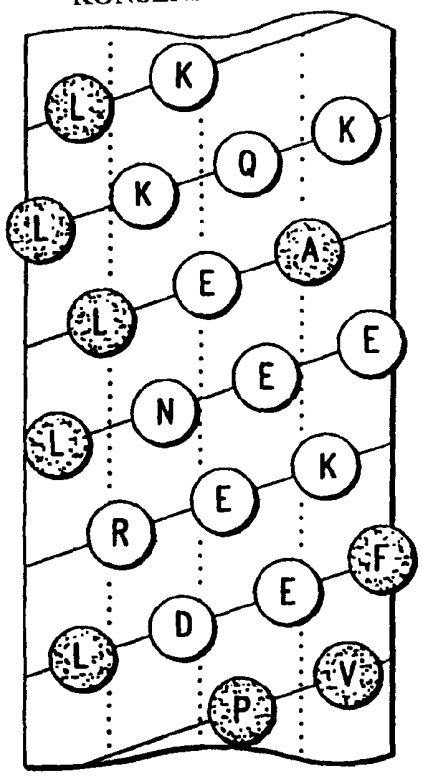


FIG.3A

HYDROFIL SIDE SENTRERT

PEPTID 146

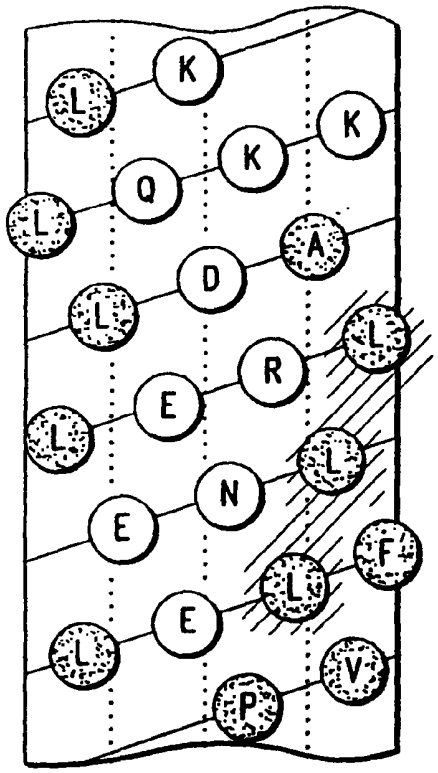


FIG.3B

HYDROFOB SIDE SENTRERT

KONSENSUS 22-MER

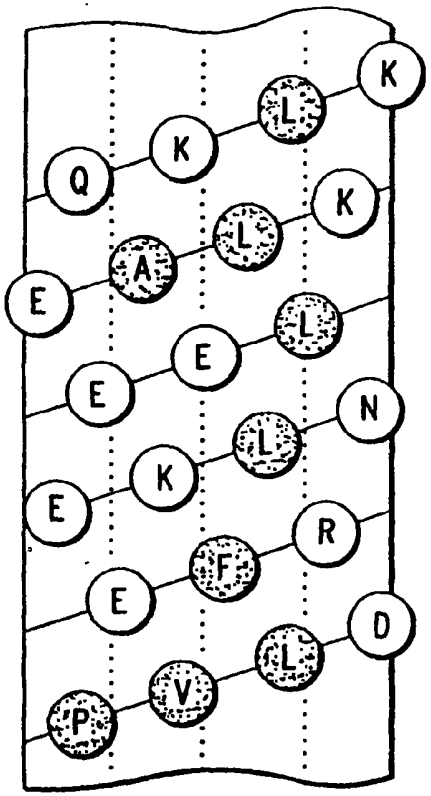


FIG.4A

HYDROFOB SIDE SENTRERT

PEPTID 146

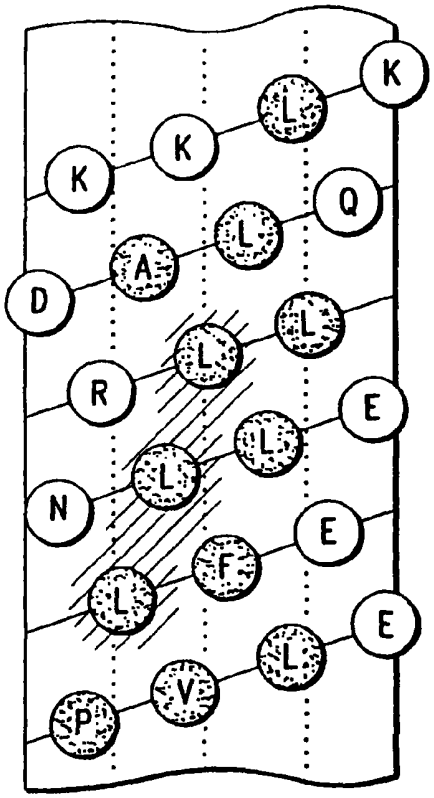


FIG.4B

HELIKS HJUL

KONSENSUS 22-MER

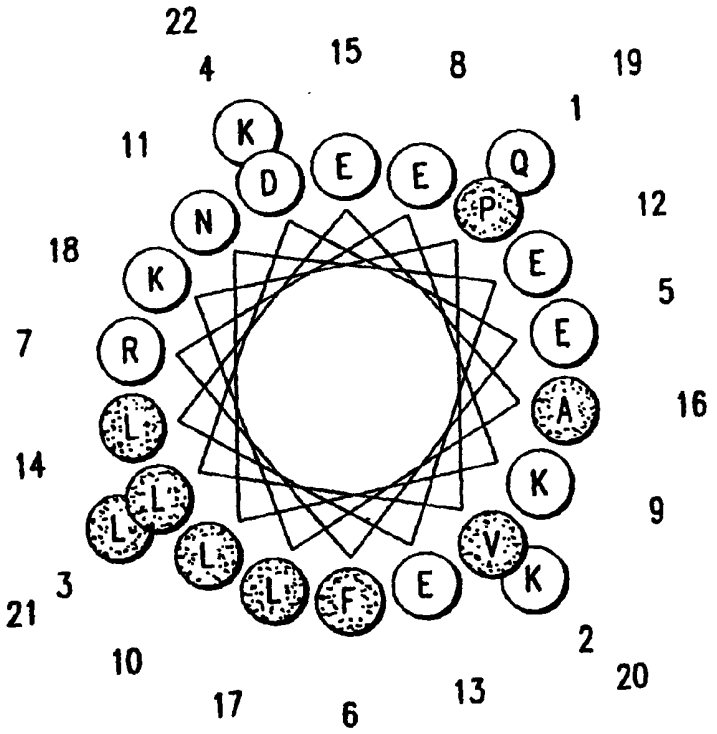


FIG.5A

HELIKS HJUL

PEPTID 146

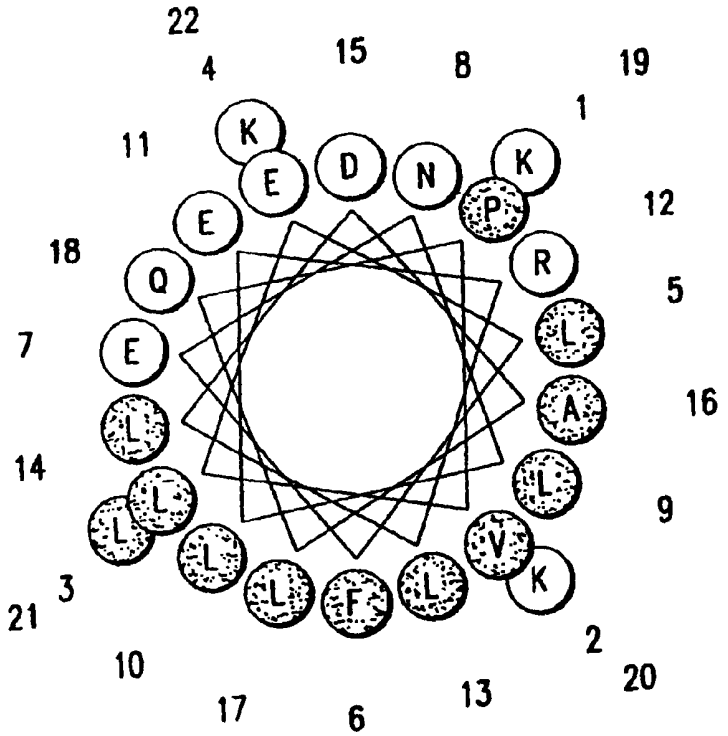


FIG.5B

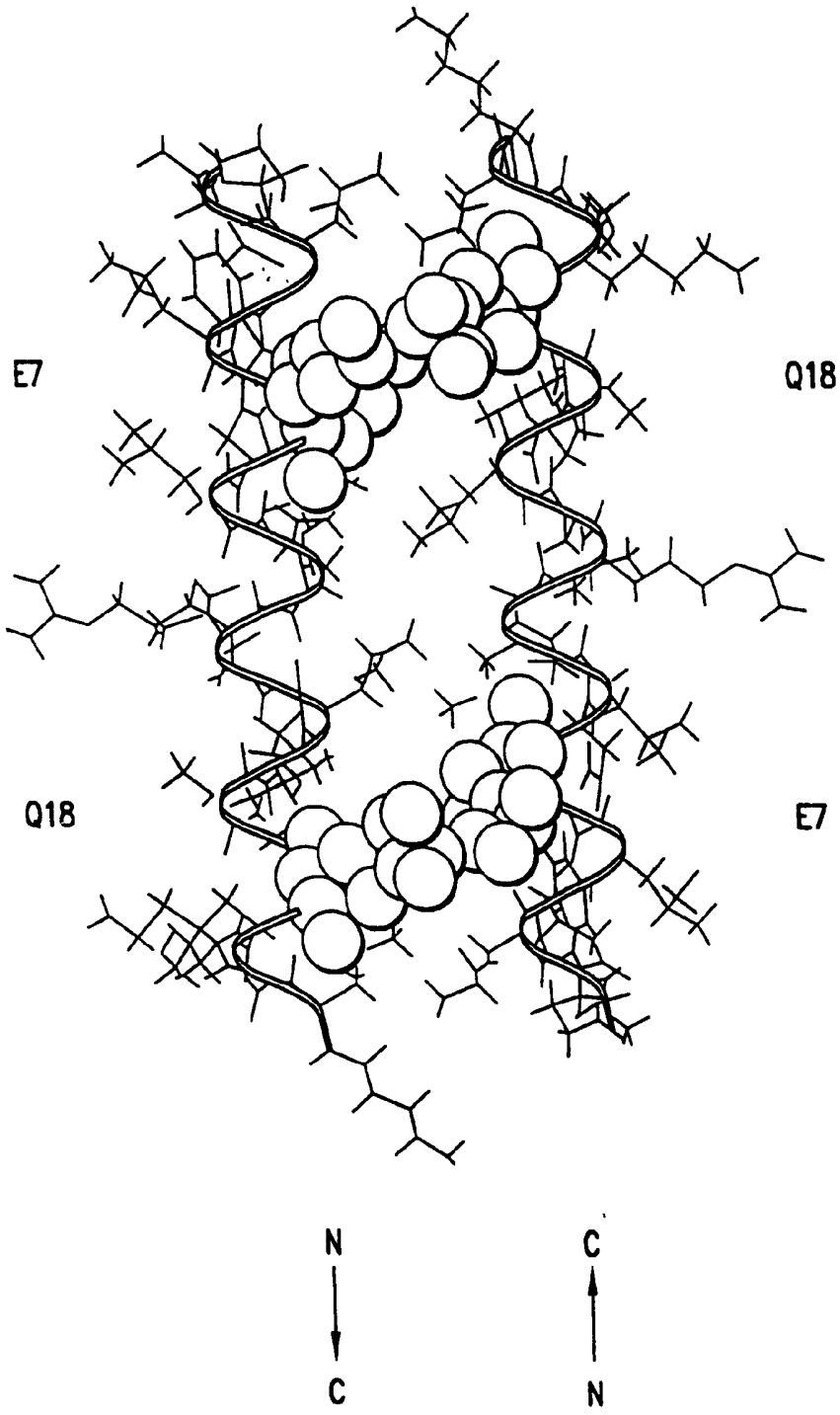


FIG.6

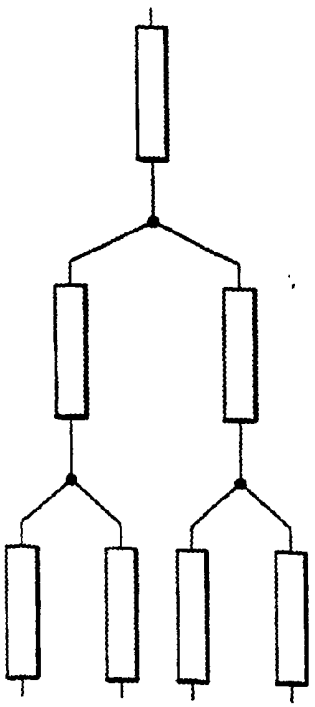


FIG. 7A

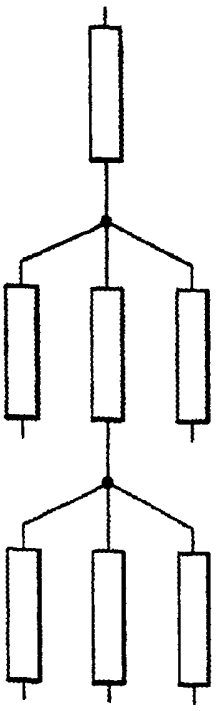


FIG. 7B

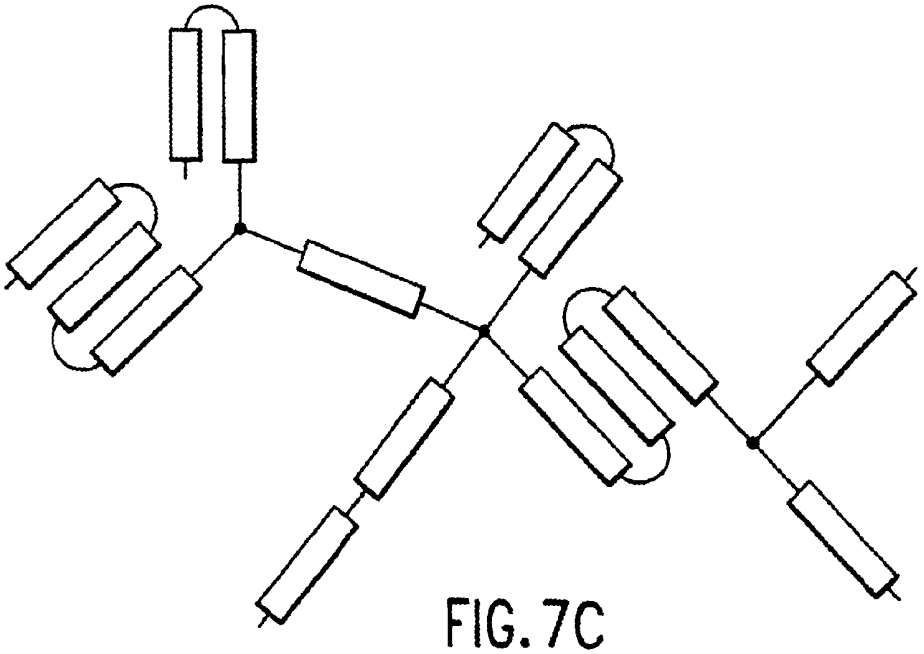


FIG. 7C

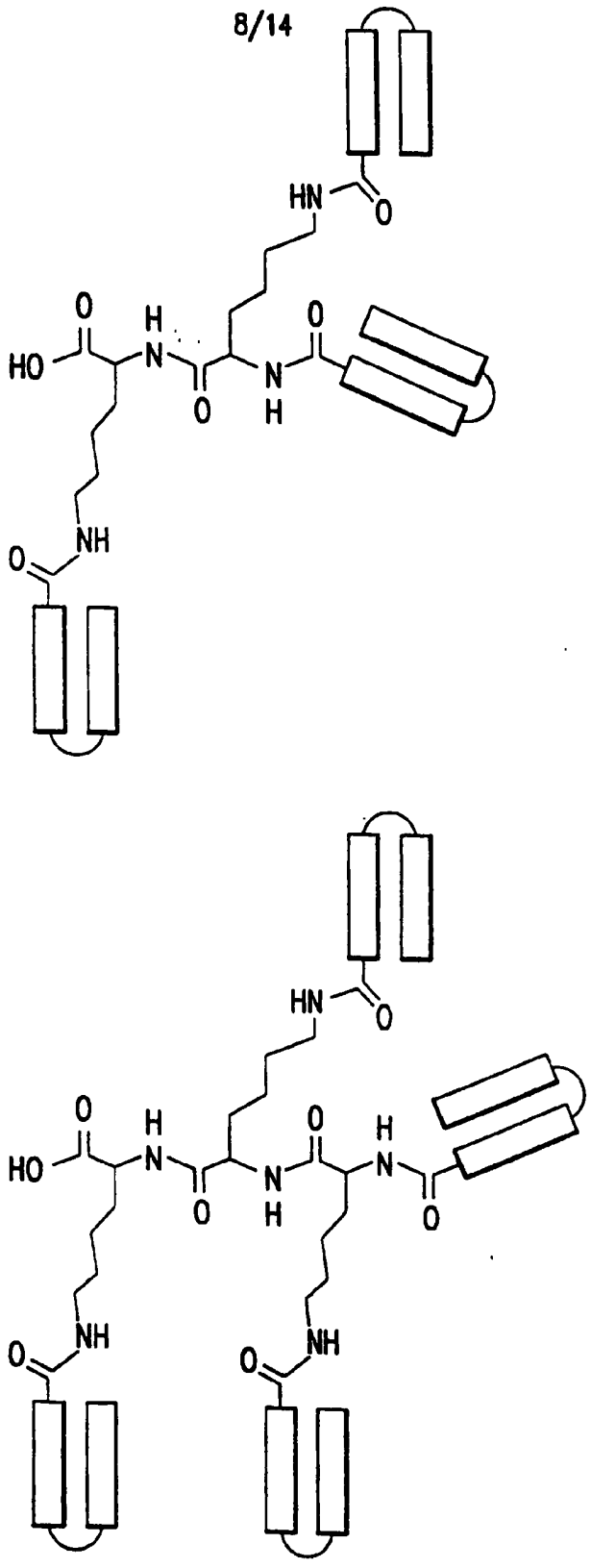


FIG. 7D

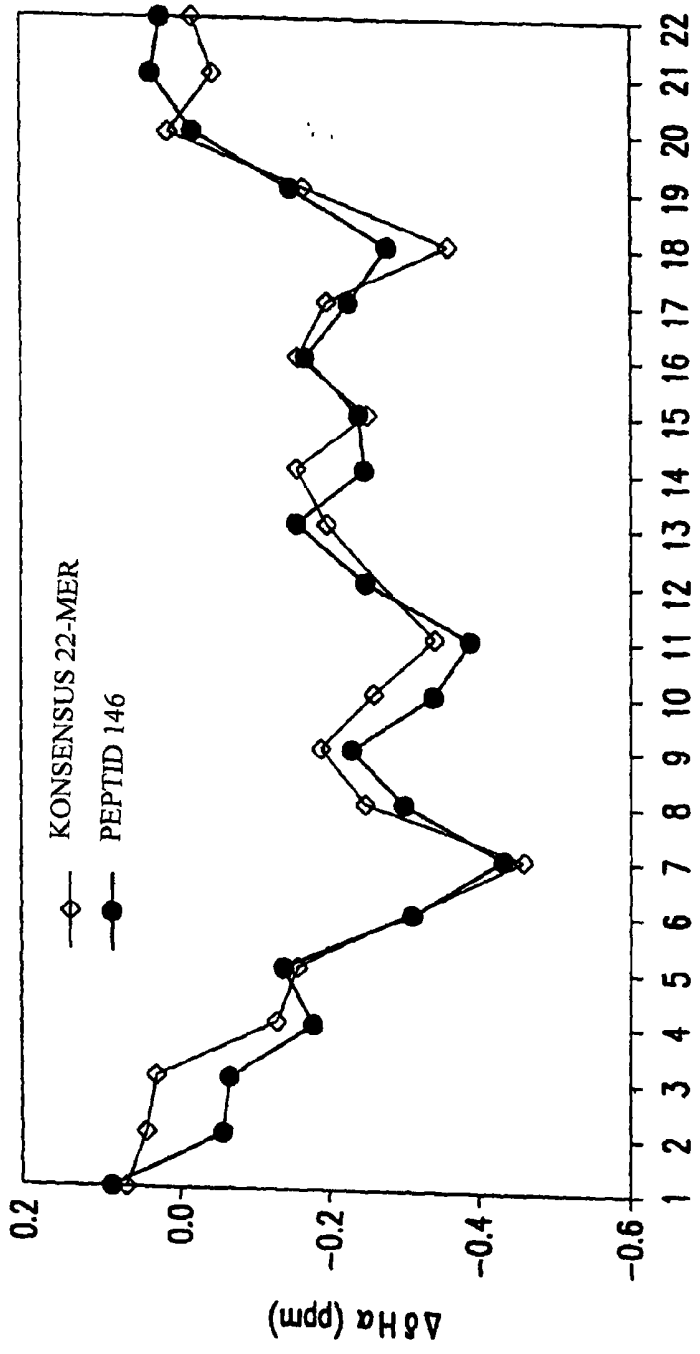

KONSENSUS 22-MER
PEPTID 146
0.2
0.0
-0.2
-0.4
-0.6
Δδ Hα (ppm)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22
RESIDIE

FIG. 8A

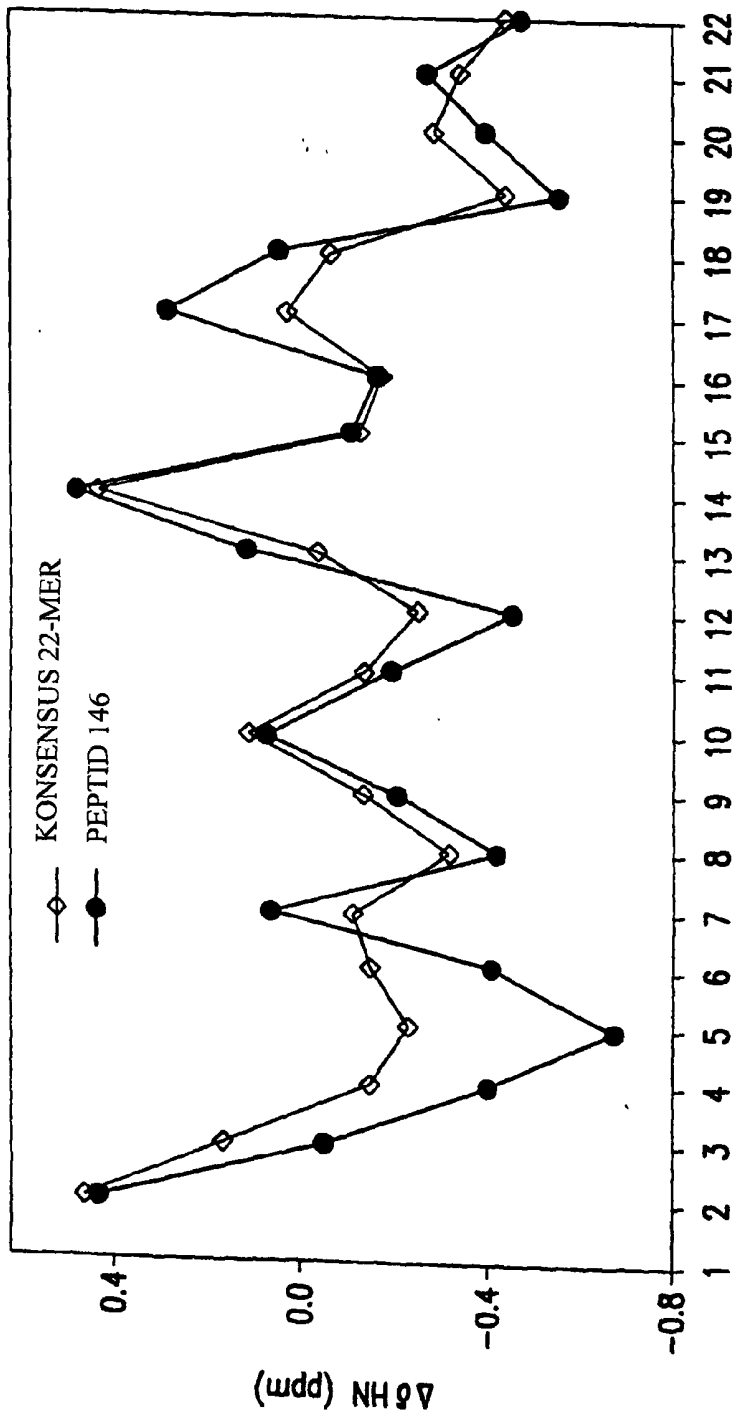

KONSENSUS 22-MER
PEPTID 146
0.4
0.0
-0.4
-0.8
Δδ HN (ppm)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22
RESIDIE

FIG.8B

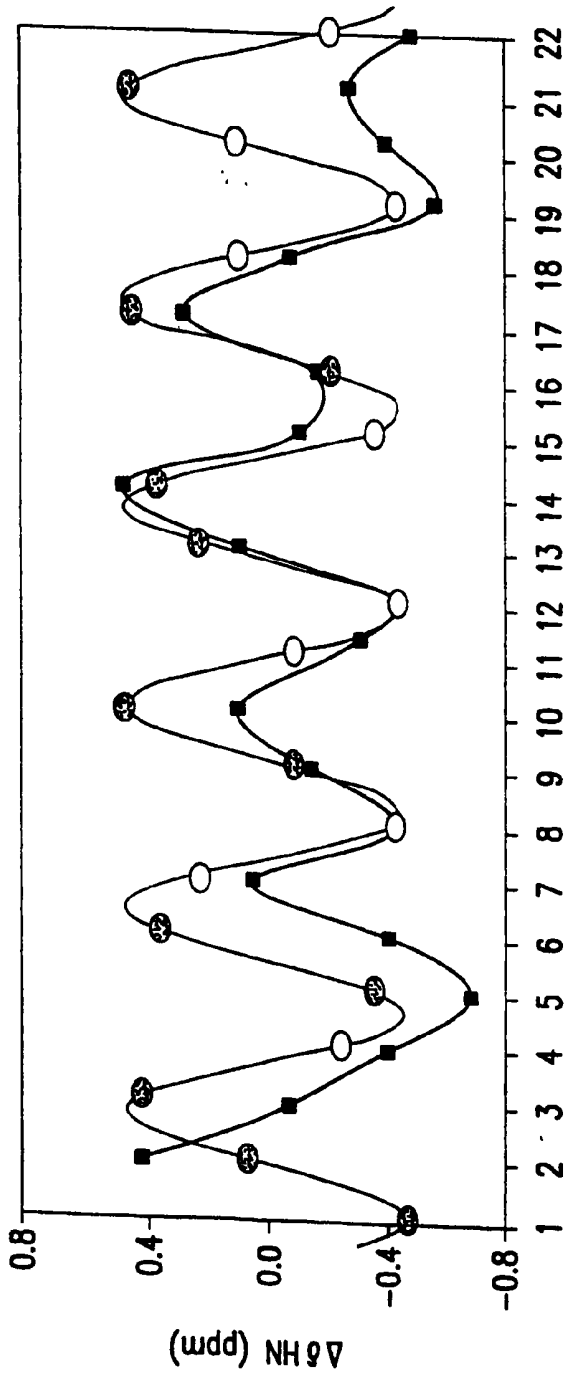

Δδ HN (ppm)
0.8
0.4
0.0
-0.4
-0.8
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22
RESIDIE

FIG.8C

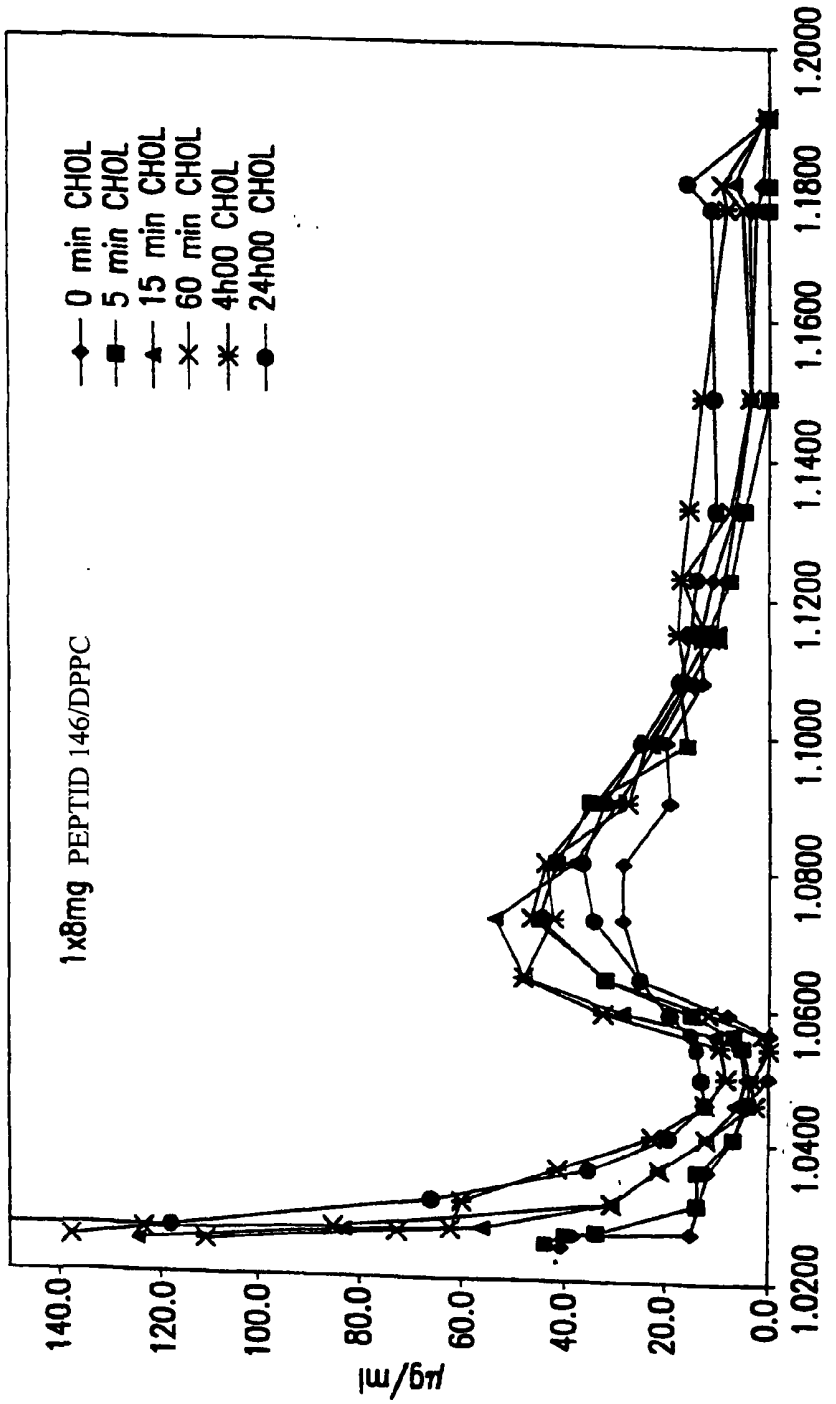

1x8mg PEPTID 146/DPPC
0 min CHOL
5 min CHOL
15 min CHOL
60 min CHOL
4h00 CHOL
24h00 CHOL
µg/ml
140.0
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
1.0200
1.0400
1.0600
1.0800
1.1000
1.1200
1.1400
1.1600
1.1800
1.2000
DENSITET (g/ml)

FIG.9

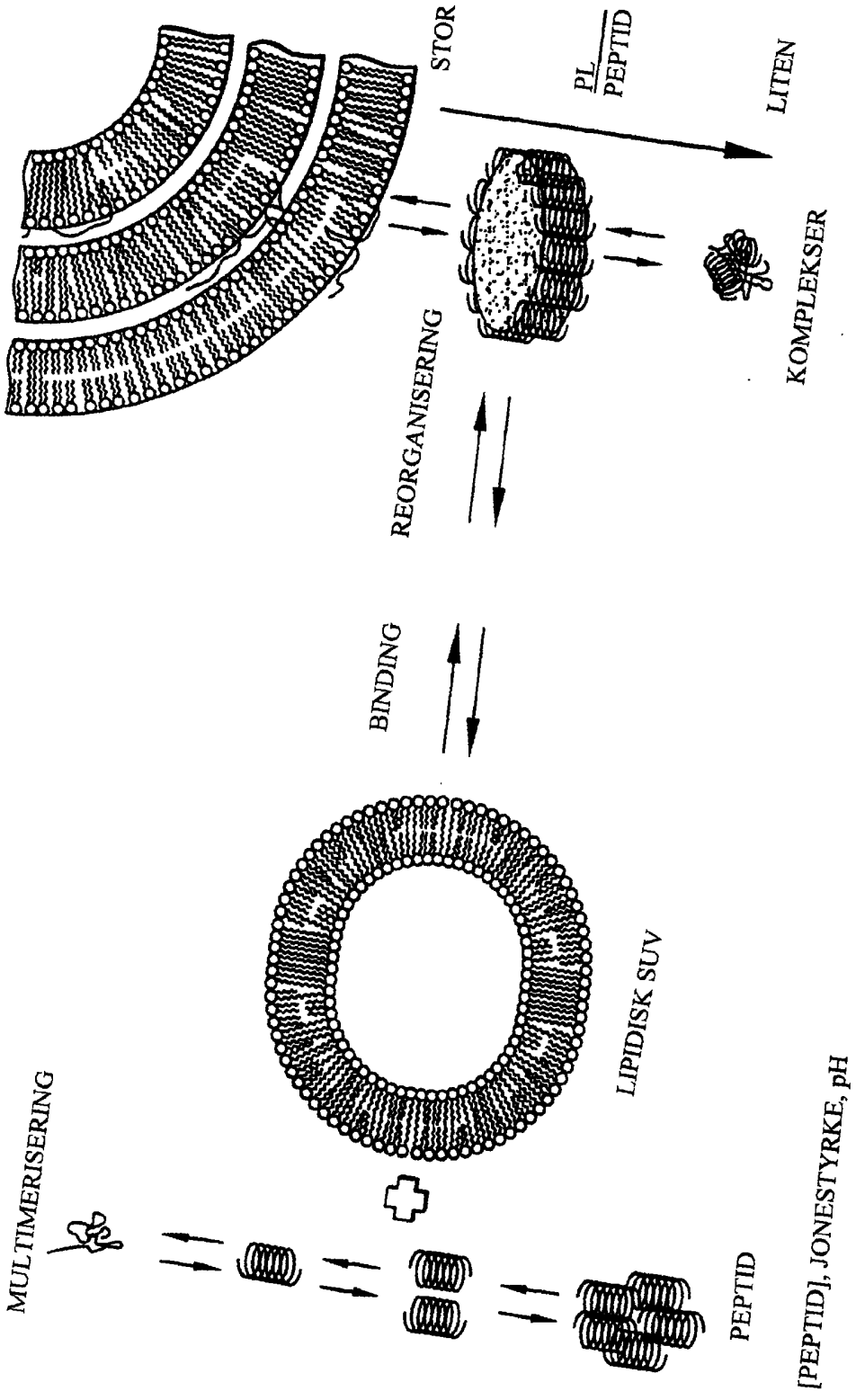

MULTIMERISERING
PEPTID
[PEPTID], JONESTYRKE, pH
LIPIDISK SUV
BINDING
REORGANISERING
STOR
PL/PEPTID
LITEN
KOMPLEKSER

FIG. 10A

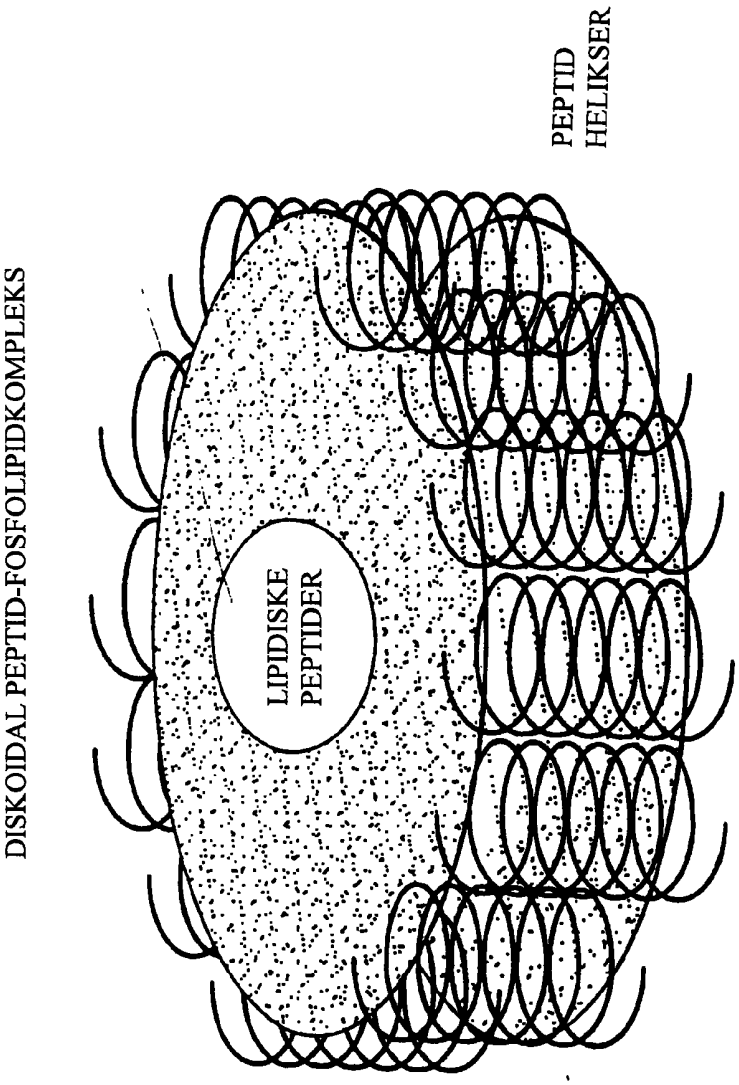

DISKOIDAL PEPTID-FOSFOLIPIDKOMPLEKS
LIPIDISKE PEPTIDER
PEPTID HELIKSER

FIG. 10B