

Область техники, к которой относится изобретение

Данное изобретение относится к области лечения атеросклероза. В частности, данное изобретение имеет отношение к идентификации класса пептидов, которые вводятся перорально и которые уменьшают интенсивность по крайней мере одного симптома атеросклероза.

Уровень техники

Сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной заболеваемости и смертности, в особенности в Соединенных Штатах и странах Западной Европы. В развитии сердечно-сосудистого заболевания участвуют несколько этиологических факторов, включая наследственную предрасположенность к заболеванию, пол, факторы, связанные с образом жизни, такие как курение и питание, возраст, гипертензия и гиперлипидемия, в том числе гиперхолестеринемия. Некоторые из данных факторов, особенно гиперлипидемия и гиперхолестеринемия (высокие концентрации холестерина в крови) представляют собой существенный фактор риска, связанный с атеросклерозом.

Холестерин присутствует в крови в виде свободного (неэтерифицированного) и этерифицированного холестерина в липопротеиновых частицах, обычно называемых хиломикронами, липопротеинах очень низкой плотности (VLDL), липопротеинах низкой плотности (LDL) и липопротеинах высокой плотности (HDL). На концентрацию общего холестерина в крови влияют (1) всасывание холестерина из пищеварительного тракта, (2) синтез холестерина из компонентов пищи таких как углеводы, белки, жиры и этанол, и (3) удаление холестерина из крови тканями, особенно печенью, и последующее превращение холестерина в желчные кислоты, стероидные гормоны и желчный холестерин.

На поддержание концентраций холестерина в крови воздействуют генетические факторы и факторы окружающей среды. Генетические факторы включают в себя концентрацию ферментов, ограничивающих скорость в биосинтезе холестерина, концентрацию рецепторов для липопротеинов низкой плотности в печени, концентрацию ферментов, ограничивающих скорость для конверсии холестерина желчных кислот, скорости синтеза и секреции липопротеинов и пол субъекта. Факторы окружающей среды, влияющие на гемостаз концентрации холестерина в крови у человека, включают в себя состав пищи, эффект курения, физическую активность и применение ряда фармацевтических агентов. Изменения в питании включают в себя количество и тип жира (насыщенные или ненасыщенные жирные кислоты), количество холестерина, количество и тип волокна и, возможно, количества витаминов, таких как витамины С и D, и минералов, таких как кальций.

Эпидемиологические исследования показывают обратную корреляцию уровней липопротеина высокой плотности (HDL) и аполипопротеина (apo) A-I и наличия атеросклеротических событий (см. статью Wilson и соавт., *Arteriosclerosis*, 8:737-741, (1988)). Показано, что инъекция HDL кроликам, получавшим атерогенный корм, ингибирует образование атеросклеротических повреждений (см. статью Vamvakopoulos и соавт., *J. Clin. Invest.*, 85:1234-1241, (1990)).

Человеческий apo A-I являлся объектом интенсивных исследований, что обусловлено его антиатерогенными свойствами. Заменяемые аполипопротеины, включая apo A-I, имеют липид-ассоциированные домены (см. статьи Brouillette и Anantharamaiah, *Biochim. Biophys. Acta*, 1256:103-129, (1995); Segrest и соавт., *FEBS Lett.*, 38:247-253, (1974)). Принято считать, что apo A-I, имеет восемь tandemно повторяющихся 22-мерных последовательностей, большинство из которых потенциально способны к образованию амфипатических спиральных структур класса А (см. статью Segrest и соавт., *FEBS Lett.*, 38:247-253, (1974)). Характеристики амфипатической спирали класса А включают в себя присутствие положительно заряженных остатков на разделе полярной и неполярной поверхностей и отрицательно заряженных остатков в центре полярной поверхности (см. статьи Segrest и соавт., *FEBS Lett.*, 38:247-253, (1974); Segrest и соавт., *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 8:103-117, (1990)). Показано, что apo A-I сильно связывается с фосфолипидами с образованием комплексов и способствует оттоку холестерина из богатых холестерином клеток. Ранее считали, что доставка и поддержание сывороточных уровней apo A-I недостаточна для эффективного уменьшения по крайней мере одного симптома атеросклероза.

Сущность изобретения

В данном изобретении представлены новые пептиды, введение которых уменьшает интенсивность по крайней мере одного симптома атеросклероза. В частности, открытием, сделанным в данном изобретении, является то, что пептиды, содержащие амфипатическую спираль класса А, при наличии остатка(ов) D-аминокислот и/или защиты на амино- или карбоксильном конце могут быть введены в организм перорально, легко всасываются и доставляются в сыворотку и являются эффективными в плане уменьшения интенсивности по крайней мере одного симптома атеросклероза.

Таким образом, в одном варианте осуществления данное изобретение представляет пептид, который уменьшает интенсивность симптома атеросклероза, где пептид имеет длину, которая лежит в интервале от приблизительно 10 до приблизительно 30 аминокислот, содержит по меньшей мере одну амфипатическую спираль класса А, содержит по меньшей мере один остаток D-аминокислоты, защищает фосфолипид от окисления окисляющим агентом и отличен от пептида D-18A (например, D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F (SEQ ID NO: 1), имеющим все остатки аминокислот D-формы). В особенно предпочтительных вариантах изобретения пептид дополнительно содержит защитную группу, присоединенную к аминоконцу и/или карбоксильному концу. Предпочтительные защитные группы включают в себя,

без ограничения перечисленным, ацетил, амид и алкильные группы, содержащие от 3 до 20 атомов углерода, Fmoc, 9-флуоренацетильную группу, 1-флуоренкарбоксильную группу, 9-флуоренкарбоксильную группу, 9-флуоренон-1-карбоксильную группу, бензилоксикарбонил, ксантил (Xan), тритил (Trt), 4-метилтритил (Mtt), 4-метокситритил (Mmt), 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонил (Mtr), мезитилен-2-сульфонил (Mts), 4,4-диметоксибензгидрил (Mbh), тозил (Tos), 2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-сульфонил (Pmc), 4-метилбензил (MeBzl), 4-метоксибензил (MeOBzl), бензилоксигруппу (BzlO), бензил (Bzl), бензоил (Bz), 3-нитро-2-пиридинсульфенил (Npys), 1-(4,4-диметил-2,6-диаксоциклогексиден) этил (Dde), 2,6-дихлорбензил (2,6-di-Cl-Bzl), 2-хлорбензилоксикарбонил (2-Cl-Z), 2-бромбензилоксикарбонил (2-Br-Z), бензилоксиметил (Bom), t-бутоксикарбонил (Boc), циклогексилоксигруппу (сHxO), t-бутоксиметил (Bum), t-бутоксигруппу (tBuO), t-бутил (tBu), ацетил (Ac) и трифторацетил (TFA). В ряде особенно предпочтительных вариантов осуществления пептид дополнительно содержит первую защитную группу, присоединенную к аминоконцу, и вторую защитную группу, присоединенную к карбоксильному концу. Особенно предпочтительные пептиды близко напоминают амфипатическую спираль класса А человеческого или мышинного аро А-I. В ряде вариантов осуществления предпочтительные пептиды содержат последовательность аминокислот, идентичную более чем на 50% полипептиду, кодируемому экзон, который кодирует амфипатическую спираль класса А человеческого или мышинного аро А-I. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления по меньшей мере приблизительно 10%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 20%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 30%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 50%, даже более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 75% и наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90% и даже 100% энантиомерных аминокислот представлено D-аминокислотами. Пептид может быть объединен с фармакологически приемлемым наполнителем (например, наполнителем, подходящим для перорального введения млекопитающему). В ряде особенно предпочтительных вариантов осуществления пептид содержит одну или более из следующих последовательностей аминокислот:

D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO:2),
 D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO:3),
 D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F- (SEQ ID NO:4),
 D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F- (SEQ ID NO:5),
 D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO:6),
 D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO:7),
 D-W-F-K-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO:8),
 D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F- (SEQ ID NO:9),
 D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F- (SEQ ID NO:10),
 D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F- (SEQ ID NO:11),
 D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO:12),
 D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO:13),
 E-W-L-K-L-F-Y-E-K-V-L-E-K-F-K-E-A-F- (SEQ ID NO:14),
 E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F- (SEQ ID NO:15),
 E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F- (SEQ ID NO:16),
 E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F- (SEQ ID NO:17),
 E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F- (SEQ ID NO:18),

E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO: 19),
 E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO:20),
 A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO:21), A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-
 (SEQ ID NO:22), A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F- (SEQ ID NO:23),
 A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO:24), A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-
 (SEQ ID NO:25), A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F- (SEQ ID NO:26),
 A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F- (SEQ ID NO:27), A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F-
 (SEQ ID NO :28), A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F- (SEQ ID NO:29),
 A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO:30), K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-
 (SEQ ID NO:31), L-F-Y-E-K-V-L-E-K-F-K-E-A-F- (SEQ ID NO:32),
 A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F- (SEQ ID NO:33), A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-
 (SEQ ID NO:34), A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F- (SEQ ID NO:35),
 A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F- (SEQ ID NO:36), A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F-
 (SEQ ID NO:37), A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO:38),
 D-W-L-K-A-L-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-L- (SEQ ID NO:39),
 D-W-F-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F- (SEQ ID NO:40),
 D-W-F-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO:41),
 E-W-L-K-A-L-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-L- (SEQ ID NO:42),
 E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO:43),
 E-W-F-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F- (SEQ ID NO:44),
 E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO:45),
 E-W-L-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO:46),
 E-W-F-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO:47),
 D-F-L-K-A-W-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-W- (SEQ ID NO:48),

E-F-L-K-A-W-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-W- (SEQ ID NO:49),
 D-F-W-K-A-W-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-W-W- (SEQ ID NO:50),
 E-F-W-K-A-W-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-W-W- (SEQ ID NO:51),
 D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F- (SEQ ID NO:52),
 D-K-W-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L- (SEQ ID NO:53),
 E-K-L-K-A-F-Y-E-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F- (SEQ ID NO:54),
 E-K-W-K-A-V-Y-E-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L- (SEQ ID NO:55),
 D-W-L-K-A-F-V-D-K-F-A-E-K-F-K-E-A-Y- (SEQ ID NO:56),
 E-K-W-K-A-V-Y-E-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L- (SEQ ID NO:57),
 D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F- (SEQ ID NO:58),
 E-W-L-K-A-F-V-Y-E-K-V-F-K-L-K-E-F-F- (SEQ ID NO:59),
 D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO:60),
 E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO:61),
 D-W-L-K-A-F-Y-D-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO:62),
 E-W-L-K-A-F-Y-E-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO:63),
 D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO:64),
 E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO:65),
 D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F- (SEQ ID NO:66),
 E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F- (SEQ ID NO:67),
 D-W-L-K-A-F-Y-D-R-V-A-E-R-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO:68),
 E-W-L-K-A-F-Y-E-R-V-A-E-R-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO:69),
 D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F- (SEQ ID NO:70),
 E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F- (SEQ ID NO:71),
 D-W-L-R-A-F-Y-D-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO:72),

E-W-L-R-A-F-Y-E-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO:73),
 D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-R-E-A-F- (SEQ ID NO:74),
 E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-R-E-A-F- (SEQ ID NO:75),
 D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO:76),
 E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO:77),
 D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-P-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F
 (SEQ ID NO:78),
 D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-P-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F
 (SEQ ID NO:79),
 D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-P-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F
 (SEQ ID NO:80),
 D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F-P-D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-L-K-E-A-F
 (SEQ ID NO:81),
 D-K-W-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L-P-D-K-W-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L
 (SEQ ID NO:82),

 D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-P-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F
 (SEQ ID NO:83),
 D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F-P-D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F
 (SEQ ID NO:84),
 D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-A-E-K-F-K-E-F-F-P-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-A-E-K-F-K-E-F-F
 (SEQ ID NO:85),

укороченные варианты вышеуказанных последовательностей, мультимерные комбинации (например, предпочтительно находящиеся в интервале от димеров до тримеров, тетрамеров, 5-меров, 8-меров или 10-меров) вышеуказанных последовательностей, консервативные замены вышеуказанных последовательностей и/или вышеуказанные последовательности, содержащие аналоги аминокислот. Энантиомерные аминокислоты данных последовательностей предпочтительно содержат по меньшей мере одну D-аминокислоту. В ряде предпочтительных вариантов осуществления по меньшей мере 50%, более предпочтительно по меньшей мере 75% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 90% и даже 100% энантиомерных аминокислот представлено D-аминокислотами, как описано в данном контексте. Данные пептиды могут также включать защитную группу (например, амид, ацетил, пропеонил и алкил, содержащий от 3 до 20 атомов углерода, и т.п.), присоединенную к аминоконцу или карбоксильному концу. В ряде вариантов осуществления защитная группа, присоединенная к карбоксильному концу, представлена амидом. В ряде вариантов осуществления защитная группа, присоединенная к аминоконцу, представлена ацетилом, пропеонилом или алкилом, содержащим от 3 до 20 атомов углерода. Некоторые пептиды содержат как карбокси-, так и аминоконцевую защитную группу. В одном из таких вариантов осуществления аминоконцевая защитная группа представляет собой защитную группу, выбранную из группы, состоящей из ацетила, пропеонила и алкила, содержащего от 3 до 20 атомов углерода, и карбокси концевая защитная группа представлена амидом.

В ряде вариантов осуществления пептид представляет собой пептид, который защищает фосфолипид от окисления окисляющим агентом, выбранным из группы, состоящей из окисляющих агентов, таких как пероксид водорода, 13(S)-HPODE, 15(S)-HPETE, HPODE, HPETE, NODE и HETE. Фосфолипид может быть представлен фосфолипидом, выбранным из группы, состоящей из 1-пальмитоил-2-арахидоноил-sn-глицеро-3-фосфорилхолина (PAPC), 1-стеароил-2-арахидоноил-sn-глицеро-3-фосфорилхолина (SAPC), 1-стеароил-2-арахидонил-sn-глицеро-3-фосфорилэтаноламина (SAPE). Таким образом пептид препятствует образованию липидов, таких как окисленный 1-пальмитоил-2-арахидоноил-sn-глицеро-3-фосфорилхолин (Ох-PAPC), 1-пальмитоил-2-оксовалероил-sn-глицеро-3-фосфорилхолин (POVPC), 1-пальмитоил-2-глутароил-sn-глицеро-3-фосфорилхолин (GPC), 1-пальмитоил-2-эпоксизопропан-sn-глицеро-3-фосфорилхолин (PEIPC), окисленный 1-стеароил-2-арахидоноил-sn-глицеро-3-

фосфорилхолин (Ox-SAPC), 1-стеароил-2-оксовалероил-sn-глицеро-3-фосфорилхолин (SOVPC), 1-стеароил-2-глутароил-sn-глицеро-3-фосфорилхолин (SGPC), 1-стеароил-2-эпоксиизопропан-sn-глицеро-3-фосфорилхолин (SEIPC), окисленный 1-стеароил-2-арахидонил-sn-глицеро-3-фосфорилэтанолламин (Ox-SAPE), 1-стеароил-2-оксовалероил-sn-глицеро-3-фосфорилэтанолламин (SOVPE), 1-стеароил-2-глутароил-sn-глицеро-3-фосфорилэтанолламин (SGPE) и 1-стеароил-2-эпоксиизопропан-sn-глицеро-3-фосфорилэтанолламин (SEIPE). В другом варианте осуществления данное изобретение представляет композицию, пригодную для перорального введения, которая облегчает симптом атеросклероза. Композиция содержит пептид, представляющий собой человеческий пептид аро А-I или его фрагмент, содержащий амфипатическую спираль класса А, или аналог человеческого пептида аро А-I, где указанный пептид имеет первую защитную группу, присоединенную к аминоконцу, и вторую защитную группу, присоединенную к карбоксильному концу, и, кроме того, где указанный пептид содержит множество остатков D-аминокислот. Защитные группы включают в себя, без ограничения перечисленным, защитные группы, описанные в данном контексте. В ряде вариантов осуществления больше половины, более предпочтительно больше, чем 80% и наиболее предпочтительно больше, чем 90% или даже все энантиомерные аминокислоты, входящие в состав пептида, представляют собой D-аминокислоты. Кроме того, композиция может содержать фармацевтически приемлемый наполнитель (например, наполнитель, пригодный для перорального введения, или наполнитель, пригодный для инъекций). Предпочтительные пептиды способны защищать фосфолипид [1-пальмитоил-2-арахидоноил-sn-глицеро-3-фосфорилхолина (PAPC), 1-стеароил-2-арахидоноил-sn-глицеро-3-фосфорилхолина (SAPC), 1-стеароил-2-арахидонил-sn-глицеро-3-фосфорилэтанолламина (SAPE)] от окисления окисляющим агентом (например, пероксидом водорода, 13(S)-HPODE, 15(S)-HPETE, HPODE, HPETE, HODE и HETE). Таким образом, пептид препятствует образованию окисленного 1-пальмитоил-2-арахидоноил-sn-глицеро-3-фосфорилхолина (Ox-PAPC), 1-пальмитоил-2-оксовалероил-sn-глицеро-3-фосфорилхолина (POVPC), 1-пальмитоил-2-глутароил-sn-глицеро-3-фосфорилхолина (PGPC), 1-пальмитоил-2-эпоксиизопропан-sn-глицеро-3-фосфорилхолина (PEIPC), окисленного 1-стеароил-2-арахидоноил-sn-глицеро-3-фосфорилхолина (Ox-SAPC), 1-стеароил-2-оксовалероил-sn-глицеро-3-фосфорилхолина (SOVPC), 1-стеароил-2-глутароил-sn-глицеро-3-фосфорилхолина (SGPC), 1-стеароил-2-эпоксиизопропан-sn-глицеро-3-фосфорилхолина (SEIPC), окисленного 1-стеароил-2-арахидонил-sn-глицеро-3-фосфорилэтанолламина (Ox-SAPE), 1-стеароил-2-арахидонил-sn-глицеро-3-фосфорилэтанолламина (SOVPE), 1-стеароил-2-глутароил-sn-глицеро-3-фосфорилэтанолламина (SGPE), 1-стеароил-2-эпоксиизопропан-sn-глицеро-3-фосфорилэтанолламина (SEIPE). Данное изобретение представляет также способы облегчения симптома атеросклероза. Способы предусматривают введение в организм (например, человека или млекопитающего животного) по крайней мере одного пептида, описанного в данном контексте. В особенно предпочтительных вариантах осуществления данные пептиды содержат множество D-аминокислот и/или защищены, как описано в данном контексте. Пептид предпочтительно вводят в организм перорально, и организм предпочтительно представлен организмом с диагнозом или риском развития по крайней мере одного симптома атеросклероза. В ряде вариантов осуществления пептид может быть представлен в виде выделенного пептида или комбинации с фармакологическим наполнителем, как описано в данном контексте. Введение предпочтительно проводят в дозе, достаточной для облегчения по крайней мере одного симптома атеросклероза и/или существенного снижения вероятности появления по крайней мере одного симптома атеросклероза.

В еще одном варианте осуществления в данном изобретении представлен набор для облегчения симптома атеросклероза. Предпочтительные наборы включают в себя контейнер, содержащий по крайней мере один пептид, описанный в данном контексте. Пептиды предпочтительно содержат множество D-аминокислот и/или защищены, как описано в данном контексте. В ряде вариантов изобретения набор, кроме того, необязательно может включать в себя фармацевтически приемлемый наполнитель и/или пептид представлен в комбинации с фармацевтически приемлемым наполнителем (например, в унифицированном лекарственном препарате). В предпочтительных наборах пептид(ы) представлен в виде унифицированного лекарственного препарата для перорального применения. Наборы также (необязательно) включают в себя инструкционные материалы, разъясняющие, как применять указанный пептид для облегчения по крайней мере одного симптома атеросклероза и/или снижения вероятности появления по крайней мере одного симптома атеросклероза.

В ряде вариантов осуществления в данном изобретении исключены любые один или более пептидов, описанные в патенте США 4643988 и/или статье Garber и соавт., Arteriosclerosis and Thrombosis, 12:886-894, (1992). В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении исключены любые один или более пептидов, описанные в патенте США 4643988 и/или статье Garber и соавт., (1992), которые были синтезированы при использовании всех энантиомерных аминокислот в форме L-аминокислот или синтезированы при использовании D-аминокислот, когда пептиды являются блокирующими группами. В ряде вариантов осуществления в данном изобретении исключены пептиды, имеющие формулу $A_1-B_1-B_2-C_1-D-B_3-B_4-A_2-C_2-B_5-B_6-A_3-C_3-B_7-C_4-A_4-B_8-B_9$ (SEQ ID NO: 87), где A_1 , A_2 , A_3 и A_4 независимо представлены аспарагиновой кислотой или глутаминовой кислотой или их гомологами или аналогами; B_1 , B_2 , B_3 , B_4 , B_5 , B_6 , B_7 , B_8 и B_9 независимо представлены триптофаном, фенилаланином, аланином, лейцином, тирозином, изолейцином, валином или α -нафтилаланином или их гомологами или аналогами; C_1 ,

C₂, C₃ и C₄ независимо представлены лизином или аргинином и D представлено серином, треонином, аланином, глицином, гистидином или их гомологами или аналогами, при условии, что, если A₁ и A₂ представлены аспарагиновой кислотой, то A₃ и A₄ представлены глутаминовой кислотой, B₂ и B₉ представлены лейцином, B₃ и B₇ - фенилаланином, B₄ - тирозином, B₅ - валином, B₆, B₈ и D - аланином, а C₁, C₂, C₃ и C₄ - лизином, и B₁ отличен от триптофана.

Определения

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" в данном контексте используют взаимозаменяемо для обозначения полимера из остатков аминокислот. Термины применимы к полимерам аминокислот, в которых по крайней мере один остаток аминокислоты представлен искусственным химическим аналогом соответствующей природной аминокислоты, а также к полимерам природных аминокислот.

Термин "амфипатическая спираль класса А" относится к белковой структуре, которая формирует α -спираль с образованием сегрегации полярных и неполярных поверхностей с положительно заряженными остатками, которые находятся на разделе полярной и неполярной поверхностей и отрицательно заряженными остатками, находящимися в центре полярной поверхности (см., например, статью Segrest и соавт., *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 8:103-117, (1990)).

Термин "улучшение" при использовании в контексте "облегчение по крайней мере одного симптома атеросклероза" касается уменьшения, предупреждения или устранения по крайней мере одного симптома, характерного для атеросклероза и/или связанных с ним патологий. Данное уменьшение включает, без ограничения перечисленным, уменьшение или элиминацию окисленных фосфолипидов, уменьшение образования и разрушение атеросклеротических бляшек, уменьшение частоты клинических событий, таких как сердечный приступ, стенокардия или инсульт, снижение гипертензии, уменьшение биосинтеза воспалительного белка, снижение уровня холестерина в плазме и т.п.

Термин "энантиомерные аминокислоты" относится к аминокислотам, которые могут существовать по меньшей мере в двух формах, которые не являются накладывающимися одно на другое зеркальными изображениями друг друга. Большинство аминокислот (за исключением глицина) являются энантиомерными и существуют в так называемой L-форме (L-аминокислота) или D-форме (D-аминокислота). Большинство природных аминокислот являются L-аминокислотами. Термины "D-аминокислота" и "L-аминокислота" используют в отношении абсолютной конфигурации аминокислоты, а не определенного направления вращения плоско-поляризованного света. Применение в данном контексте соответствует стандартному применению термина компетентными специалистами в данной области.

Термин "защитная группа" относится к химической группе, которая, будучи присоединенной к функциональной группе в аминокислоте (например, к боковой цепи, α -аминогруппе, α -карбоксильной группе и т.п.), блокирует или маскирует свойства данной функциональной группы. Предпочтительные аминоконцевые защитные группы включают в себя, без ограничения перечисленным, ацетил или аминоконцевые группы. Другие аминоконцевые защитные группы включают в себя, без ограничения перечисленным, алкильные цепи, как в жирных кислотах, пропептонил, формил и другие. Предпочтительные карбоксиконцевые защитные группы включают в себя, без ограничения перечисленным, группы, которые образуют амиды или сложные эфиры.

Выражение "защищает фосфолипид от окисления окисляющим агентом" относится к способности соединения снижать скорость окисления фосфолипида (или количество образованного окисленного фосфолипида) при контактировании данного фосфолипида с окисляющим агентом (например, пероксидом водорода, 13-(S)-HPODE, 15-(S)-HPETE, HPODE, HPETE, NODE, HETE и т.п.).

Термины "липопротеин низкой плотности" или "LDL" определены в соответствии с общепринятым применением компетентными специалистами в данной области. Как правило, термин LDL относится к липидно-белковому комплексу, который при выделении ультрацентрифугированием находится в диапазоне удельных масс от $d = 1,019$ до $d = 1,063$.

Термины "липопротеин высокой плотности" или "HDL" определены в соответствии с общепринятым их применением компетентными специалистами в данной области. Как правило, термин HDL относится к липидно-белковому комплексу, который при выделении ультрацентрифугированием находится в диапазоне удельных масс от $d = 1,063$ до $d = 1,21$.

Термин "HDL группы I" относится к липопротеину высокой плотности или его компонентам (например, аро A-I, параоксоназе, ацетилгидролазе тромбоцит-активирующего фактора и т.п.), которые восстанавливают окисленные липиды (например, в липопротеинах низкой плотности) или защищают окисленные липиды от окисления окисляющими агентами.

Термин "HDL группы II" относится к HDL, которые обладают пониженной активностью или не имеют активности в плане защиты липидов от окисления или репарации (например, восстановления) окисленных липидов.

Термин "компонент HDL" относится к компоненту (например, молекулам), который входит в состав липопротеина высокой плотности (HDL). Анализы на HDL, который защищает липиды от окисления или репарации их (например, восстанавливает окисленные липиды), включают в себя также анализы компо-

нентов HDL (например, аро А-I, параоксоназы, ацетилгидролазы тромбоцит-активирующего фактора и т.п.), которые проявляют данную активность.

Термин "человеческий пептид аро А-I пептид" относится к человеческому пептиду аро А-I полной длины, или его фрагменту, или домену, которые содержат амфипатическую спираль класса А.

Термин "реакция моноцитов" (моноцитарная реакция), как используют в данном контексте, относится к активности моноцитов, характеризующей "воспалительную реакцию", связанную с образованием атеросклеротических бляшек. Реакция моноцитов характеризуется адгезией моноцитов к клеткам стенки сосуда (например, к клеткам сосудистого эндотелия) и/или хемотаксисом в субэндотелиальное пространство и/или дифференцировкой моноцитов в макрофаги.

Термин "отсутствие изменений" касательно количества окисленного фосфолипидов относится к отсутствию определяемого изменения, более предпочтительно к отсутствию статистически значимого изменения (например, при доверительном уровне по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 98% или 99%). Отсутствие определяемого изменения может также относиться к анализу, в котором уровень окисленного фосфолипидов изменяется, но не на такую величину, как в отсутствие белка(ов), описанного в данном контексте, или со ссылкой на другие положительные или отрицательные контроли.

В данном контексте используют следующие сокращения: РАРС: L- α -1-пальмитоил-2-арахидоноил-sn-глицеро-3-фосфорилхолин, POVPC: 1-пальмитоил-2-(5-оксовалерил)-sn-глицеро-3-фосфорилхолин, PGPC: 1-пальмитоил-2-глутарил-sn-глицеро-3-фосфорилхолин, PEIPC: 1-пальмитоил-2-(5,6-эпоксиизопростан E₂)-sn-глицеро-3-фосфорилхолин, ChC18:2: холестерил линолеат, ChC18:2-ООН: холестерил линолеат гидропероксид, DMPC: 1,2-диглицеридолеат-3-фосфохолин, PON: параоксоназа, HPF: стандартизованное поле зрения при большом увеличении микроскопа, BL/6: C57BL/6J; C3H: C3H/HeJ.

Термин "консервативная замена" используют в отношении белков или пептидов с целью отражения замен аминокислот, которые практически не изменяют активность (например, специфичность в отношении липопротеинов) или аффинность связывания (например, в отношении липидов или липопротеинов) молекулы. Как правило, консервативные замены аминокислот включают замену одной аминокислоты другой аминокислотой с близкими химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Каждая из следующих шести групп содержит аминокислоты, представляющие собой типичные консервативные замены друг для друга: 1) аланин (А), серин (S), треонин (Т); 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E); 3) аспарагин (N), глутамин (Q); 4) аргинин (R), лизин (K); 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V) и 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W).

Термины "идентичный" или процент "идентичности" в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов относится к двум или более последовательностям или субпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент остатков аминокислот или нуклеотидов, которые являются одинаковыми при сравнении и сопоставлении (выравнивании) для выявления максимального соответствия, которое измеряют с использованием следующих алгоритмов для сравнения последовательностей или посредством визуального изучения. Что касается пептидов, соответствующих данному изобретению, то идентичность определяют для пептида полной длины.

При сравнении последовательностей, как правило, одна последовательность служит эталонной последовательностью, с которой сравнивают тест-последовательность. При использовании алгоритма для сравнения последовательностей данные о тест-последовательности и эталонной последовательности вводят в компьютер, при необходимости определяют координаты субпоследовательности и определяют параметры программы алгоритма. Затем с помощью алгоритма сравнения последовательностей вычисляют процент идентичности последовательности для тест-последовательности(ей) относительно эталонной последовательности на основе заданных параметров программы.

Оптимальный элайнмент (способ анализа первичной структуры последовательностей, основанный на сопоставлении, выравнивании последовательностей друг относительно друга) последовательностей с целью сравнения может быть проведен, например, с помощью алгоритма локальной гомологии, описанного в статье Smith и Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482, (1981)), алгоритма сопоставления гомологии, описанного в статье Needleman и Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443 (1970), способом поиска аналогий, описанным в статье Pearson и Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444, (1988), путем компьютеризированного применения данных алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Пакете Программного оборудования Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) или путем визуального изучения (см. в основном работу Ausubel и соавт., *supra*).

Одним из примеров эффективного алгоритма является PILEUP. PILEUP проводит элайнмент (сопоставление) множества последовательностей из группы близких последовательностей, используя постепенные попарные сопоставления, чтобы показать близость и процент идентичности последовательностей. Он также рисует дерево или дендрограмму, демонстрирующие образование групп родства, которые используют для сопоставления. В PILEUP используют упрощение способа постепенного сопоставления, описанного в статье Feng и Doolittle, *J. Mol. Evol.*, 35:351-360, (1987). Используемый способ близок способу, описанному в статье Higgins и Sharp, *CABIOS*, 5:151-153, (1989). Программа может сопоставить до

300 последовательностей с максимальной длиной 5000 нуклеотидов или аминокислот каждая. Процедура элайнмента (сопоставления) множества последовательностей начинается с попарного сопоставления (выравнивания) двух самых близких между собой последовательностей с получением кластера двух сопоставленных последовательностей. Затем данный кластер сопоставляют со следующей наиболее близкой последовательностью или кластером сопоставленных последовательностей. Два кластера последовательностей сопоставляют путем простого продолжения попарного сопоставления (выравнивания друг относительно друга) двух отдельных последовательностей. Заключительное сопоставление достигается в серии постепенных попарных сопоставлений. Программа работает путем определения специфических последовательностей и координат их аминокислот или нуклеотидов на участках сравнения последовательностей и посредством определения параметров программы. Например, эталонную последовательность можно сравнить с другими тест-последовательностями, с целью установления близости по проценту идентичности последовательностей с использованием следующих параметров: вес пропущенных гэпов (3,00), вес длины пропущенных гэпов (0,10) и взвешенные концевые гэпы.

Другим примером алгоритма, который пригоден для определения процента идентичности последовательностей и близости последовательностей, является алгоритм BLAST, который описан в статье Altschul и соавт., J. Mol. Biol., 215:403-410, (1990). Программное обеспечение для проведения анализов BLAST имеется в открытом доступе в Национальном Центре Информации по Биотехнологии (the National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Данный алгоритм включает в себя первую идентификацию часто встречающихся пар последовательностей (HSP) по идентификации коротких "слов" длины W в запрашиваемой последовательности, которая либо соответствует, либо удовлетворяет некоторому положительно оцениваемому пороговому значению T при сопоставлении со словом такой же длины в последовательности из базы данных. T считают пороговым значением соседнего слова (Altschul и соавт., supra). Данные исходные удачные находки соседних слов действуют как заставка для инициации поиска, с целью обнаружения содержащих их более длинных HSP. Удачные слова затем удлиняют в обоих направлениях каждой последовательности настолько далеко, насколько может быть продолжено кумулятивное сопоставление. Кумулятивные значения вычисляют, используя для нуклеотидных последовательностей параметры M (положительная величина для пары правильно спаренных остатков, всегда >0) и N (отрицательная величина для ошибочно спаренных остатков, всегда <0). Для последовательностей аминокислот используют ту же матрицу для вычисления кумулятивного значения. Удлинение удачных слов в каждом направлении тормозится, когда кумулятивное значение сопоставления уменьшается до количества X от его максимально достигнутой величины; кумулятивное значение доходит до нуля или ниже вследствие накопления одного или более сопоставлений остатков с отрицательным значением или при достижении конца какой-либо последовательности. Параметры алгоритма BLAST W, T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) в качестве пропусков используют длину слова (W) = 11, ожидание (E) = 10, M = 5, N = -4 и сравнение обеих нитей. Для последовательностей аминокислот в программе BLASTP в качестве пропусков используют длину слова (W) = 3, ожидание (E) = 10 и основу для подсчета BLOSUM62 (см. статью Henikoff и Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915, (1989)).

Кроме вычисления процента идентичности последовательности, алгоритм BLAST проводит также статистический анализ близости двух последовательностей (см., например, статью Karlin и Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5787, (1993)). Одно измерение близости с помощью алгоритма BLAST представляет собой наименьшую суммарную вероятность (P(N)), которая указывает на вероятность, с которой случайно могло бы встретиться соответствие между двумя последовательностями нуклеотидов или аминокислот. Например, нуклеиновую кислоту считают близкой эталонной последовательности, если минимальная суммарная вероятность при сравнении тест-нуклеиновой кислоты и эталонной нуклеиновой кислоты не превышает приблизительно 0,1, более предпочтительно не превышает приблизительно 0,01 и наиболее предпочтительно не превышает приблизительно 0,001.

Термин "пептид D-18A" относится к пептиду, имеющему последовательность: D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F (SEQ ID NO:1), в котором все энантиомерные аминокислоты являются аминокислотами в D-форме.

Перечень чертежей и иных материалов

На фиг. 1, панели A, B, C и D, представлено связывание ^{14}C -D-5F с компонентами крови у мышей, нуллисомных по ApoE. Пептидный миметик Apo A-I - D-5F, меченный ^{14}C -аминокислотами, вводили перорально через зонд Apo E-дефицитным мышам (n=5) или инкубировали с их плазмой *in vitro*. Отбор крови проводили натошак через 6 ч после введения и определяли связывание ^{14}C с кровью, плазмой и липопротеинами.

Фиг. 2A и 2B иллюстрируют, что перорально введенный пептид D обладает активностью. Пептидные миметики Apo A-I - D-5F и L-5F (в дозе 100 мкг/животное) вводили перорально через зонд мышам, нуллисомным по рецептору LDL (n=5). Отбор крови проводили через 6 ч, LDL и HDL выделяли гелефильтрацией (FPLC - жидкостная экспресс-хроматография белков) и исследовали в модельной системе артериальной стенки в отношении защитной способности HDL (фиг. 2A) и устойчивости LDL (фиг. 2B) к окислению путем определения генерации хемотактической активности моноцитов. Как видно, D-5F, но

не L-5F значительно повышал защитные свойства HDL, а LDL после воздействия D-5F становился высокоустойчивым к окислению.

На фиг. 3А и 3В представлены концентрации в плазме пептида D относительно L после введения через зонд. Пептидные миметики AroA-I-D-4F (фиг. 3В) и L-4F (фиг. 3В) были помечены ^{125}I и введены перорально через зонд мышам, нуллисомным по рецептору LDL ($n=4$). Отбор крови проводили через 3 ч, плазму фракционировали с помощью FPLC и определяли радиоактивность в элюированных фракциях. Менее 15% пептида L элюировалось в виде интактного 18-мера, тогда как больше 70% D-4F было интактным. Данные исследования демонстрируют, что пептид D является значительно более устойчивым к деградации *in vivo* по сравнению с пептидом L.

Фиг. 4 иллюстрирует отсутствие антитела против D-4F у леченых мышей. Никакое антитело (белая преципитационная линия) против D-4F не было обнаружено в плазме мышей, нуллисомных по рецептору LDL, через 6 недель после лечения пептидом в дозе 5 мг/сутки (нижняя панель). Положительный контроль (верхняя панель) демонстрирует наличие преципитационной линии для аро A-I в мышинной плазме. Верхняя панель: Центр: антитело кролика против Aro A-I и периферия: плазма мышей, содержащих D-4F. Нижняя панель: Центр: Плазма мышей LDL R^{-/-}, леченных D-4F, и Периферия: Очищенный пептид D-4F в концентрации 0-80 мкг.

На фиг. 5 представлен случай поражений в виде жировых штрихов в корне аорты мышей, нуллисомных по рецептору LDL, получающих западный корм. Группы мышей, нуллисомных по рецептору LDL, содержали на корме западного типа и вводили перорально носитель (контроль) ($n=9$) или пептид D-4F ($n=6$), два раза в день в течение 6 недель. Впоследствии мышей умерщвляли, фиксировали дугу аорты, готовили срезы и количественно оценивали поражения в виде жировых штрихов. У мышей, получавших D-4F, площадь поражения уменьшалась на 81% ($p<0,01$).

На фиг. 6 панели А, В и С иллюстрируют распределение в плазме пептида 5F или аро A-I после внутрибрюшинной инъекции. Человеческий аро A-I, мышинный аро A-I и пептид 5F метили ^{125}I и инъекцировали внутрибрюшинно мышам C57BL/6, которые получали атерогенный корм в течение по меньшей мере трех недель. Образцы отбирали во время кинетических исследований, описанных в табл. 3. Репрезентативные образцы анализировали способом CLiP и собирали фракции для определения радиоактивности. Объем элюции основывался только на скорости насоса колонки; объемом, обусловленным насосом с ферментативным реагентом, пренебрегали. Данные представляют холестерин (в виде поглощения при длине волны 500 нм в произвольных единицах, сплошная линия) и радиоактивность (в ударах/мин.; пунктир). На панелях представлено: А: человеческий аро A-I (один час после инъекции); В: мышинный аро A-I (один час), С: 5F (1,5 ч).

На фиг. 7 на панелях А и В проиллюстрировано взаимодействие мышинных липопротеинов с человеческими клетками артериальной стенки. LDL и HDL выделяли с помощью FPLC из плазмы мышей, которые получали атерогенный корм и инъекции носителя (PBS - забуференный фосфатом солевой раствор) или пептида 5F в дозе 20 мкг/мышь/сутки. Кокультуры обрабатывают без использования (без добавления) или с использованием человеческого LDL (hLDL) в концентрации 200 мкг/мл белка LDL или мышинного LDL (MoLDL) в концентрации 200 мкг/мл или человеческого LDL в концентрации 200 мкг/мл + человеческого HDL (hHDL) в дозе 350 мкг/мл белка HDL или мышинного HDL (MoHDL) в концентрации 300 мкг/мл.

Кокультуры инкубировали с вышеуказанными добавками в течение 8 ч при 37°C в присутствии 10% сыворотки с пониженным содержанием липопротеина (LPDS). Супернатанты собирали и анализировали на содержание эквивалентов гидропероксидов липидов по Auerbach (панель А). Затем кокультуры промывали и инкубировали в свежей среде для культивирования без сыворотки или LPDS в течение дополнительных 8 ч. Кондиционированную среду собирали и анализировали на хемотактическую активность моноцитов (панель В). Для сравнения в обе панели включен контрольный образец без клеток (контроль без клеток).

На фиг. 8 показаны средние площади поражений на поперечных срезах. Приведенные данные представляют среднюю площадь поражения на поперечном срезе для каждого животного (о и среднее значение \pm SEM (стандартная ошибка) для всех животных в каждой группе •) с границами ошибки. Сокращения: PBS - мыши получали атерогенный корм, и им ежедневно делали инъекцию 200 мкл забуференного фосфатом солевого раствора; 5F - мыши получали атерогенный корм и им ежедневно делали инъекцию 20 мкг 5F в 200 мкл PBS; MoAI - мыши получали атерогенный корм и им ежедневно делали инъекцию 50 мкг мышинного аро A-I в 200 мкл PBS. * = $p<0,002$, как определено с помощью двустороннего критерия Стьюдента. Достоверная разница также была показана с использованием одностороннего анализа дисперсии в классах ($p<0,001$).

На фиг. 9 показано, что как D-, так и L-изомеры пептидных миметиков аро A-I препятствуют хемотактической активности моноцитов, индуцируемой слабо окисленным LDL *in vitro*. Представлены следующие варианты: только среда (LDL при отсутствии клеток или клетки при отсутствии LDL), контроль LDL от нормальных субъектов в концентрации 250 мкг/мл (LDL) и LDL + контроль HDL от нормальных субъектов в концентрации 350 мкг/мл (+HDL). Другие кокультуры инкубировали с контролем LDL вместе с различными количествами (показано в мкг на оси абсцисс) D-2F либо L-2F (третья панель слева, 2F)

или D-37-pA либо L-37pA (последняя панель справа, 37pA). Данные представляют среднее значение \pm SD (стандартное отклонение) значений, полученных на кокультурах в четырех повторностях. Все значения для HDL или добавленных пептидов достоверно отличались от LDL в виде монокомпонента (первая панель слева) на уровне $p < 0,01$.

Фиг. 10A и 10B иллюстрируют, что кормление мышей пептидными миметиками Аро А-I, соответствующими данному изобретению, делает красные клетки устойчивыми к лизису *in vitro*. На фиг. 10A и 10B приведены результаты анализа лизиса красных клеток *in vitro* на 18 ч (фиг. 10A) и 48 ч (фиг. 10B). Звездочки отражают наличие достоверной разницы ($p < 0,001$) между лизисом красных клеток у животных, которые получали носитель, относительно животных, которые получали пептиды.

На фиг. 11 показано, что кормление мышей D-пептидными миметиками Аро А-I, соответствующими данному изобретению, делает циркулирующий в крови LDL устойчивым к окислению. Группам мышей с дефицитом рецептора LDL ($n=3$) через зонд вводили D-пептиды или носитель в виде солевого раствора. Каждое животное получало 100 мкл солевого раствора, 100 мкг/100 мкл пептида D-2F или пептида D-37pA. Забор крови проводили из ретроорбитального синуса под мягкой анестезией через 17 ч. LDL выделяли из плазмы с помощью FPLC. Кокультуры клеток артериальной стенки инкубировали со средой без добавок (БЕЗ ДОБАВОК), контролем LDL от нормальных субъектов (LDL), LDL+ контроль HDL от нормальных субъектов (+HDL). Другие кокультуры инкубировали с мышинным LDL после введения через зонд солевого раствора (SALINE LDL), с пептидом D-2F (D-2F LDL) или D-37pA (D-37pA LDL). Кокультуры инкубировали в течение 4 ч при температуре 37°C в присутствии 10% LPDS. Затем супернатанты отбрасывали, кокультуры промывали и инкубировали со средой для культивирования, не содержащей сыворотку или LPDS, в течение дополнительных 4 ч. Данную кондиционированную среду собирали и анализировали на хемотактическую активность моноцитов. Значения представлены, как среднее \pm SD по кокультурам в четырех повторностях. Звездочки указывают на $p < 0,001$.

Фиг. 12 иллюстрирует результаты анализа хемотаксиса, в котором сравнивают липопротеины, полученные от мышей, которым вводили пептиды в D-форме и/или L-форме через зонд.

Фиг. 13A иллюстрирует результаты анализа хемотаксиса, в котором сравнивают контроли HDL и HDL, полученные от мышей, которым через зонд вводили пептид D. Фиг. 13B иллюстрирует результаты анализа хемотаксиса, в котором сравнивают LDL и VLDL/IDL, полученные от мышей, которым через зонд вводили пептид D.

На фиг. 14A и 14B представлены результаты электрофореза 2F, показывающие его самоассоциацию. На фиг. 14A показаны результаты SDS PAGE (электрофореза в полиакриламидном геле с использованием додецилсульфата натрия) (18%) 2F. На дорожке 1 представлен стандарт молекулярной массы, а на дорожке 2 представлена полоса, соответствующая 2F (молекулярная масса составляет 2242), движущийся несколько медленнее, чем стандарт с самой низкой молекулярной массой (3,5-2,5 кД). На фиг. 14B представлены результаты PAGE в неденатурирующих условиях (4-12%), показывающие подвижности 2F в концентрациях 100 мкг/мл (дорожка 2) и 250 мкг/мл (дорожка 1), указывающие на самоассоциацию в растворе. Дорожка 3 представляет подвижность высокомолекулярного стандарта.

На фиг. 15 показано, что гомологичные серии пептидов стабилизируют шестифазовый переход двухслойного DiPoPE. Сдвиг в T_d DiPoPE показан как функция мольной фракции добавленного пептида. Измерено с помощью DSC (дифференциальный сканирующий калориметр) при тепловой скорости сканирования 37°/ч. Обозначения: ● - 2F; ○ - 3F³; ■ - 4F; □ - 5F; ▼ - 6F; ▲ - 7F; △ - аро А-I.

На фиг. 16 представлено мониторирование с помощью относительного прямоугольного рассеяния света растворения MLV EPC гомологичными сериями пептидов как функции времени. Репрезентативная кривая осветления MLV EPC представлена для каждого из гомологичных пептидов. Использовали эквивалентную концентрацию пептида и EPC (105 мкМ). Длины волн возбуждения и эмиссии составляли 400 нм. При использовании Triton X-100 достигали полного растворения в конечной концентрации 1 мМ. Обозначения: ● - EPS; ○ - 2F; ■ - 3F³; □ - 3F¹⁴; ▲ - 4F; △ - 5F; ▼ - 6F; ▽ - 7F; ◇ - человеческий аро А-I; ◆ - Triton X-100.

Фиг. 17 иллюстрирует способность LCAT активировать гомологичные пептиды. Представлены гистограммы, представляющие активацию LCAT F-пептидами. Активность LCAT измеряли с использованием маленьких однослойных носителей EPC-холестерина и выражали данную активность в процентах относительно активности аро А-I, где активность аро А-I принимали за 100%. Каждое значение представляет собой среднее значение по трем повторностям. Используемая концентрация пептида составляла 20 мкг/мл.

На фиг. 18 показано, что индуцируемый LDL хемотаксис моноцитов ингибируется гомологичными сериями пептидов. LDL в виде монокомпонента или LDL, инкубированный либо с человеческим HDL, либо с гомологичной серией пептидов добавляли в кокультуры человеческих клеток артериальной стенки на 8 ч в присутствии 10% LPDS. Супернатанты удаляли и кокультуры промывали средой для культивирования без добавления сыворотки или LPDS. Кондиционированную среду собирали и анализировали на хемотактическую активность моноцитов. Данные представляют среднее значение \pm SEM ($n=9$ в каждом случае). При попарных сравнениях с LDL все пептиды, за исключением пептидов 3F, были досто-

верно более эффективны (по меньшей мере $p < 0,001$, отмечено "+" и *). Сравнения всех пептидов между собой анализировали с помощью одностороннего ANOVA (вариационный анализ). Звездочка указывает, что пептиды 4F, 5F и 6F были значительно более эффективны, чем гомологи 2F и 7F ($p < 0,05$ при сравнении методом Duckett). Скобка указывает на отсутствие достоверной разницы в способности ингибировать LDL-индуцированный хемотаксис среди трех данных пептидов.

На фиг. 19 показано, что инфекция гриппа А вызывает повышение уровня окисленных фосфолипидов в печени через два дня после инфекции. Мышей C57BL/6, находящихся на смешанном корме, интраназально инфицировали дозой вируса гриппа А таким образом, чтобы не развивалась вирусемия, как описано в статье Van Lenten и соавт., *Circulation*, 103:2283-2288, (2001). На 0, 2, 3, 5, 7 и 9 сутки после инфекции удаляли печень и определяли содержание окисленных фосфолипидов с помощью ESI-MS.

На фиг. 20 показано, что D-4F препятствует снижению активности параоксоназы после инфекции гриппа А. Нескольким мышам, приведенным на фиг. 19, ежедневно делали внутрибрюшинную инъекцию 20 мкг D-4F, а другим мышам делали инъекцию забуференного фосфатом солевого раствора (PBS). Активность параоксоназы (PON) измеряли в плазме на 0, 2, 7 и 9 сутки после инфекции.

На фиг. 21 показано, что D-4F препятствует индукции окисленных фосфолипидов в аортах мышей, инфицированных вирусом гриппа А. Нескольким мышам, приведенным на фиг. 19, ежедневно делали внутрибрюшинную инъекцию 20 мкг D-4F, а другим мышам делали инъекцию забуференного фосфатом солевого раствора (PBS). Аорты мышей брали на 2, 7 и 9 сутки после инфекции и определяли содержание окисленных фосфолипидов с помощью ESI-MS.

На фиг. 22A-22C показано, что после перорального введения D-4F в отличие от L-4F остается интактным в циркулирующей крови мышей, нуллисомных по рецептору LDL, повышает способность HDL защищать LDL от окисления человеческими клетками артериальной стенки и снижает индуцированную LDL хемотаксическую активность моноцитов. На фиг. 22A представлены пептиды L-4F и D-4F, в которые были введены радиоактивные метки с использованием реагента в виде иода, иммобилизованного на гранулах. Пептиды вводили перорально через зонд мышам, нуллисомным по рецептору LDL (100 мкл солевого раствора, содержащего 100 мкг немеченого пептида + пептид, меченный ^{125}I со специфической активностью 11×10^6 cpm (число импульсов/мин)/мкг пептида/животное, $n=3$). Кровь отбирали через 4 ч, плазму отделяли, делипидировали и анализировали с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой, как описано в ссылке 12. На панелях В и С представлено введение пептидов L-4F и D-4F (100 мкг в 100 мкл солевого раствора/животное) мышам с дефицитом рецептора LDL с помощью перорального зонда. Кровь отбирают через 6 ч, плазменный HDL и LDL выделяют гель-фильтрацией (FPLC) и исследуют на кокультурах. На фиг. 22В представлена способность мышиногo и человеческого HDL защищать контрольный человеческий (hHDL) от окисления человеческими клетками артериальной стенки и ингибировать индуцированную LDL хемотаксическую активность моноцитов. Человеческий LDL в концентрации 200 мкг белка/мл добавляли в кокультуры человеческих клеток артериальной стенки вместе с человеческим HDL (hHDL) в концентрации 350 мкг белка/мл или мышинным HDL (mHDL) в концентрации 100 мкг холестерина/мл, взятого от мышей, которые получали солевой раствор (солевой раствор Rx), или L-4F (L-4F Rx), или D-4F (D-4F Rx), хемотаксическую активность моноцитов определяли, как описано в данном контексте. На фиг. 22С показана способность мышиногo LDL индуцировать хемотаксическую активность моноцитов. Контроли анализа представлены слева на панели В. Справа представлено, что мышинный LDL (mLDL) выделен у мышей, получающих солевой раствор (солевой раствор Rx), или L-4F (L-4F Rx), или D-4F (D-4F Rx) и добавлен в концентрации 100 мкг холестерина/мл в кокультуры клеток артериальной стенки, не содержащие HDL, и определена хемотаксическая активность моноцитов. Значения представляют собой среднее \pm SD для четырех лунок в двух независимых экспериментах.

На фиг. 23 показано, что пероральное введение D-4F резко снижает поражения у мышей, нуллисомных по рецептору LDL, находящихся на западном корме. Группы мышей, нуллисомных по рецептору LDL, выдерживали на западном корме и вводили им через зонд 100 мкл солевого раствора в виде монокомпонента (солевой раствор) ($n = 4$ животных) или 100 мкл липосом, не содержащих D-4F (липосомы) ($n = 5$ животных), или 2,5 мг пептида D-4F в 100 мкл липосом (D-4F в липосомах ($n = 6$ животных), два раза в день в течение 6 недель. У мышей забирали кровь, впоследствии умерщвляли, фиксировали корень аорты, делали срезы и определяли количество материала, окрашенного масляным красным О в повреждениях в виде жировых штрихов.

На фиг. 24 показано, что пероральное введение D-4F резко снижает поражения у мышей, нуллисомных по рецептору LDL, находящихся на смешанном корме. В возрасте 4 недели в воде для питья нескольким мышам, нуллисомным по аро Е, добавляют D-4F в концентрации 1 мг/мл ($n = 4$ мыши). D-4F в концентрации 2 мг/мл добавляют в воду для питья другой группе мышей ($n = 4$ мыши) и никакой пептид не добавляют в воду для питья третьей группе мышей ($n = 5$ мышей). Все мыши употребляли приблизительно 2,5 мл воды в день, при этом первая группа не получала пептид (вода), вторая группа получала 2,5 мг D-4F/мышь/день (2,5 мг D-4F) и третья группа получала 5,0 мг D-4F/мышь/день (5,0 мг D-4F). Все группы продолжали получать смешанный корм в течение 5 недель, в течение которых у мышей забирали кровь, впоследствии их умерщвляли, фиксировали корень аорты, делали срезы и определяли количество материала, окрашенного масляным красным О в повреждениях в виде жировых штрихов.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

I. Уменьшение интенсивности симптома атеросклероза.

Данное изобретение касается обнаружения того, что синтетические пептиды, сконструированные для имитации мотива амфипатической спирали класса A (Segrest и соавт., *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 8:103-117, (1990)), способны связываться с фосфолипидами и проявляют многие биологические свойства, близкие свойствам человеческого apo-A-I. В частности, в данном изобретении было обнаружено, что, когда данные пептиды получают с использованием D-аминокислот, пептиды демонстрируют резкое увеличение длительности полужизни в сыворотке и их можно даже вводить перорально, в особенности, когда аминоконцы и/или карбоксильные концы блокированы.

Более того, удивительным фактом, обнаруженным в данном изобретении, было то, что данные D-формы пептидов сохраняют биологическую активность L-форм пептидов. Исследования на животных *in vivo* с использованием данных D-форм пептидов показали эффективность пероральной доставки, увеличенный период полужизни в сыворотке и способность уменьшать интенсивность или предупреждать/подавлять по крайней мере один симптом атеросклероза.

Обнаружено, что нормальный HDL ингибирует три стадии образования мягко окисленного LDL. В данных исследованиях (см. одновременно рассматриваемую заявку USSN 09/541,468, поданную 31 марта 2000 г.) продемонстрировано, что обработка человеческого LDL *in vitro* apo A-I или пептидным миметиком apo A-I (37pA) удаляет из LDL затравочные молекулы, которые включали HPODE и HPETE. Данные затравочные молекулы были необходимы для кокультур человеческих клеток артериальной стенки, чтобы получить способность к окислению LDL, и для LDL, чтобы индуцировать в клетках стенок артерии продукцию хемотактической активности моноцитов. Было также продемонстрировано, что после инъекции мышам или инфузии человеку apo A-I LDL, выделенный у мышей и людей-добровольцев после данной инъекции/инфузии apo A-I, был устойчив к окислению человеческими клетками артериальной стенки и не индуцировал хемотактическую активность моноцитов в кокультурах клеток артериальной стенки.

Защитная функция D-пептидов, соответствующих данному изобретению, проиллюстрирована на фиг. 1-5. На фиг. 1 на панелях A, B, C и D представлено связывание ^{14}C -D-5F с компонентами крови мышей, нуллисомных по ApoE. В данном контексте показано также, что HDL мышей, которые получали атерогенный корм и которым делали инъекцию PBS, не мог ингибировать окисление человеческого LDL и не мог ингибировать индуцированную LDL хемотактическую активность моноцитов в кокультурах человеческих клеток артериальной стенки. Напротив, HDL мышей, которые получали атерогенный корм и которым ежедневно инъецировали пептиды, описанные в данном контексте, был эффективным в плане ингибирования окисления человеческого LDL и предупреждения индуцированной LDL хемотактической активности моноцитов в кокультурах, как нормальный человеческий HDL (см. фиг. 2A и 2B). Кроме того, LDL, взятый от мышей, получавших атерогенный корм, которым ежедневно делали инъекцию PBS, легче окислялся и легче индуцировал хемотактическую активность моноцитов, чем LDL, взятый от мышей, получавших такой же корм, но которым ежедневно инъецировали 20 мкг пептида 5F. D-пептид, очевидно, не был иммуногенным (см. фиг. 4).

Реакции *in vitro* человеческих клеток артериальной стенки на HDL и LDL мышей, получавших атерогенный корм, которым инъецировали пептид, соответствующий данному изобретению, соответствуют защитному действию, показанному данными пептидами *in vivo*. Несмотря на близкие уровни общего холестерина, DDL-холестерина, IDL+VLDL-холестерина и пониженный уровень HDL-холестерина в виде процента от общего содержания холестерина, у животных, получавших атерогенный корм, которым делали инъекции пептида, имели значительно более низкое число повреждений (см. фиг. 5). Пептиды, соответствующие данному изобретению, предупреждали таким образом развитие атеросклеротических повреждений у мышей, получавших атерогенный корм.

Таким образом, в одном варианте осуществления данное изобретение представляет способы облегчения и/или предупреждения по крайней мере одного симптома атеросклероза. Способы предпочтительно включают введение в организм, предпочтительно млекопитающего, более предпочтительно человека, по крайней мере одного пептида, соответствующего данному изобретению (или миметика данного пептида). Пептид(ы) могут вводиться, как описано в данном контексте, в соответствии с любым из многочисленных стандартных способов, включая, без ограничения перечисленным, инъекцию, суппозиторий, назальный спрей, имплантат с замедленным выделением, чрескожный пластырь и т.п. В одном особенно предпочтительном варианте осуществления пептид(ы) вводят перорально (например, в виде сиропа, капсулы или таблетки).

Способы включают введение одного полипептида, соответствующего данному изобретению, или введение двух или более различных полипептидов. Полипептиды могут быть представлены в виде мономеров или в димерных, олигомерных или полимерных формах. В ряде вариантов осуществления мультимерные формы могут содержать ассоциированные мономеры (например, связанные ионными или гидрофобными связями), тогда как ряд других мультимерных форм содержит ковалентно связанные мономеры (связанные непосредственно или через линкер).

Хотя изобретение описано в плане применения для человека, оно может быть также пригодно для животного, например, для ветеринарных нужд. Таким образом, предпочтительные организмы включают в себя, без ограничения перечисленным, человека, приматов, собак, лошадей, кошек, свиней, копытных, зайцеобразных и т.п.

Способы, соответствующие данному изобретению, не ограничены человеком и животными, проявляющими по крайней мере один симптом атеросклероза (например, гипертензию, образование и разрушение бляшек, повторение таких клинических событий, как сердечный приступ, стенокардия или инсульт, высокие уровни холестерина в плазме, высокие уровни липопротеина низкой плотности, высокие уровни липопротеина очень низкой плотности или воспалительных белков и т.п.), но являются эффективными в контексте профилактики. Так, пептиды, соответствующие данному изобретению (или их метки), можно вводить в организм с целью предупреждения начала/развития по крайней мере одного симптома атеросклероза. В данном контексте особенно предпочтительными являются субъекты с проявлениями одного или более факторов риска развития атеросклероза (например, семейный анамнез, гипертензия, ожирение, злоупотребление алкоголем, курение, высокий уровень холестерина в крови, высокий уровень триглицеридов в крови, повышенный уровень в крови LDL, VLDL, IDL, или низкий уровень HDL, диабет или наличие диабета в семейном анамнезе, высокий уровень липидов в крови, сердечный приступ, стенокардия или инсульт и т.п.).

Кроме способов с использованием подавляющих атеросклероз пептидов, соответствующих данному изобретению, в данном изобретении представлены также указанные пептиды, пептиды, приготовленные в виде фармацевтических препаратов, особенно для пероральной доставки, и наборы для лечения и/или предупреждения по крайней мере одного симптома атеросклероза.

II. Уменьшение интенсивности симптома атеросклероза, связанного с острым воспалительным ответом.

Пептиды, подавляющие атеросклероз, соответствующие данному изобретению, эффективны также в ряде других контекстов. В частности, отмечено, что сердечно-сосудистые осложнения (например, атеросклероз, инсульт и т.п.) часто сопровождают или следуют за началом воспалительной реакции острой фазы. Данная воспалительная реакция острой стадии часто ассоциируется с рецидивирующим воспалительным заболеванием (например, лепрой, туберкулезом, системной красной волчанкой и ревматоидным артритом), вирусной инфекцией (например, гриппом), бактериальной инфекцией, грибковой инфекцией, трансплантатом органа, раной или иной травмой, имплантированным протезом, биопленкой и т.п.

Удивительный факт, обнаруженный в данном изобретении, состоит в том, что введение по крайней мере одного пептида, описанного в данном контексте, может снижать или предотвращать образование окисленных фосфолипидов во время или после ответной реакции острой фазы и, вследствие этого, уменьшать или устранять сердечно-сосудистые осложнения, связанные с данным состоянием.

Так, например, продемонстрировано, что последствием инфекции гриппа является снижение активности параоксоназы и тромбоцит-активирующей ацетилгидролазы в HDL. Не будучи связанными определенной теорией, авторы полагают, что в результате потери в HDL активностей данных ферментов, а также в результате связывания прооксидантных белков с HDL во время ответной реакции острой фазы HDL более не способен препятствовать окислению LDL и более неспособен препятствовать индуцированной LDL продукции хемотактической активности моноцитов в эндотелиальных клетках.

Показано, что у субъекта, которому ежедневно делают инъекции очень низких доз полипептидов, соответствующих данному изобретению, (например, 20 мкг/мышь) после инфекции вируса гриппа А не падают уровни параоксоназы и не образуются биологически активные окисленные фосфолипиды на уровне, превышающем фоновый. Данные факты свидетельствуют о том, что D-4F (и/или другие пептиды, соответствующие данному изобретению) могут быть введены (например, перорально или путем инъекции) больным с установленным заболеванием коронарной артерии во время инфекции гриппа или других событий, которые могут создать воспалительную ответную реакцию острой фазы (например, вследствие вирусной инфекции, бактериальной инфекции, травмы, трансплантата, различных аутоиммунных состояний и т.п.), и таким образом можно посредством данного краткосрочного лечения предупредить повышенную вероятность сердечного приступа и инсульта, связанных с патологиями, которые приводят к созданию данных воспалительных состояний.

Так, в некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предполагают введение по крайней мере одного пептида, соответствующего данному изобретению, субъекту с риском развития или в состоянии острой воспалительной реакции и/или с риском развития или с симптомом атеросклероза.

Так, например, субъекту с коронарной болезнью или с риском развития данной болезни можно профилактически ввести полипептид, соответствующий данному изобретению, в течение периода повышенной заболеваемости гриппом. Человека (или животное) с рецидивирующим воспалительным состоянием, например, ревматоидным артритом, различными аутоиммунными заболеваниями и т.п., можно лечить полипептидом, соответствующим данному изобретению, с целью смягчения или предупреждения развития атеросклероза или инсульта. Человека (или животное) с травмой, например, острым повреждением, трансплантатом ткани и т.п. можно лечить полипептидом, соответствующим данному изобретению, с целью смягчения развития атеросклероза или инсульта.

[076] В ряде случаев данные способы будут приводить к диагностике появления или риска развития острого воспалительного ответа. Острый воспалительный ответ, как правило, включает в себя изменения в метаболизме и регуляции генов в печени. Именно динамический гомеостатический процесс включает все главные системы организма в дополнение к иммунной, сердечно-сосудистой и центральной нервной системе. Обычно ответная реакция острой фазы продолжается только несколько дней, однако, в случаях хронического или рецидивирующего воспаления аберрантная продолжительность некоторых аспектов ответной реакции острой фазы может участвовать в повреждении основных тканей, которое сопровождается заболеванием, и может также приводить к дальнейшим осложнениям, например сердечно-сосудистым заболеваниям или заболеваниям, связанным с отложением белка, таким как амилоидоз.

[0077] Важным аспектом ответа острой фазы является измененный коренным образом биосинтетический профиль в печени. В нормальных условиях печень синтезирует характерный для нее круг белков плазмы в постоянных концентрациях. Многие из данных белков имеют важные функции, и необходимы повышенные уровни в плазме данных реагентов острой фазы (APR) или белков острой фазы (APP) во время ответной реакции острой фазы, следующей после стимуляции воспаления. Хотя большинство APRs синтезируются гепатоцитами, некоторые образуются клетками других типов, включая моноциты, эндотелиальные клетки, фибробласты и адипоциты. Большинство APR индуцируются на уровне между 50% от нормы и превышением нормы в несколько раз. Напротив, уровни основных APR могут повышаться в 1000 раз относительно нормы. Данная группа включает в себя сывороточный амилоид А (SAA) и либо С-реактивный белок (CRP) у человека, либо его гомолог у мышей, сывороточный компонент амилоида Р (SAP). Концентрации в плазме так называемых негативных APR снижаются во время ответной реакции острой фазы, обеспечивая повышение способности печени синтезировать индуцированные APR.

В ряде вариантов осуществления ответную реакцию острой фазы или риск ее развития оценивают путем измерения одного или более APP. Измерение данных маркеров хорошо известно компетентным специалистам в данной области, и существуют компании-поставщики, которые проводят данное измерение (например, AGP, измеренное Cardiotech Services, Louisville, KY).

III. Смягчение симптома или состояния, связанного с кальцификацией коронарной артерии и остеопорозом.

Идентифицированы также окисленные липиды, которые являются причиной кальцификации коронарной артерии и остеопороза. Более того, не будучи связанными определенной теорией, авторы полагают, что те же самые механизмы участвуют в патогенезе кальцификационного аортального стеноза.

Таким образом, в ряде вариантов осуществления данное изобретение предполагает использование пептидов, описанных в данном контексте, для подавления или предупреждения развития симптома заболевания, такого как ревматическая полимиалгия, нодозный полиартериит, склеродерма, идиопатический легочный фиброз, хроническое обструктивное легочное заболевание, болезнь Альцгеймера, СПИД, кальцификация коронарной артерии, кальцификационный аортальный стеноз, остеопороз и т.п.

IV. Предпочтительные пептиды и их получение.

Предпочтительные пептиды.

В данном изобретении обнаружено, что пептиды класса А способны смягчать по крайней мере один симптом атеросклероза. Пептиды класса А характеризуются образованием α -спирали, которая дает сегрегацию полярных и неполярных остатков, формируя таким образом полярную и неполярную поверхности с положительно заряженными остатками, находящимися на разделе полярной и неполярной поверхностей, и отрицательно заряженными остатками, находящимися в центре полярной поверхности (см., например, статью Anantharamaiah, Meth. Enzymol., 128:626-668, (1986)). Замечено, что четвертый экзон аро А-I при складывании с использованием 3,667 остатков/поворот спирали образует структуру амфипатической спирали класса А.

Один особенно предпочтительный пептид класса А, обозначенный 18А (см. табл. 1, а также статью Anantharamaiah, Meth. Enzymol, 128: 626-668, (1986)), был модифицирован, как описано в данном контексте, с целью получения пептидов, пригодных для перорального введения и высокоэффективных для подавления или предупреждения по крайней мере одного симптома атеросклероза. Вне связи с определенной теорией, полагают, что действие пептидов, соответствующих данному изобретению, *in vivo* может заключаться в улавливании затравочных молекул(ы), которые снижают окисление LDL.

Определено, что повышение числа остатков Phe на гидрофобной поверхности 18А теоретически должно было бы повысить аффинность к липидам, что установлено с помощью вычислений, описанных в статье Palgunachari и соавт., Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology, 16: 328-338, (1996). Теоретически методичная замена остатков на неполярной поверхности 18А на Phe могла бы привести к образованию шести пептидов. Пептиды с дополнительными 2, 3 и 4 Phe теоретически имели бы значение аффинности к липидам (λ) 13, 14 и 15 единиц, соответственно. Однако значения 1 увеличились бы на четыре единицы, если бы число дополнительных Phe возросло от 4 до 5 (до 19 λ единиц). Увеличение до 6 или 7 Phe привело бы к менее резкому повышению (до 20 и 21 λ единиц, соответственно). Вследствие этого, было выбрано 5 дополнительных Phe (и поэтому пептиды обозначены, как 5F). В одном особенно

предпочтительном варианте осуществления пептид 5F был блокирован тем, что аминоконцевой остаток был ацетилирован, а карбоксильный конец был амидирован.

Новый пептидный аналог класса A, 5F, ингибировал развитие повреждения у чувствительных к атеросклерозу мышей. Новый пептидный аналог 5F сравнивали с мышинным аро A-I (MoA-I) по эффективности подавления индуцированного кормом атеросклероза у данных мышей, используя дозировки пептида, основанные на исследованиях, проведенных Levine и соавт. (см. статью Levine и соавт., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:12040-12044, (1993)).

Был также получен ряд других пептидов класса A, которые показали различные, но значительные степени эффективности в плане уменьшения интенсивности по крайней мере одного симптома атеросклероза. Ряд данных пептидов приведен в табл. 1.

Таблица 1

Предпочтительные пептиды для использования в данном изобретении

Название пептида	Последовательность аминокислот	SEQ ID NO.
18A	D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F	1
2F	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH ₂	2
3F	Ac-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH ₂	3
3F14	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH ₂	4
4F	Ac-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH ₂	5
5F	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	6
6F	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	7
7F	Ac-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	8
	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-NH ₂	9
	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F-NH ₂	10
	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F-NH ₂	11
	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	12
	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	13
	Ac-E-W-L-K-L-F-Y-E-K-V-L-E-K-F-K-E-A-F-NH ₂	14
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH ₂	15
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-NH ₂	16
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F-NH ₂	17
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F-NH ₂	18
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	19
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	20
	Ac-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH ₂	21
	Ac-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH ₂	22
	Ac-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH ₂	23
	Ac-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	24
	Ac-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	25
	Ac-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH ₂	26
	Ac-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-NH ₂	27
	Ac-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F-NH ₂	28
	Ac-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F-NH ₂	29
	Ac-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	30
	Ac-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-NH ₂	31

Ac-L-F-Y-E-K-V-L-E-K-F-K-E-A-F-NH ₂	32
Ac-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH ₂	33
Ac-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-NH ₂	34
Ac-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F-NH ₂	35
Ac-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F-NH ₂	36
Ac-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	37
Ac-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	38
Ac-D-W-L-K-A-L-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-L-NH ₂	39
Ac-D-W-F-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-NH ₂	40
Ac-D-W-F-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	41
Ac-E-W-L-K-A-L-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-L-NH ₂	42
Ac-E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH ₂	43
Ac-E-W-F-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-NH ₂	44
Ac-E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-F-E-K-F-K-E-F-P-NH ₂	45
Ac-E-W-L-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	46
Ac-E-W-F-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	47
Ac-D-F-L-K-A-W-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-W-NH ₂	48
Ac-E-F-L-K-A-W-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-W-NH ₂	49
Ac-D-F-W-K-A-W-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-W-W-NH ₂	50
Ac-E-F-W-K-A-W-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-W-W-NH ₂	51
Ac-D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F-NH ₂	52
Ac-D-K-W-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L-NH ₂	53
Ac-E-K-L-K-A-F-Y-E-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F-NH ₂	54
Ac-E-K-W-K-A-V-Y-E-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L-NH ₂	55
Ac-D-W-L-K-A-F-V-D-K-F-A-E-K-F-K-E-A-Y-NH ₂	56
Ac-E-K-W-K-A-V-Y-E-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L-NH ₂	57
Ac-D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F-NH ₂	58
Ac-E-W-L-K-A-F-V-Y-E-K-V-F-K-L-K-E-F-F-NH ₂	59
Ac-D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH ₂	60
Ac-E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH ₂	61
Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH ₂	62
Ac-E-W-L-K-A-F-Y-E-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH ₂	63
Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F-NH ₂	64
Ac-E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F-NH ₂	65
Ac-D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F-NH ₂	66
Ac-E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F-NH ₂	67
Ac-D-W-L-R-A-F-Y-D-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH ₂	68

Ac-E-W-L-R-A-F-Y-E-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH ₂	69
Ac-D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F-NH ₂	70
Ac-E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F-NH ₂	71
Ac-D-W-L-R-A-F-Y-D-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH ₂	72
Ac-E-W-L-R-A-F-Y-E-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH ₂	73
Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-R-E-A-F-NH ₂	74
Ac-E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-R-E-A-F-NH ₂	75
Ac-D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F-NH ₂	76
Ac-E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F-NH ₂	77
D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-P-D-W-L-K-	78
A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F	
D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-P-D-W-L-K-	79
A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F	
D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-P-D-W-F-K-	80
A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F	
D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F-P-D-K-L-K-	81
A-F-Y-D-K-V-F-E-W-L-K-E-A-F	
D-K-W-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L-P-D-K-W-K-	82
A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L	
D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-P-D-W-F-K-	83
A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F	
D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F-P-D-W-L-K-	84
A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F	
D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-A-E-K-F-K-E-F-F-P-D-W-L-K-	85
A-F-Y-D-K-F-A-E-K-F-K-E-F-F	

¹ Линкеры подчеркнуты

Хотя различные пептиды, приведенные в табл. 1, представлены с ацетильной группой, защищающей аминоконеч, и амидной группой, защищающей карбоксильный конек, одна или обе защитные группы могут быть удалены и/или заменены другой защитной группой, как описано в данном контексте. В особенно предпочтительном варианте осуществления пептиды содержат одну или более аминокислот в D-форме, как описано в данном контексте. В ряде вариантов осуществления каждая аминокислота (например, каждая энантиомерная аминокислота) в пептидах, приведенных в табл. 1, является D-формой аминокислоты.

Отмечено также, что табл. 1 не является полной. Используя описание, представленное в данном контексте, можно рутинным образом получить подходящие пептиды (например, путем консервативных или полуконсервативных замен (например, D заменить на E), удлинений, делеций и т.п.). Так, например, в одном варианте осуществления используют укорочения любого по крайней мере одного пептида, идентифицированного в SEQ ID NONO: 2-20 и 39-85. Так, например, SEQ ID NO: 21 представляет пептид, содержащий 14 аминокислот C-конца 18A, содержащий одну или более D-аминокислот, тогда как SEQ ID NONO: 22-38 представляют другие варианты укорочения. Более длинные пептиды также подходят. Данные более длинные пептиды могут полностью образовывать амфипатическую спираль класса А или амфипатическая спираль класса А может образовывать по крайней мере один домен пептида. Кроме того, в данном изобретении рассмотрены мультимерные варианты пептидов. Так, например, пептиды, приведенные в табл. 1, могут быть связаны друг с другом (непосредственно или через линкер (например, углеродный линкер или одну или более аминокислот) с одной или более промежуточных аминокислот). Иллюстративные полимерные пептиды включают в себя 18A-Pro-18A и пептиды SEQ ID NONO: 79-85, предпочтительно содержащие одну или более D-аминокислот, более предпочтительно содержащие каждую из аминокислот в форме D-аминокислоты, как описано в данном контексте, и/или имеющие один или оба защищенных конца.

Неожиданный факт, соответствующий данному изобретению, состоит в том, что при инкорпорации D-аминокислот в пептиды класса А (например, как показано в табл. 1) последние сохраняют свою активность, но при этом могут вводиться перорально. Более того, данное пероральное введение в результате обеспечивало относительно эффективное всасывание и значительный период полужизни, представляя таким образом эффективный способ смягчения по крайней мере одного симптома атеросклероза.

При использовании представленного описания в данном контексте компетентный специалист в данной области может рутинным образом модифицировать проиллюстрированные пептиды класса А, с

целью получения других пептидов класса А, соответствующих данному изобретению. Например, можно осуществить рутинные консервативные или полуконсервативные замены (например, Е на D) имеющихся аминокислот. Эффект различных замен на аффинность полученного в результате пептида в отношении липидов можно предсказать, используя вычислительный способ, описанный Palgunachari и соавт., *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology*, 16: 328-338, (1996). Пептиды можно удлинить или укоротить настолько, чтобы сохранилась структура α -спирали класса А. Кроме того, можно осуществить замены, делающие конечный пептид более близким пептиду(ам), эндогенно образующемуся в организме субъекта.

В ряде вариантов осуществления пептиды, соответствующие данному изобретению, содержат "D"-формы пептидов, описанных в патенте США 4643988, более предпочтительно "D"-формы, в которых один или оба конца связаны с защитными группами. Данные пептиды включают в себя пептиды, имеющие формулу $A_1-B_1-B_2-C_1-D-B_3-B_4-A_2-C_2-B_5-B_6-A_3-C_3-B_7-C_4-A_4-B_8-B_9$ (SEQ ID NO: 86), где A_1 , A_2 , A_3 и A_4 независимо представлены аспарагиновой кислотой или глутаминовой кислотой или их гомологами или аналогами; B_1 , B_2 , B_3 , B_4 , B_5 , B_6 , B_7 , B_8 и B_9 независимо представлены триптофаном, фенилаланином, аланином, лейцином, тирозином, изолейцином, валином или α -нафтилаланином или их гомологами или аналогами; C_1 , C_2 , C_3 и C_4 независимо представлены лизином или аргинином и D представлено серином, треонином, аланином, глицином, гистидином или их гомологами или аналогами, при условии, что, если A_1 и A_2 представлены аспарагиновой кислотой, то A_3 и A_4 представлены глутаминовой кислотой, B_2 и B_9 представлены лейцином, B_3 и B_7 - фенилаланином, B_4 - тирозином, B_5 - валином, B_6 , B_8 и D - аланином, а C_1 , C_2 , C_3 и C_4 - лизином, и B_1 не является триптофаном, где одна из энантиомерных аминокислот находится в форме "D"-аминокислоты. Предпочтительно, когда по меньшей мере 50% энантиомерных аминокислот находятся в "D"-форме, более предпочтительно, когда по меньшей мере 80% энантиомерных аминокислот находятся в "D"-форме и наиболее предпочтительно, когда по меньшей мере 90% или даже все энантиомерные аминокислоты находятся в "D"-форме.

Хотя в предпочтительных вариантах осуществления в пептидах, соответствующих данному изобретению, используют природные аминокислоты или D-формы природных аминокислот, предусмотрены замены неприродными аминокислотами (например, метионинсульфоксидом, метионинметилсульфонием, норлейцином, эпислон-аминокапроновой кислотой, 4-аминобутановой кислотой, тетрагидроизохинолин-3-карбоновой кислотой, 8-аминокапроновой кислотой, 4-аминомасляной кислотой, Lys(N(ξ)-трифторацетил), α -аминоизомасляной кислотой и т.п.).

Кроме пептидов класса А в данном контексте предусмотрены пептидомиметики. Аналоги пептидов обычно используют в фармацевтической промышленности как непептидные лекарственные вещества со свойствами, аналогичными свойствам матричных пептидов. Данные типы непептидных соединений называют "миметиками пептидов" или "пептидомиметиками" (см. статьи Fauchere, *Adv. Drug Res.*, т.15, стр.29, (1986); Veber и Freidinger, *TINS*, стр.392, (1985) и Evans и соавт., *J. Med. Chem.*, т. 30, стр. 1229, (1987)) и обычно создают с помощью компьютеризированного молекулярного моделирования. Миметики пептидов со структурой, близкой терапевтически эффективным пептидам, могут быть использованы для получения эквивалентного терапевтического или профилактического эффекта.

В общем пептидомиметики являются близкими по структуре полипептиду-образцу (т.е. 5F, описанному в данном контексте), но они имеют одну или более пептидных связей, необязательно замещенных связью, выбранной из группы, состоящей из $-CH_2NH-$, $-CH_2S-$, $-CH_2-CH_2-$, $-CH=CH-$ (цис и транс), $-COCH_2-$, $-CH(OH)CH_2-$, $-CH_2SO-$, и т.п., известными в данной области способами, далее описанными в следующих ссылках: главе, написанной Spatola в монографии под ред. B. Weinstein, *Химия и биохимия аминокислот, пептидов и белков* (Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins), Marcel Dekker, New York, стр. 267, (1983); работе Spatola, *Vega Data 1(3) Модификации пептидного скелета* (Peptide Backbone Modifications), (общий обзор), (1983); статье Morley, *Trends Pharm. Sci.*, стр. 463-468, (1980), (общий обзор); статье Hudson и соавт., *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 14:177-185, (1979), ($-CH_2NH-$, CH_2CH_2-); статьях Spatola и соавт., *Life Sci.*, 38:1243-1249, (1986) ($-CH_2S-$); Hann, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, т. I, стр.307-314, (1982) ($-CH-CH-$, цис и транс); Almquist и соавт., *J. Med. Chem.*, 23:1392-1398, (1980), ($-COCH_2-$); Jennings-White и соавт., *Tetrahedron Lett.*, 23:2533, (1982), ($-COCH_2-$); заявка Szelke M. и соавт., *European Appln. EP 45665*, (1982), CA: 97:39405 (1982) ($-CH(OH)CH_2-$); статье Holladay и соавт., *Tetrahedron Lett.*, 24:4401-4404, (1983) ($-C(OH)CH_2-$) и Hruby, *Life Sci.*, 31:189-199, (1982), ($-CH_2S-$)).

Особенно предпочтительной непептидной связью является $-CH_2NH-$. Данные миметики пептидов могут иметь существенные преимущества перед полипептидными вариантами осуществления, включая, например, такие как более экономически выгодное получение, повышенную химическую стабильность, улучшенные фармакологические свойства (период полужизни, всасывание, активность, эффективность и т.п.), пониженную антигенность и др.

Кроме того, круговые перестановки пептидов, описанные в данном контексте, или ограниченные пептиды (включая циклизированные пептиды), содержащие консенсусные последовательности или варианты, практически идентичные консенсусным последовательностям, могут быть получены способами, известными в уровне техники (см. статью Rizo и Gierasch, *Ann. Rev. Biochem.*, т. 61, стр. 387, (1992)); на-

пример, посредством введения внутренних остатков цистеина, способных к образованию внутримолекулярных дисульфидных мостиков, которые циклизуют пептид.

Получение пептидов.

Пептиды, используемые в данном изобретении, синтезированы химическим путем с использованием стандартных методик химического синтеза пептидов или, в особенности, в случаях, когда пептид не содержит остатки D-аминокислот, экспрессированы рекомбинантным образом. При рекомбинантной экспрессии полипептидов организм-хозяин (например, бактерию, растение, грибные клетки и т.п.) культивируют в среде, где одну или более аминокислот представляют организму исключительно в D-форме. Тогда рекомбинантно экспрессируемые в данной системе пептиды включают в себя данные D-аминокислоты.

В предпочтительных вариантах осуществления пептиды синтезируют химическим путем с помощью ряда жидко- или твердофазных методик синтеза пептидов, известных компетентным специалистам в данной области. Предпочтительным способом химического синтеза полипептидов, соответствующим данному изобретению, является твердофазный синтез, в котором C-концевую аминокислоту последовательно присоединяют к нерастворимой основе с последующим последовательным добавлением остальных аминокислот последовательности. Методики твердофазного синтеза хорошо известны компетентным специалистам в данной области и описаны, например, в разделе, написанном Barany и Merrifield, *Твердофазный синтез пептидов (Solid-Phase Peptide Synthesis)* в монографии *Пептиды: анализ, синтез, биология (The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology)*, т. 2 Специальные способы синтеза пептидов, (Special Methods in Peptide Synthesis), часть A, стр. 3-284, (1963); см. также статью Merrifield и соавт., J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2156 (1963) и раздел, написанный Stewart и соавт. в монографии *Твердофазный синтез пептидов (Solid Phase Peptide Synthesis)*, 2 изд., Pierce Chem. Co., Rockford, Ill., (1984).

В наиболее предпочтительном варианте осуществления пептиды синтезируют с помощью процедуры твердофазного синтеза пептидов, используя в качестве твердого носителя бензгидриламинную смолу (Beckman Bioproducts, 0,59 ммоль $\text{NH}_2/\text{г}$ смолы). COOH -концевую аминокислоту (например, t-бутилкарбонил-Phe) присоединяют к твердому носителю через 4-(оксиметил)фенацетильную группу. Данная связь более стабильна, чем принятая связь на основе бензилового сложного эфира, при этом конечный пептид можно таким же образом отщепить путем гидрирования. Для этой цели используют гидрирование с переносом при использовании муравьиной кислоты в качестве донора водорода. Детальные протоколы, используемые при синтезе пептидов и анализе синтезированных пептидов описаны в печатном приложении к статье Anantharamaiah и соавт., J. Biol. Chem., 260(16): 10248-10255, (1985).

Отмечено, что при химическом синтезе пептидов, в частности, пептидов, содержащих D-аминокислоты, данный синтез часто приводит к образованию ряда укороченных пептидов в дополнение к желательному продукту полной длины. Процесс очистки (например, ВЭЖХ), как правило, приводит к потере значительного количества продукта полной длины.

В данном изобретении обнаружено, что при синтезе D-пептидов (например, D-4) для того, чтобы предотвратить потерю при очистке самой длинной формы, можно провести диализ и использовать смесь, устранив таким образом последнюю стадию очистки с использованием ВЭЖХ. При этом потери смеси составляют приблизительно 50% активности высокоочищенного продукта (например, от массы белкового продукта), но смесь содержит приблизительно в 6 раз больше пептида, обладая таким образом более высокой общей активностью.

D-формы аминокислот.

D-аминокислоты инкорпорируют в одно или более положений в пептиде, просто используя дериватизированный остаток D-формы аминокислоты в химическом синтезе. Остатки D-формы для твердофазного синтеза пептидов поставляются в продажу рядом фирм (см., например, Advanced Chem Tech, Louisville; Nova Biochem, San Diego; Sigma, St. Louis; Bachem California Inc., Torrance, и т.п.). D-формы аминокислот можно инкорпорировать в любое положение пептида, как это желательно. Так, например, в одном варианте осуществления пептид может содержать одну D-аминокислоту, тогда как в других вариантах осуществления пептид содержит по меньшей мере две, как правило, по меньшей мере три, более обыкновенно по меньшей мере четыре, наиболее обыкновенно по меньшей мере пять, предпочтительно по меньшей мере шесть, более предпочтительно по меньшей мере семь и наиболее предпочтительно по меньшей мере восемь D-аминокислот. В особенно предпочтительных вариантах осуществления практически каждая другая (энантиомерная) аминокислота является аминокислотой в D-форме. В ряде вариантов осуществления по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95% энантиомерных аминокислот представлены D-формой аминокислот. В одном особенно предпочтительном варианте осуществления, практически каждая из энантиомерных аминокислот является D-формой аминокислоты.

Защитные группы.

В ряде вариантов осуществления одна или более R-групп на составляющих пептид аминокислотах и/или концевых аминокислотах блокированы защитной группой. Вне связи с определенной теорией в данном изобретении обнаружено, что блокирование, в особенности, амино- и/или карбоксиконцов дан-

ных пептидов, соответствующих данному изобретению, значительно улучшает пероральную доставку и существенно увеличивает период полужизни в сыворотке.

Для этой цели используют широкий ряд защитных групп. Данные группы включают в себя, без ограничения перечисленным, ацетил, амид и алкильные группы, при этом ацетильная и алкильная группы являются особенно предпочтительными для N-концевой защиты, а амидные группы являются предпочтительными для защиты карбоксильного конца. В ряде особенно предпочтительных вариантов осуществления защитные группы включают в себя, без ограничения перечисленным, алкильные цепи, как в жирных кислотах, пропеонил, формил и др. Особенно предпочтительные карбоксилзащитные группы включают в себя амиды, сложные эфиры и образующие простой эфир защитные группы. В одном предпочтительном варианте осуществления ацетильную группу используют для защиты аминоконца, а амидную группу используют для защиты карбоксильного конца. Данные блокирующие группы усиливают тенденции пептидов к образованию спирали. Определенные особенно предпочтительные блокирующие группы включают в себя алкильные группы различной длины, например, группы, имеющие формулу: $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$, где n лежит в интервале от приблизительно 1 до приблизительно 20, предпочтительно от приблизительно 1 до приблизительно 16 или 18, более предпочтительно от приблизительно 3 до приблизительно 13 и наиболее предпочтительно от приблизительно 3 до приблизительно 10.

В ряде особенно предпочтительных вариантов осуществления защитные группы включают в себя, без ограничения перечисленным, алкильные цепи, как в жирных кислотах, пропеонил, формил и др. Особенно предпочтительные карбоксилзащитные группы включают в себя амиды, сложные эфиры и образующие простой эфир защитные группы. В одном предпочтительном варианте осуществления ацетильную группу используют для защиты аминоконца, а амидную группу используют для защиты карбоксильного конца. Данные блокирующие группы усиливают тенденции пептидов к образованию спирали. Определенные особенно предпочтительные блокирующие группы включают в себя алкильные группы различной длины, например, группы, имеющие формулу: $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$, где n лежит в интервале от приблизительно 1 до приблизительно 20, предпочтительно от приблизительно 1 до приблизительно 16 или 18, более предпочтительно от приблизительно 3 до приблизительно 13 и наиболее предпочтительно от приблизительно 3 до приблизительно 10.

Другие защитные группы включают в себя, без ограничения перечисленным, Fmoc, t-бутоксикарбонил (Boc), 9-флуоренацетильную группу, 1-флуоренкарбоксильную группу, 9-флуоренкарбоксильную группу, 9-флуоренон-1-карбоксильную группу, бензилоксикарбонил, ксантил (Xan), тритил (Trt), 4-метилтритил (Mtt), 4-метокситритил (Mmt), 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонил (Mtr), мезитилен-2-сульфонил (Mts), 4,4-диметоксибензгидрил (Mbh), тозил (Tos), 2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-сульфонил (Pmc), 4-метилбензил (MeBzl), 4-метоксибензил (MeOBzl), бензилоксигруппу (BzlO), бензил (Bzl), бензоил (Bz), 3-нитро-2-пиридинсульфенил (Npys), 1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогексидил)этил (Dde), 2,6-дихлорбензил (2,6-диCl-Bzl), 2-хлорбензилоксикарбонил (2-Cl-Z), 2-бромбензилоксикарбонил (2-Br-Z), бензилоксиметил (Bom), циклогексилоксигруппу (cHxO), t-бутоксиметил (Bum), t-бутоксигруппу (tBuO), t-бутил (tBu), ацетил (Ac) и трифторацетил (TFA).

Защитные/блокирующие группы хорошо известны компетентным специалистам, так же, как способы присоединения данных групп к соответствующему остатку(ам), входящему в состав пептидов, соответствующих данному изобретению (см., например, монографию Greene и соавт., *Защитные группы в органическом синтезе (Protective Groups in Organic Synthesis)*, 2-ое изд., John Wiley & Sons, Inc. Somerset, N.J., (1991)). В одном из предпочтительных вариантов осуществления, например, ацетилирование осуществляют во время синтеза, когда пептид находится на смоле, при использовании уксусного ангидрида. Амидная защита может достигаться посредством выбора подходящей смолы для синтеза. При синтезе пептидов, описанных в данном контексте, в примерах использовали амидную смолу. После окончания синтеза все полупостоянные защитные группы на кислых бифункциональных аминокислотах, таких как Asp и Glu, основной аминокислоте Lys и гидроксиле Tug одновременно удаляют. Пептиды, снятые с данной смолы путем обработки кислотой, получают с N-концом, защищенным ацетилом и карбоксилем, защищенным NH_2 , и при одновременном удалении всех других защитных групп.

V. Усиление всасывания пептидов.

Удивительным фактом, обнаруженным в данном изобретении, является то, что при введении пептида, состоящего только из L-аминокислот (например, если бы это было не так, то он имел бы последовательность пептида, соответствующую данному изобретению), в сочетании с D-формой (т.е. пептидом, соответствующим данному изобретению,) всасывание D-формы пептида повышается. Так, в ряде вариантов осуществления данное изобретение предусматривает использование комбинаций D-форм и L-форм пептидов в способах, соответствующих данному изобретению. Пептид в D-форме и пептид в L-форме могут иметь различные последовательности аминокислот, однако, в предпочтительных вариантах осуществления они обе имеют последовательности аминокислот пептидов, описанных в данном контексте, и в еще более предпочтительном варианте осуществления они имеют одну и ту же последовательность аминокислот.

Фактом, обнаруженным в данном изобретении, является то, что конкатамеры пептидов алифатической спирали класса A, соответствующих данному изобретению, также эффективны в плане смягчения

по крайней мере одного симптома атеросклероза. Мономеры, входящие в состав конкатамеров, могут быть непосредственно связаны друг с другом или соединены с помощью линкера. В ряде вариантов осуществления линкер представлен аминокислотным линкером (например, пролином) или пептидным линкером (например, Gly₄Ser₃). В ряде вариантов осуществления конкатамер представляет собой 2-мер, более предпочтительно 3-мер, еще более предпочтительно 4-мер и наиболее предпочтительно 5-мер, 8-мер или 10-мер.

VI. Фармацевтические препараты.

Для реализации способов, соответствующих изобретению, по крайней мере один пептид или миметик пептидов, соответствующих данному изобретению, вводят, например, субъекту, у которого диагностирован по крайней мере один симптом атеросклероза или риск развития атеросклероза. Пептиды или миметики пептидов могут быть введены в "нативной" форме или, если это желательно, в форме солей, сложных эфиров, амидов, пролекарств, производных и т.п., при условии, что соль, сложный эфир, амид, пролекарство или производное являются фармакологически приемлемыми, т.е. эффективными в данном способе. Соли, сложные эфиры, амиды, пролекарства и другие производные активных агентов можно приготовить с использованием стандартных процедур, известных компетентным специалистам в области синтетической органической химии, как описано, например, в монографии March, Успехи органической химии, реакции, механизмы и структура (Advanced Organic Chemistry; Reactions, Mechanisms and Structure), 4-ое изд., N.Y., Wiley-Interscience, (1992).

Например, соли, полученные добавлением кислоты, готовят из свободного основания с использованием традиционной методики, которая обычно включает в себя реакцию с подходящей кислотой. Как правило, лекарственное вещество в форме основания растворяют в полярном органическом растворителе, таком как метанол, и добавляют кислоту. Полученная в результате соль выпадает в осадок или может быть выделена из раствора при добавлении менее полярного растворителя. Подходящие кислоты для получения солей при добавлении кислот включают в себя как органические кислоты, например, уксусную кислоту, пропионовую кислоту, гликолевую кислоту, пировиноградную кислоту, щавелевую кислоту, яблочную кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, малеиновую кислоту, фумаровую кислоту, винную кислоту, лимонную кислоту, бензойную кислоту, коричную кислоту, миндальную кислоту, метансульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, р-толуолсульфоновую кислоту, салициловую кислоту и т.п., так и неорганические кислоты, например, хлористо-водородную кислоту, бромисто-водородную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, фосфорную кислоту и т.п. Соль, полученная добавлением кислоты, может быть снова превращена в свободное основание при обработке подходящим основанием. Особенно предпочтительными солями активных агентов, полученными добавлением кислоты, в данном контексте являются галиды, такие, которые могут быть получены при использовании хлористо-водородной и бромисто-водородной кислот. Напротив, получение основных солей пептидов или миметиков проводят аналогичным образом с использованием фармацевтически приемлемого основания, такого как гидроксид натрия, гидроксид калия, гидроксидаммония, гидроксид кальция, триметиламин и т.п.

Особенно предпочтительные основные соли включают в себя соли щелочных металлов, например, соль натрия, а также соли меди.

Получение сложных эфиров, как правило, включает в себя функционализацию гидроксильных и/или карбоксильных групп, которые могут присутствовать в молекулярной структуре лекарственного вещества. Сложные эфиры обычно представляют собой ацилзамещенные производные свободных спиртовых групп, т.е. структуры, производные от карбоновых кислот формулы RCOOH, где R - алкил и предпочтительно низший алкил. Сложные эфиры, если это желательно, могут быть снова превращены в свободные кислоты посредством традиционных процедур гидрогенолиза или гидролиза.

Амиды и пролекарства также могут быть приготовлены с использованием методик, известных компетентным специалистам в данной области или описанных в соответствующей литературе. Например, амиды можно получить из сложных эфиров, используя подходящие реагенты-амины, или они могут быть получены из ангидрида или кислого хлорида при реакции с аммиаком или амином низшего алкила. Пролекарства, как правило, готовят посредством ковалентного присоединения молекулы, которое приводит к образованию соединения, являющегося терапевтически неактивным до его модификации в метаболической системе субъекта.

Пептиды или миметики, идентифицированные в данном контексте, используют для парентерального, наружного, перорального, назального (или иначе ингаляционного), ректального или местного введения, такого как с помощью аэрозоля или чрескожного, с целью профилактического и/или терапевтического лечения атеросклероза и/или его симптомов. Фармацевтические композиции могут применяться в множестве унифицированных лекарственных форм в зависимости от способа введения. Подходящие унифицированные лекарственные формы включают в себя, без ограничения перечисленным, порошки, таблетки, пилюли, капсулы, лепешки, суппозитории, пластыри, назальные спреи, инъекционные препараты, имплантационные препараты с задержанным выходом, липидные комплексы и т.п.

Пептиды и/или миметики пептидов, соответствующие данному изобретению, обычно комбинируют с фармацевтически приемлемым носителем (наполнителем) для образования фармакологической компо-

зиции. Фармацевтически приемлемые носители могут содержать по крайней мере одно физиологически приемлемое соединение, действие которого заключается, например, в стабилизации композиции или усилении или снижении всасывания активного агента(ов). Физиологически приемлемые соединения могут включать, например, углеводы, такие как глюкоза, сахароза или декстраны, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или глутатион, хелатирующие агенты, низкомолекулярные белки, агенты, усиливающие защиту и всасывание, такие как липиды, композиции, которые снижают клиренс или гидролиз активных агентов, или наполнители или другие стабилизаторы и/или буферы.

Другие физиологически приемлемые соединения включают в себя увлажняющие агенты, эмульгаторы, диспергирующие агенты или консерванты, которые в особенности эффективны для предупреждения роста микроорганизмов. Различные консерванты хорошо известны и включают в себя, например, фенол и аскорбиновую кислоту. Компетентный специалист в данной области должен понимать, что выбор фармацевтически приемлемого носителя(ей), включая физиологически приемлемое соединение, зависит, например, от способа введения активного агента(ов) и от специфических физико-химических характеристик активного агента(ов).

Наполнители предпочтительно стерильны и, как правило, не содержат нежелательный материал. Данные композиции можно стерилизовать с помощью обычных хорошо известных способов.

При терапевтическом применении композиции, соответствующие данному изобретению, вводят больному, страдающему по крайней мере от одного симптома атеросклероза или с риском развития атеросклероза, в количестве, достаточном для лечения или, по меньшей мере, частичного предупреждения или остановки развития заболевания и/или его осложнений. Количество, адекватное для осуществления этого, определяют, как "терапевтически эффективную дозу". Количества, эффективные для данного применения, будут зависеть от тяжести заболевания и общего состояния здоровья больного. Может быть проведено одно или множество введений композиций в зависимости от дозы и частоты, необходимых для больного или переносимых им. В любом случае композиция должна обеспечивать достаточное количество активных агентов препаратов, соответствующих данному изобретению, для эффективного лечения (облегчения по крайней мере одного симптома) больного.

Концентрация пептида или миметика может широко варьировать и будет выбрана в основном на базе объемов жидкостей, вязкостей, массы тела и т.п. в соответствии с определенным избранным способом введения и нуждами больного. Однако концентрации, как правило, будут выбраны, чтобы обеспечить дозировки, находящиеся в интервале от приблизительно 0,1 или 1 мг/кг/сутки до приблизительно 50 мг/кг/сутки или несколько выше. Обычные дозировки находятся в интервале от приблизительно 3 мг/кг/сутки до приблизительно 3,5 мг/кг/сутки, предпочтительно от приблизительно 3,5 мг/кг/сутки до приблизительно 7,2 мг/кг/сутки, более предпочтительно от приблизительно 7,2 мг/кг/сутки до приблизительно 11,0 мг/кг/сутки и наиболее предпочтительно от приблизительно 11,0 мг/кг/сутки до приблизительно 15,0 мг/кг/сутки. В ряде предпочтительных вариантов осуществления дозировки находятся в интервале от приблизительно 10 мг/кг/сутки до приблизительно 50 мг/кг/сутки. Будет понятно, что данные дозировки могут варьировать с целью оптимизации терапевтической схемы для определенного субъекта или группы субъектов.

В ряде предпочтительных вариантов осуществления пептиды или миметики пептидов, соответствующие данному изобретению, вводят перорально (например, в виде таблеток) или в виде инъекций в соответствии со стандартными способами, хорошо известными компетентным специалистам в данной области. В других предпочтительных вариантах осуществления пептиды могут также доставляться через кожу с использованием принятых чрескожных систем доставки лекарственных веществ, т.е. чрескожных "пластырей", в которых активный агент(ы) обычно содержится в ламинированной структуре, служащей устройством для доставки лекарственного вещества, которое следует прикреплять к коже. В данной структуре лекарственная композиция обычно содержится в слое или "резервуаре", лежащем под последним снизу слоем. Будет понятно, что термин "резервуар" в данном контексте относится к количеству "активного ингредиента(ов)", которое в конечном счете имеется для доставки на поверхность кожи. Так, например, "резервуар" может включать активный ингредиент(ы) в клее на заднем слое пластыря или в любом из множества различных препаратов основы, известных компетентным специалистам в данной области. Пластырь может содержать один резервуар или он может содержать множество резервуаров.

В одном из вариантов осуществления резервуар содержит полимерную основу из фармацевтически приемлемого для контактирования с кожей липкого материала, который служит для прикрепления системы к коже во время доставки лекарственного вещества. Примеры пригодных для контактирования с кожей липких материалов включают в себя, без ограничения перечисленным, полиэтилены, полисилоксаны, полиизобутилены, полиакрилаты, полиуретаны и т.п. Альтернативно содержащий лекарственное вещество резервуар и контактирующий с кожей клей присутствуют в виде индивидуальных отдельных слоев, при этом клей лежит под резервуаром, который в данном случае может представлять собой либо полимерную основу, как описано выше, либо может быть жидким или гидрогелевым резервуаром, либо может принимать какую-нибудь иную форму. Слой основы данных ламинатов, который служит верхней поверхностью устройства, предпочтительно действует как основной структурный элемент "пластыря" и в значительной степени обеспечивает гибкость устройства. Материал, выбранный для слоя основы, пред-

почтительно является практически непроницаемым для активного агента(ов) и любых других присутствующих материалов.

Другие предпочтительные препараты для наружной доставки лекарственного вещества включают в себя, без ограничения перечисленным, мази и кремы. Мази представляют собой полутвердые препараты, основой которых, как правило, является вазелин или другие производные нефти. Кремы, содержащие выбранный активный агент, обычно представляют собой вязкие жидкие или полутвердые эмульсии, часто либо типа масло в воде, либо типа вода в масле. Основы кремов обычно смываются водой и содержат масляную фазу, эмульгатор и водную фазу. Масляная фаза, иногда называемая также "внутренней" фазой, в основном состоит из вазелина и жирного спирта, такого как цетиловый или стеариловый спирт; водная фаза обыкновенно, хотя не обязательно, превышает масляную фазу по объему и обычно содержит влагоудерживающее вещество. Эмульгатор в составе крема в основном представлен неионным, анионным, катионным или амфотерным поверхностно-активным веществом. Как это будет понятно компетентным специалистам в данной области, следует использовать специальную основу мази или крема, которая будет обеспечивать оптимальную доставку лекарственного вещества. Как и другие носители или средства переноса, основа мази должна быть инертной, стабильной, нераздражающей и несенсибилизирующей.

В отличие от типичных пептидных препаратов, пептиды, соответствующие данному изобретению, содержащие D-формы аминокислот, можно вводить даже перорально без защиты от протеолиза желудочной кислотой и т.п. Тем не менее, в ряде вариантов осуществления доставка пептида может быть повышена за счет применения защитных наполнителей. Обычно это осуществляют либо путем комплексования полипептида с композицией, чтобы сделать его устойчивым к кислотному и ферментативному гидролизу, либо путем упаковки полипептида в соответствующий устойчивый носитель, такой как липосома. Средства защиты полипептидов для пероральной доставки хорошо известны в уровне техники (см., например, патент США 5391377, в котором описаны липидные композиции для пероральной доставки терапевтических агентов).

Повышенная продолжительность полужизни в сыворотке может быть достигнута за счет использования систем "упаковки" белков с задержанным выходом. Данные системы с задержанным выходом хорошо известны компетентным специалистам в данной области. В одном предпочтительном варианте осуществления представлена система доставки для белков и пептидов на основе биodeградируемых микросфер ProLease (см. статьи Tracy, *Biotechnol. Prog.*, т. 14, стр. 108, (1998); Johnson и соавт., *Nature Med.*, т. 2, стр. 795, (1996); Herbert и соавт., *Pharmaceut. Res.*, т. 15, стр. 357, (1998)) в виде сухого порошка, состоящего из биodeградируемых полимерных микросфер, содержащих белок в полимерной основе. Система может быть составлена из сухого препарата, содержащего или не содержащего другие агенты.

Способ получения микросфер ProLease специально разработан для достижения высокой эффективности инкапсуляции белка при поддержании целостности белка. Способ состоит из (i) приготовления лиофилизированных белковых частиц из общего объема белка путем распылительной сушки с вымораживанием раствора лекарственного вещества без стабилизирующих наполнителей, (ii) приготовления суспензии лекарственного вещества и полимера с последующей обработкой ультразвуком или гомогенизацией, с целью уменьшения размера частиц лекарственного вещества, (iii) получения замороженных микросфер из лекарственного вещества и полимера путем разбрызгивания в жидком азоте, (iv) экстракции растворителя полимера этанолом и (v) фильтрации и вакуумной сушки, с целью получения конечного продукта в виде сухого порошка. Полученный в результате порошок содержит белок в твердой форме, который гомогенно и жестко диспергирован в пористых полимерных частицах. Полимер, который наиболее часто используют в данном процессе, поли(лактид-согликолид) (PLG), является как биосовместимым, так и биodeградируемым.

Инкапсуляция может достигаться при низких температурах (например, при -40°C). При инкапсуляции белок поддерживают в твердом состоянии в отсутствие воды, минимизируя таким образом индуцируемую водой конформационную мобильность белка, препятствуя реакциям деградации белка, которые включают в себя воду в качестве реагента, и позволяя избежать образования границ разделов органических веществ и воды, на которых может происходить денатурация белков. В предпочтительном процессе используют растворители, в которых не растворимо большинство белков, что приводит таким образом к высокой эффективности инкапсуляции (например, больше чем 95%).

В другом варианте осуществления по крайней мере один компонент раствора может быть представлен в виде "концентрата", например, в контейнере для хранения (например, в заранее отмеренном объеме) в готовом для разведения виде или в растворимой капсуле, готовой для введения в объем воды.

Вышеописанные препараты и способы применения предназначены для иллюстрации, а не ограничения. Следует понимать, что при использовании представленного в данном контексте описания можно легко изобрести другие подходящие препараты и способы применения.

VII. Препараты на основе липидов.

В ряде вариантов осуществления пептиды, соответствующие данному изобретению, вводят в сочетании с одним или более липидов. Липиды могут быть приготовлены как наполнитель для защиты и/или усиления транспорта/поглощения пептидов или их можно вводить отдельно.

Вне связи с определенной теорией в данном изобретении было обнаружено, что введение (например, пероральное введение) некоторых фосфолипидов может значительно повысить соотношения HDL/LDL. Кроме того, полагают, что транспорт некоторых фосфолипидов средней длины осуществляется процессом, отличным от процесса, участвующего в основном транспорте липидов. Так, совместное введение некоторых фосфолипидов средней длины с пептидами, соответствующими данному изобретению, несет ряд преимуществ: они защищают фосфолипиды от разложения или гидролиза, они улучшают всасывание пептидов и они улучшают соотношения HDL/LDL.

Липиды могут быть сформированы в виде липосом, которые инкапсулируют полипептиды, соответствующие данному изобретению, и/или они могут быть просто комплексированы/смешаны с полипептидами. Способы получения липосом и инкапсуляции реагентов хорошо известны компетентным специалистам в данной области (см., например, статьи Martin и Papahadjopoulos, J. Biol. Chem., 257:286-288, (1982); Papahadjopoulos и соавт., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:11460-11464, (1991); Huang и соавт., Cancer Res., 52:6774-6781, (1992); Lasic и соавт., FEBS Lett., 312:255-258, (1992) и т.п.).

Предпочтительные для применения в данных способах фосфолипиды содержат жирные кислоты длиной от приблизительно 4 атомов углерода до приблизительно 24 атомов углерода в положениях sn-1 и sn-2. В ряде предпочтительных вариантов осуществления жирные кислоты являются насыщенными. В других предпочтительных вариантах осуществления жирные кислоты могут быть ненасыщенными. Различные предпочтительные жирные кислоты представлены в табл. 2.

Таблица 2

Предпочтительные жирные кислоты в положении sn-1 и/или sn-2 предпочтительных фосфолипидов для введения D-полипептидов

Но. атома углерода	Принятое название	Название в системе IUPAC*
3:0	Пропионоил	Триановая
4:0	Бутаноил	Тетрановая
5:0	Пентаноил	Пентановая
6:0	Капроил	Гексановая
7:0	Гептаноил	Гептановая
8:0	Каприлоил	Октановая
9:0	Нонаноил	Нонановая
10:0	Каприл	Декановая
11:0	Ундеканоил	Ундекановая
12:0	Лауроил	Додекановая
13:0	Тридеканоил	Тридекановая
14:0	Миристоил	Тетрадекановая
15:0	Пентадеканоил	Пентадекановая
16:0	Пальмитоил	Гексадекановая
17:0	Гептадеканоил	Гептадекановая
18:0	Среароил	Октадекановая
19:0	Нонадеканоил	Нонадекановая
20:0	Арахидоил	Эйкозановая
21:0	Хенайкозаноил	Хенайкозановая
22:0	Бегеноил	Докозановая
23:0	Труцизаноил	Трокозановая
24:0	Лигноцериол	Тетракозановая
14:1	Миристолеоил (9-цис)	
14:1	Миристеаидоил (9-транс)	
16:1	Пальмитолеоил (9-цис)	
16:1	Пальмителаидоил (9-транс)	

*IUPAC - Международный союз по теоретической и прикладной химии

Жирные кислоты в данных положениях могут быть одинаковыми или различными. Особенно предпочтительные фосфолипиды содержат фосфорилхолин в положении sn-3.

VIII. Дополнительные фармакологически активные агенты.

Дополнительные фармакологически активные агенты могут доставляться вместе с основными активными агентами, например, пептидами, соответствующими данному изобретению. В одном варианте осуществления данные агенты включают в себя, без ограничения перечисленным, агенты, которые снижают риск атеросклеротических событий и/или их осложнения. Данные агенты включают в себя, без ограничения перечисленным, β -блокаторы, комбинации β -блокаторов и тиазидных диуретиков, статины, аспирин, ингибиторы АПФ (ангиотензин-превращающего фермента), ингибиторы рецепторов АПФ (ARB) и т.п.

Подходящие β -блокаторы включают в себя, без ограничения перечисленным, кардиоселективные препараты (селективные β_1 -блокаторы), например, ацебутолол (СектралTM), атенолол (ТенорминTM), бетаксолол (КерлонTM), бисопролол (ЦебетаTM), метопролол (ЛопрессорTM) и т.п. Подходящие неселективные блокаторы (блокируют в равной степени β_1 и β_2) включают в себя, без ограничения перечисленным,

картеолол (Картрол™), надолол (Коргард™), пенбутолол (Леватол™), пиндолол (Вискен™), пропранолол (Индерал™), тимолол (Блокадрен™), лабеталол (Нормодин™, Трандат™) и т.п.

Подходящие комбинации β -блокаторов с тиазидными диуретиками включают в себя, без ограничения перечисленным, Лопрессор НСТ, ZIAC, Теноретик, Корзид, Тимолид, Индерал LA 40/25, Индерид, Нормозид и т.п.

Подходящие статины включают в себя, без ограничения перечисленным, правастатин (Правахол/Bristol-Myers Squibb), симвастатин (Зокор/Merck), ловастатин (Мевакор/Merck), и т.п.

Подходящие ингибиторы АПФ включают в себя, без ограничения перечисленным, каптоприл (например, Капотен™, производимый Squibb), беназеприл (например, Лотензин™, производимый Novartis), эналаприл (например, Вазотек™, производимый Merck), фосиноприл (например, Моноприл™, производимый Bristol-Myers), лизиноприл (например, Принивил™, производимый Merck или Цестрил™, производимый Astra-Zeneca), хинаприл (например, Аккуприл™, производимый Parke-Davis), рамиприл (например, Альтаце™, производимый Hoechst Marion Roussel, King Pharmaceuticals), имидаприл, периндоприл, эрбумин (например, Ацеон™, производимый Rhone-Polenc Roger), трандолаприл (например, Мавик™, производимый Knoll Pharmaceuticals) и т.п. Подходящие ARB(блокаторы рецептора АПФ) включают в себя, без ограничения перечисленным, лосартан (например, Козаар™, производимый Merck), ирбесартан (например, Авапро™, производимый Sanofi), кандесартан (например, Атаканд™, производимый Astra Merck), валсартан (например, Диован™, производимый Novartis) и т.п.

IX. Наборы для облегчения по крайней мере одного симптома атеросклероза.

В другом варианте осуществления данного изобретения представлены наборы для облегчения по крайней мере одного симптома атеросклероза или для профилактического лечения субъекта (человека или животного) с риском развития атеросклероза. Наборы предпочтительно включают в себя контейнер, содержащий по крайней мере один пептид или миметик пептидов, соответствующих данному изобретению. Пептид или миметик пептида может быть представлен в унифицированном лекарственном препарате (например, суппозитории, таблетке, капсуле, пластыре и т.п.) и/или необязательно может быть в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемых наполнителей.

Набор, кроме того, может необязательно содержать по крайней мере один другой агент, используемый при лечении сердечных заболеваний и/или атеросклероза. Данные агенты включают в себя, без ограничения перечисленным, β -блокаторы, вазодилататоры, аспирин, статины, ингибиторы АПФ или ингибиторы рецепторов АПФ (ARB) и т.п., например, как описано выше.

Кроме того, наборы необязательно включают в себя маркировку и/или инструкционные материалы, в которых представлены указания (т.е. протоколы) по реализации способов или применению терапевтических или профилактических препаратов, соответствующих данному изобретению. В предпочтительных инструкционных материалах описано применение по крайней мере одного полипептида, соответствующего данному изобретению, с целью смягчения по крайней мере одного симптома атеросклероза и/или для предупреждения появления или усиления по крайней мере одного такого симптома у субъекта с риском развития атеросклероза. В инструкционных материалах также могут быть необязательно описаны предпочтительные дозировки/схемы лечения, показания счетчика и т.п.

Хотя инструкционные материалы, как правило, содержат письменные или печатные материалы, они не ограничены этим. Данным изобретением предусматривается любая среда, способная хранить данные инструкции и передавать их конечному пользователю. Данные среды включают в себя, без ограничения перечисленным, электронные среды для хранения информации (например, магнитные диски, магнитную ленту, картриджи, чипы), оптические среды (например, CD ROM) и т.п. Данные среды могут включать адреса сайтов в Интернете, которые представляют такие инструкционные материалы.

Примеры

Следующие примеры представляют для иллюстрации, но не для ограничения заявленного объема изобретения.

Пример 1.

Показано, что несколько синтетических аналогов пептидов класса А имитируют многие свойства человеческого аро A-I *in vitro*. В данном примере новый пептид (5F) с повышенной амфипатией вводят путем внутрибрюшинной инъекции в дозе 20 мкг/сутки в течение 16 недель мышам C57BL/6J, которые получают атерогенный корм. Другим мышам делают инъекции мышиногo аро A-I (MoAI) (50 мкг/сутки) или забуференного фосфатом солевого раствора (PBS) в качестве контроля. Уровни общего холестерина в плазме и профили липопротеинов различаются незначительно между леченой группой и контрольными группами за исключением того, что у мышей, получающих 5F или MoAI, наблюдают пониженный уровень липопротеина высокой плотности (HDL)-холестерина при вычислении процента общего холестерина. Не наблюдают никакой токсичности или образования антител против инъектированных материалов. LDL, взятый у животных, которым делают инъекции 5F, и внесенный в человеческие клетки артериальной стенки *in vitro*, приводит к образованию меньшего количества гидропероксидов липидов и более низкой индуцированной LDL хемотактической активности, чем LDL, взятый от контролей. Кроме того, HDL, взятый у мышей, которым делают инъекции 5F, и внесенный в человеческие клетки артериальной

стенки *in vitro* вместе с человеческим LDL, приводит к значительному снижению образования гидропероксидов липидов и значительному уменьшению индуцированной LDL хемотактической активности моноцитов. У мышей, получающих пептид 5F, отмечают значительное уменьшение площади атеросклеротического повреждения по сравнению с мышами, получающими PBS. Площадь повреждения у мышей, получающих MoAI, аналогична площади повреждения у мышей, которым делают инъекцию PBS. Делают заключение о том, что 5F может обладать активностью в плане профилактики и лечения атеросклероза.

Материалы и способы.

Пептиды.

Пептид 5F (Ac-18A [Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu Phe Phe]-NH₂) синтезируют способом твердофазного синтеза пептидов (см., например, статьи Anantharamaiah и Garber, *Meth. Enzymol.*, 263: 267-282, (1996); Palgunachari и соавт., *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology*, 16:328-338, (1996)). Степень чистоты синтетического пептида определяют с помощью аналитической ВЭЖХ и электроспреей масс-спектрометрии. Пептид диализуют против дистиллированной воды и лиофилизируют перед использованием.

MoAI выделяют из плазмы мышей C57BL/6J (плазму в EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) приобретают в Harlan Bioproducts for Science, Indianapolis, IN). MoAI выделяют, используя комбинацию гель-фильтрации и колоночной хроматографии с обращенной фазой. Вкратце, удельную массу плазмы подводят до 1,21 г/мл добавлением KBr и центрифугируют при 50000 об./мин в течение 24 ч при 4°C (ротатор Ti70, Beckman, Fullerton, CA). Верхнюю фракцию собирают, диализуют против воды для удаления KBr, лиофилизируют и делипидируют. Осадок растворяют в растворе Gn:DTT:Трис (3 М гуанидин HCl, 1 мМ дитиотреитол и 10 мМ Трис; pH=8,0), затем диализуют против того же раствора, используя диализные трубки, отсекающие вещества молекулярной массы 12000, с целью удаления из образца большей части аро А-II и аполипопротеинов С. Затем образец диализуют против воды и лиофилизируют. Осадок растворяют в свежем растворе Gn:DTT:Трис и выделяют белки с помощью гель-фильтрации и колоночной хроматографии, используя колонку XK26/100 (2,6 X 100 см), заполненную насыпной фазой Superose 12 (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), уравновешенную раствором Gn:DTT:Трис. Скорость потока составляет 0,5 мл/мин, собирают фракции по 2,5 мл. Фракции, соответствующие пику аро А-I, анализируют с использованием SDS-PAGE (электрофореза в полиакриламидном геле с использованием додецилсульфата натрия) и затем очищают препаративной ВЭЖХ с C-18 обращенной фазой (см. статью Anantharamaiah и Garber, *Meth. Enzymol.*, 263:267-282, (1996)).

Мыши.

Все эксперименты проводят с использованием самок мышей C57BL/6J (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Мышей приобретают в возрасте шести недель, и исследования с различными диетами начинают проводить с мышами в возрасте восьми недель. В исследованиях метаболизма используют мышей с массой тела 20-22 г. Все исследования на животных заранее рецензируют и утверждают в Институциональном Комитете по защите и использованию животных Алабамского университета в Бирмингеме.

Исследования кинетики.

Пептид 5F, MoAI и человеческий аро А-I метят ¹²⁵I способом, предложенным Bilheimer и соавт., *Biochim. Biophys. Acta*, 260:212-221, (1972). Мыши получают модифицированный атерогенный корм Thomas-Hartroft (#TD88051; Teklad, Madison, WI) в течение четырех недель, в течение которых им начинают делать внутривенные инъекции пептида или белка, растворенного в 200 мкл забуференного фосфатом солевого раствора (PBS). Животным инъекционно вводят MoAI или человеческий аро А-I в дозе 50 мкг/животное; животные, которым инъектируют 5F, получают дозу 20 мкг. Для кинетических исследований животных не иммобилизуют, образцы крови берут из ретроорбитального синуса при анестезии ксилазином:кетаминном на 15, 30 и 45 мин и 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8, 12 и 24 ч после инъекции. От каждого животного получают три образца крови в различные точки времени (все из ретроорбитального синуса при чередовании глаз) и в каждой точке времени отбирают по меньшей мере три образца (у разных животных). Образцы отбирают в гепаринизированные капиллярные трубки, затем помещают в пробирки для микроцентрифуги, плазму отделяют центрифугированием. Повторные аликвоты по 10 мкл каждого образца берут для определения радиоактивности с использованием счетчика γ-излучения (Cobra; Packard Instruments, Downers Grove, IL) в течение 10 мин/образец. Общий объем плазмы рассчитывают как 4,2% от массы тела. Каждый образец выражают как процент инъектированного СРМ в общем объеме плазмы. Свободный ¹²⁵I определяют осаждением трихлоруксусной кислотой (ТСА) (1 мл 10% ТСА/10 мкл образца плазмы). Подбор кривой в соответствии с кинетической моделью проводят при использовании всех точек данных, а не средних значений по каждой временной точке (см. программу PKAnalyst, MicroMath Scientific Software, Salt Lake City, UT).

Протокол инъекций и сбор образцов для исследования повреждений.

Мышей приобретают в возрасте шести недель и рандомизированным образом распределяют в группы по 20 животных, за исключением группы отрицательного контроля из 10 животных, которая не получает лечения и которой дают стандартный смешанный корм для грызунов. В возрасте восьми недель группы, предназначенные для лечения, переводят на модифицированный атерогенный корм Thomas-

Hartroft (#TD88051; Teklad, Madison, WI) и начинают инъекции. Корм хранят при 4°C и используют не больше трех месяцев после изготовления, чтобы снизить до минимума окисление липидов. Животным делают внутрибрюшинные инъекции ежедневно в течение 16 недель, включая выходные дни и праздники. Двадцати мышам в каждой группе ежедневно инъекционно вводят 200 мкл PBS (в качестве положительных контролей) или 20 мкг 5F в 200 мкл PBS или 50 мкг MoAI в 200 мкл PBS.

Леофилизированный пептид 5F готовят во флаконах, при этом каждый флакон содержит пептид в количестве, достаточном для инъекции на один день. Пептид 5F леофилизируют в PBS и растворяют в автоклавированной воде Milli-Q (Millipore Corp., Bedford, MA) в день инъекции. Объем инъекции для всех групп поддерживают на уровне 200 мкл/мышь/сутки.

Образцы крови берут под анестезией при кровотечении из ретроорбитального синуса при начале исследований (перед введением корма) и во время забора органов. В конце исследования (16 неделя) при последнем кровотечении вырезают сердце и печень. Сердца хранят в 0,9% солевом растворе в течение 1 ч для удаления крови и обеспечения релаксации сердечной мышцы. Затем их фиксируют в забуференном фосфатом 4% формальдегиде в течение по меньшей мере одной недели до получения срезов. Печени удаляют и взвешивают.

Гистологическое определение.

Гистологические определения проводят в соответствии со способом, предложенным Paigen и соавт. (см. статью Paigen и соавт., *Arteriosclerosis*, 10: 316-323, (1990)) с некоторыми модификациями. Вкратце, сердца фиксируют в течение по меньшей мере одной недели в растворе формальдегида, забуференного фосфатом. После удаления нижних 2/3 сердца оставшуюся ткань замораживают в среде OCT (Tissue-Tek, Miles Inc., Elkhart, IN) и делают срезы в криостате при -20°C. Последовательность срезов толщиной 20 мкм хранят на предметных стеклах и наблюдают начало корня аорты. Затем отбирают срезы дополнительных 600 мкм или до округления поперечного среза аорты и до того уровня, пока не исчезнут створки клапанов. Препараты на стеклах окрашивают масляным красным O и контрастно окрашивают гематоксилином. Окрашенные площади поперечных срезов поражений измеряют на последовательных препаратах на предметных стеклах, отдаленных друг от друга на 80 мкм путем анализа изображения (SigmaScan Pro, SPSS Scientific, Chicago, IL) и определяют среднюю площадь поражения для каждого синуса аорты на длине 400 мкм (пять препаратов), получая максимальную среднюю площадь поражения.

Кокультуры. Выделение моноцитов. Выделение липопротеинов.

Определение гидропероксидов липидов и хемотактической активности моноцитов

Кокультуры человеческих клеток артериальной стенки, выделение моноцитов, выделение липопротеинов ультрацентрифугированием из плазмы здоровых людей-доноров или с помощью FPLC из мышинной плазмы и определение гидропероксидов липидов и хемотактической активности моноцитов проводят согласно стандартным способам. Участие всех людей проходит их информированного согласия, утвержденного Комитетом защиты человека Калифорнийского Университета в Лос-Анжелесе (UCLA) (UCLA Human Subjects Protection Committee). Протокол тестирования мышинных липопротеинов в кокультуре осуществляют следующим образом. Вкратце, LDL и HDL выделяют с помощью FPLC из мышинной плазмы, выделенной у мышей, получающих атерогенный корм и инъекции носителя (PBS) или пептида 5F в дозе 20 мкг/мышь/день. Кокультуры обрабатывают человеческим LDL в концентрации 200 мкг/мл белка LDL или мышинным LDL в концентрации 200 мкг/мл, или человеческим LDL в концентрации 200 мкг/мл + человеческим HDL в концентрации 350 мкг/мл белка HDL, или мышинным HDL в концентрации 300 мкг/мл, или мышинным HDL в виде монокомпонента в концентрации 300 мкг/мл. Кокультуры инкубируют с вышеуказанными добавками или без добавок в течение 8 ч при 37°C в присутствии 10% сыворотки, дефицитной по липопротеину (LPDS). Супернатанты собирают и анализируют на эквиваленты гидропероксидов липидов по Auerbach. Затем кокультуры промывают и инкубируют в свежей среде для культивирования без сыворотки или LPDS в течение дополнительных 8 ч. Кондиционированную среду собирают и анализируют на хемотактическую активность моноцитов.

Химические и аналитические способы - профили липопротеинов холестерина, полученные на колонках (CLiP)-

Профили липопротеинов холестерина плазмы измеряют, используя недавно разработанный способ CLIP (см. статью Garber и соавт., *J. Lipid Res.*, 41:1020-1026, (2000)). Вкратце, анализируют 5-10 мкл плазмы, используя одну колонку Superose 6 (Pharmacia, Piscataway NJ). Сразу после колонки реагент на холестерин вводят в Т-образную емкость для смешивания, и смесь элюента и реагента входит в реакционный змеевик, расположенный после колонки. Содержание холестерина в смеси элюента определяют спектрофотометрически при длине волны 500 нм и данные для построения точек вводят в компьютер. Полученные в результате профили разделяют по пикам компонентов и анализируют по относительной площади, используя программу PeakFit (SPSS Science, Chicago, IL); абсолютные величины холестерина для общего содержания холестерина и пика каждого компонента определяют путем сравнения с контрольным образцом с известными величинами. В ряде случаев фракции собирают, чтобы определить распределение радиоактивности. Способ CLiP позволяет анализировать образцы, полученные от отдельных мышей, избегая использования объединенных образцов.

Определение антител

[148] Для определения, вызывают ли ежедневные инъекции пептидов иммунный ответ у мышей, проводят не прямое титрование способом ELISA (см. статью Engvall, Meth. Enzymol., 70:419-439, (1980)) плазмы, взятой у мышей во время забора органов (после шестнадцати недель ежедневных инъекций). Платы покрывают инъецируемыми пептидами или MoAI (10 мкг/мл). Платы инкубируют в течение ночи. После тщательного промывания забуференным боратом соевым раствором (pH 8,2), содержащим 0,05% Tween 20, и блокирования буфером (0,1% желатина и 0,1% BSA в боратном буфере) в течение 1 ч, образцы по 200 мкл разведенной мышинной плазмы (разведение 1:100) серийно разводят 1:1 забуференным боратом соевым раствором. Затем биотинилированное козье антитело против мышинного IgG (0,1 мкг/мл) вносят в лунки и обрабатывают платы SA-HRP (комплексом стептавидина и пероксидазой корня хрена) в течение часа и проявляют с помощью ABTS пероксидазы в качестве субстрата. Платы инкубируют в течение ночи при комнатной температуре после каждого добавления антигена/антитела и тщательно промывают забуференным боратом соевым раствором (pH 8,2), содержащим 0,05% Tween 20, и блокируют буфером (0,1% желатина и 0,1% BSA в боратном буфере) в течение 1 ч перед добавлением следующего компонента.

Статистические методы

Группы лечения сравнивают с помощью двустороннего критерия Стьюдента или одностороннего анализа дисперсии (при нормальном распределении данных) или с помощью одностороннего анализа дисперсии в классах (SigmaStat; SPSS Science, Chicago, IL). Кинетику метаболизма пептида или белка анализируют путем подбора однокамерной кинетической модели первого порядка, допускающей неравные скорости входа и выхода (PKAnalyst; MicroMath Scientific Software, Salt Lake City, UT).

Результаты

Кинетические исследования.

Кинетика клиренса пептида 5F человеческого и мышинного аро А-I из мышинной плазмы после внутривенной инъекции суммирована в табл. 3.

Таблица 3

Краткие итоги кинетических экспериментов на основании обработанных данных

Инъецированный материал	T1/2 (час.)	Время (час.)/макс. CPM	Макс. % в плазме	r ²
Человеческий аро А-I (50 мкг/мышь)	15,6	3,61	23,7	0,947
Мышинный аро А-I (50 мкг)	15,7	1,74	13,5	0,928
5F (20 мкг)	6,22	2,36	14,29	0,895

Приведенные данные представляют результаты, полученные при обработке данных в соответствии с однокамерной кинетической моделью первого порядка, допускающей неравные скорости входа и выхода (PKAnalyst; MicroMath Scientific Software, Salt Lake City, UT). Сокращения: T 1/2 - половина периода клиренса из плазмы; Макс. % в плазме - процент инъецированной дозы, обнаруженный в общей плазме на уровне пиков; r² - соответствие статистических данных кинетической модели.

Клиренс человеческого и мышинного аро А-I сильно пролонгирован по сравнению с пептидом 5F. Человеческий аро А-I и 5F имеют более длительное время выхода на пик в плазме, чем мышинный аро А-I, хотя уровни достигнутых пиков в основном близки (пик человеческого аро А-I достигает более высоких уровней, чем другие материалы). Анализ образцов плазмы с помощью колоночной хроматографии демонстрирует, что пептид 5F и аро А-I (как человеческие, так и мышинные) связываются с липопротеинами плазмы, особенно с частицами в области величины HDL (фиг. 6). Соотношение HDL:VLDL по радиоактивности пептидов через 1,5 ч после инъекции 5F составляет 4,19±0,58 (n = 3, p<0,05). Аналогичные результаты обнаруживают через 5 ч после инъекции 5F (6,44±1,10, p<0,02). Инъецированный пептид сначала содержит меньше 3% свободного ¹²⁵I по данным осаждения ТСА. Однако через 1,5 ч после инъекции радиоактивность свободного ¹²⁵I в плазме, выраженная как процент от общей элюированной радиоактивности, значительно повышается для 5F, составляя 26,9±9,4%, и к 5 ч составляет 34,4±4,8%, отражая ожидаемый клиренс липопротеинов и связанных с липопротеинами пептидов. Скорость увеличения радиоактивности, обусловленной свободным иодом, от 1,5 до 5 ч меньше, чем при инъекции, что, возможно, предполагает значительную исходную деградацию пептида в брюшной полости.

Выживаемость и общая морфология при смешанном или атерогенном корме

В ходе длительных диетических исследований только три мыши погибают по невыясненным причинам. Два животных получают МоАІ и одно получает пептид 5F. Во время забора органов между группами не отмечают никаких различий в общей морфологии. У всех животных, получающих атерогенный корм, печени увеличены, но ни массы печеней, ни масса печени в процентах от массы тела не отличаются между группами (табл. 4). Все животные, получающие атерогенный корм (включая животных, которым делают инъекцию PBS), имеют более низкую массу тела, чем контрольные животные, получающие смешанный корм (см. табл. 4).

Таблица 4

Массы тела и печени после лечения			
Корм и Подгруппа	Масса тела, г	Масса печени, г	Печень/Тело, %
Смешанный	23,38 ± 0,52	0,99 ± 0,02	4,24 ± 0,04%
Атерогенный PBS (n=14)	20,55 ± 0,32*	1,60 ± 0,04	7,84 ± 0,26%
5F (n=15)	21,60 ± 0,28	1,61 ± 0,04	7,46 ± 0,23%
МоАІ (n=14)	21,16 ± 0,34	1,72 ± 0,04	8,15 ± 0,23%*

Приведенные данные представляют среднее значение ± SEM масс, полученных во время забора органов (через 16 недель лечения). Животные, находящиеся на смешанном корме, не получают инъекции. Других мышей держат на атерогенном корме, как описано в разделе Способы. Группа PBS получает ежедневные внутривентрально-брюшинные инъекции 200 мкл забуференного фосфатом солевого раствора. Группа 5F получает ежедневные внутривентрально-брюшинные инъекции 20 мкг 5F в 200 мкл PBSP и группа МоАІ ежедневно получает 50 мкг МоАІ в 200 мкл PBS.

* $p < 0,05$ в отношении 5F; двусторонний t-тест.

Антигенность.

Образцы крови, взятые в заключение 16-недельного периода инъекций, тестируют на присутствие антител против пептидов. Антитела против пептида 5F или против МоАІ не обнаружены (данные не приводят). Перекрестные эксперименты, в которых платы для проведения ELISA покрывают пептидом или белком, которые не инъецируют серии животных, приводят к результатам, в основном идентичным результатам, полученным при прямом определении присутствия антител (данные не приводят).

Характеризация липопротеина и аполипопротеина.

Значения общего холестерина и липопротеинов холестерина, определенные способом ClіP, представлены в табл. 3. Точность значения общего холестерина подтверждают путем анализа холестерина вручную (Cholesterol 1000; Sigma, St. Louis, MO) (данные не приводят). Между группами лечения не наблюдают значительной разницы в уровнях общего холестерина и липопротеиновых фракций холестерина. Однако когда липопротеиновые фракции выражают как процент от общего холестерина (см. табл. 5), HDL-холестерин составляет значительно более низкий процент в группах 5F и МоАІ по сравнению с группой PBS.

Таблица 5

Уровни общего холестерина и липопротеинов холестерина (мг/дл и процент от общего холестерина) через 16 недель получения смешанного или атерогенного корма

	VLDL	DDL+LDL	HDL	TC
Смешан- ный корм	11,66 ± 2,34 (16,61 ± 3,55%)	23,68 ± 3,51 (31,66 ± 3,61%)	37,30 ± 2,52 (51,73 ± 1,75%)	72,64 ± 5,58
Атерогенный корм				
PBS	88,36 ± 5,48 (47,26 ± 1,37%)	75,82 ± 7,64 (39,83 ± 1,34%)	24,36 ± 2,19 (12,91 ± 0,68%)	188,54 ± 14,22
5F	100,34 ± 15,72 (47,96 ± 3,26%)	83,37 ± 8,15 (42,80 ± 2,51%)	17,92 ± 2,91 (9,24 ± 1,18%)	201,63 ± 25,21
MoAI	100,08 ± 9,73 (48,23 ± 2,75%)	87,86 ± 8,34 (42,44 ± 2,46%)	19,50 ± 3,07 (9,34 ± 1,19%)	207,45 ± 16,94

Данные выражены как среднее значение мг/дл ± SEM и (в скобках) как процент от общего холестерина.

Сокращения: VLDL - липопротеин очень низкой плотности; DDL - липопротеин средней плотности; LDL - липопротеин низкой плотности; HDL - липопротеин высокой плотности; TC - общий холестерин; MoAI - мышинный аро А-I; PBS - забуференный фосфатом солевой раствор. Животные, находящиеся на смешанном корме, не получают инъекции. Других мышей держат на атерогенном корме, как описано в разделе Способы. Группа PBS получает ежедневные внутрибрюшинные инъекции 200 мкл забуференного фосфатом солевого раствора. Группа 5F получает ежедневные внутрибрюшинные инъекции 20 мкг 5F в 200 мкл PBSP и группа MoAI ежедневно получает 50 мкг MoAI в 200 мкл PBS. Число мышей, как показано в табл. 4.

* $p < 0,05$ или меньше в сравнении с PBS с помощью двустороннего t-теста.

Взаимодействие мышинных липопротеинов с человеческими клетками артериальной стенки

Недавно обнаружено, что нормальный HDL ингибирует три стадии в образовании мягко окисленного LDL. В данных исследованиях (см. одновременно рассматриваемую заявку USSN 09/541468, поданную 31 марта 2000 г.) продемонстрировано, что обработка человеческого LDL in vitro аро А-I или пептидным миметиком аро А-I (37pA) удаляет молекулы-затравки из LDL, включающие HPODE и HPETE. Данные молекулы-затравки сообщают кокультурам человеческих клеток стенок артерий способность окислять LDL и LDL способность индуцировать продукцию в клетках артериальной стенки хемотактической активности моноцитов. Продемонстрировано также, что LDL, выделенный у мышей или людей-добровольцев после инъекции/инфузии им аро А-I, является устойчивым к окислению человеческими клетками артериальной стенки и не индуцирует хемотактическую активность моноцитов в кокультурах клеток артериальной стенки. На фиг. 7 демонстрируют, что HDL, полученный в данном исследовании у мышей, получающих атерогенный корм и которым делают инъекции PBS, не подавляет окисление человеческого LDL (см. фиг. 7A) и не ингибирует индуцируемую LDL хемотактическую активность моноцитов (см. фиг. 7B) в кокультурах человеческих клеток артериальной стенки. Напротив, HDL мышей, получающих атерогенный корм и которым делают ежедневные инъекции пептида 5F, эффективен в плане подавления окисления человеческого LDL и предупреждает индуцируемую LDL хемотактическую активность моноцитов в кокультурах, как нормальный человеческий HDL. На фиг. 7 показано также, что LDL, полученный от мышей, находящихся на атерогенном корме и получающих ежедневные инъекции PBS, легче окисляется и легче индуцирует хемотактическую активность моноцитов, чем LDL, полученный от мышей, находящихся на том же корме, но которым делают ежедневную инъекцию 20 мкг пептида 5F. В клетках артериальной стенки, обработанных любым из липопротеинов, не отмечают цитотоксичность (данные не приводят). Аналогичные результаты получают в трех из трех отдельных экспериментах (данные не приводят).

Образование повреждений.

Средние поперечные площади повреждений представляют на фиг. 8. Как ожидают, в группе, получающей нормальный мышинный смешанный корм, повреждения не наблюдают (данные не представляются). Как показывают ранее (см. статью Paigen и соавт., *Arteriosclerosis*, 10:316-323, (1990)), значительные вариации площади поражения наблюдают во всех группах, получающих атерогенный корм. Однако животные, которым инъецируют 5F, имеют достоверно более низкую среднюю площадь повреждения, чем животные, которым инъецируют PBS, что показано как при анализе с использованием двустороннего t-теста ($P < 0,002$), так и при одностороннем анализе дисперсии в классах ($P < 0,001$; определено вследствие ненормального распределения средних поверхностей повреждений). Инъекция MoAI не дает разницы в площади повреждения сравнительно с инъекцией PBS, и площадь повреждения значительно больше, чем у животных, которым делают инъекцию 5F, что определяют с помощью t-теста ($p < 0,002$) и одностороннего анализа дисперсии в классах ($p < 0,001$).

Обсуждение.

Ранее показано, что синтетические пептиды, разработанные для имитации мотива амфипатической спирали класса A, способны связываться с фосфолипидами и проявляют многие биологические свойства, близкие человеческому аро A-I (3, 8, 10, 14, 15, 20). Показывают также, что при внутривенном введении данных пептидов животным они, как обнаружено, связываются с липопротеинами плазмы (11). Данное исследование предпринимают для поддержки гипотезы о том, что новый пептид 5F с теоретически повышенной аффинностью к липидам должен был бы обладать антиатерогенными свойствами.

Представленные исследования демонстрируют, что данный пептид 5F проникает в плазму после внутрибрюшинной инъекции и достигает в плазме уровней, примерно сопоставимых с MoAI, но меньших, чем у человеческого аро A-I (см. табл. 3 и фиг. 6). Полупериод плазменного клиренса 5F короче, чем у мышинового или человеческого аро A-I после внутрибрюшинной инъекции. После инъекции большую часть 5F обнаруживают в области HDL (см. фиг. 6), несмотря на то, что при атерогенном корме преобладание циркулирующего холестерина отмечают в областях VLDL, IDL и LDL.

Уровни и распределение плазменного холестерина существенно не различается в получающих инъекции группах, находящихся на атерогенном корме (см. табл. 5). Однако когда липопротеиновые фракции выражают как процент от общего холестерина (см. табл. 5), HDL-холестерин составляет значительно меньший процент в группах 5F и MoAI по сравнению с группой PBS.

Нормальный HDL ингибирует три стадии образования мягко окисленного LDL. Демонстрируют, что обработка человеческого LDL *in vitro* аро A-I или пептидным миметиком аро A-I удаляет из LDL молекулы-затравки, которые включают HPODE и HPETE. Данные молекулы-затравки сообщают кокультурам человеческих клеток артериальной стенки способность окислять LDL и LDL-способность индуцировать продукцию в клетках артериальной стенки хемотактической активности моноцитов (см. одновременно рассматриваемую заявку USSN 09/541468, поданную 31 марта 2000 г.). Продемонстрировано также, что после инъекции аро A-I мышам или инфузии человеку LDL, выделенный у мышей или людей добровольцев, является устойчивым к окислению человеческими клетками артериальной стенки и не индуцирует хемотактическую активность моноцитов в кокультурах клеток артериальной стенки. В данных исследованиях HDL от мышей, получающих атерогенный корм и которым делают инъекции PBS, не подавляет окисление человеческого LDL (см. фиг. 7A) и не ингибирует индуцируемую LDL хемотактическую активность моноцитов (см. фиг. 7B) в кокультурах человеческих клеток артериальной стенки. В противоположность этому обнаружено, что HDL мышей, получающих атерогенный корм и которым делают инъекции пептида 5F, эффективен в плане подавления окисления человеческого LDL и предупреждает индуцируемую LDL хемотактическую активность моноцитов в кокультурах, как нормальный человеческий HDL (см. фиг. 7). LDL, полученный от мышей, находящихся на атерогенном корме и получающих инъекции 5F, менее легко окисляется и хуже индуцирует хемотактическую активность моноцитов, чем LDL, полученный от мышей, находящихся на том же корме, но которым делают ежедневную инъекцию PBS (см. фиг. 7). Возможно, что 5F взаимодействует с LDL в кровотоке (либо перед, либо после связывания с HDL) и удаляет молекулы-затравки, необходимые для окисления LDL и индуцированной LDL хемотактической активности моноцитов способом, аналогичным описанному для близкого пептида 37pA *in vitro* (одновременно рассматриваемая заявка USSN 09/541468, поданная 31 марта 2000 г.).

Реакции *in vitro* человеческих клеток артериальной стенки с HDL и LDL мышей, получающих атерогенный корм и которым делают инъекцию пептида 5F, согласуется с защитным действием 5F *in vivo*. Несмотря на близкие уровни общего холестерина, LDL-холестерина, IDL+VLDL-холестерина и пониженный уровень HDL-холестерина как процента от общего холестерина, у животных, получающих атерогенный корм и инъекции 5F, число повреждений значительно меньше (см. фиг. 8). Данные результаты до некоторой степени аналогичны результатам, полученным Shah и соавт. (см. статью Shah и соавт., *Circulation*, 97:780-785, (1998)), которые обнаружили, что несмотря на наличие гиперхолестеринемии, аро A-I^{Milano} препятствует развитию атеросклеротических повреждений у аро E-дефицитных мышей.

Причина, по которой человеческий аро A-I успешно используют для предупреждения/уменьшения атеросклероза у животных (см. статью Wilson и соавт., *Arteriosclerosis*, 8:737-741 (1988); Rubin и соавт., *Nature*, 353:265-267, (1991); Paszty и соавт., *J.Clin. Invest.*, 94:899-903 (1994); Plump и соавт., *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA, 91:9607-9611 (1994); Shah и соавт., *Circulation*, 97:780-785 (1998)), но ежедневная инъекция MoAI в дозе 50 мкг в данных исследованиях не приводит к таким результатам, неясна. Показывают, что MoAI не образует такие стабильные белково-липидные комплексы, как человеческий апо A-I (см. статью Gong и соавт., *Biochim. Biophys. Acta*, 1213:335-342 (1994)). Как показывают, мышинный HDL легче денатурируется гуанидингидрохлоридом, чем человеческий HDL (см. статью Gong и соавт., *Biochim. Biophys. Acta*, 1213:335-342, (1994)), позволяя предположить, что пептиды амфипатической спирали могли бы замещать MoAI из мышинового HDL легче, чем человеческий апо A-I из человеческого HDL. Данные различия могут или не могут объяснить, почему MoAI не уменьшает в значительной мере повреждение в данном исследовании. Может также быть, что в используемых условиях требуется повышенная доза MoAI. В любом случае пептид 5F является в данных условиях высокоэффективным, а MoAI - не является.

В заключение протокола инъекций анализ плазмы ELISA показывает, что против пептида 5F не образуются антитела. Это неудивительно, поскольку показано, что связывающие липиды белки не вызывают образование антител, по-видимому, поскольку данные пептиды связывают липиды так, что эпитопы, необходимые для того, чтобы вызывать иммунный ответ, оказываются закрытыми (см. статьи Muranishi, *J. Pharm. Soc. Japan*, 117:394-404 (1997); Fricker и Drewer, *J. Peptide Sci.*, 2:195-211 (1996)).

Проведенное предварительное исследование предполагает, что трансгенные мыши, экспрессирующие пептид амфипатической спирали класса A (37pA) с теоретически более низкой аффинностью, чем у пептида, используемого в данном исследовании, могут быть устойчивыми к атеросклерозу (см. статью Garber и соавт., *Circulation*, 96:1-490 (1997)). Данное исследование предполагает, что пептид 5F, вероятно, обладает большими возможностями в плане разъяснения механизмов, участвующих в атерогенезе, и обладает также терапевтической активностью.

Пример 2. Эффективность D-пептидов.

Данный пример демонстрирует эффективность D-пептидов, соответствующих данному изобретению. Кокультуры человеческих клеток стенки аорты инкубируют со средой без добавления иных компонентов (LDL, БЕЗ КЛЕТОК или КЛЕТКИ, БЕЗ LDL), с контрольным LDL здоровых субъектов в концентрации 250 мкг/мл (LDL) и LDL + контрольный HDL здоровых субъектов в концентрации 350 мкг/мл (+HDL). Другие кокультуры инкубируют с контрольным LDL вместе с различными количествами (показанными в мкг на оси абсциссе) либо D-2F, либо L-2F (третья панель слева, 2F) или D-37pA, либо L-37pA (последняя панель справа, 37pA). Данные представляют среднее \pm SD значений, полученных на кокультурах в четырех повторностях. Все значения, полученные с HDL или добавлением пептидов, достоверно отличаются от опыта с LDL без добавления иных компонентов (первая панель слева) на уровне $p < 0,01$.

Кокультуры инкубируют в течение 4 ч при 37°C в присутствии 10% LPDS для получения мягко окисленного LDL. Затем отбрасывают супернатанты, кокультуры промывают и инкубируют со средой для культивирования, не содержащей сыворотку или LPDS, в течение дополнительных 4 ч. Кондиционированную среду собирают и анализируют на хемотактическую активность моноцитов. Как показывают, на фиг. 9, обработка LDL D-пептидами *in vitro* предупреждает их окисление клетками артериальной стенки.

На фиг. 10 демонстрируют, что введение D-пептидов мышам делает их красные кровяные клетки устойчивыми к гемолизу (феномен, обусловленный окислением, поскольку его проявлению может препятствовать витамин E, данные не представляют). Группам мышей, дефицитных по рецептору LDL ($n=3$), которых обычно используют в качестве модели образования атеросклеротических повреждений на животных, вводят через зонд D-пептиды или носитель в форме солевого раствора. Каждому животному вводят 100 мкг солевого раствора, 100 мкг/100 мкл пептида D-2F или пептида D-37pA. Кровь отбирают из ретроорбитального синуса под мягкой анестезией через 17 и 48 ч. Красные клетки, отделенные центрифугированием, разводят в 10% гематокрите с PBS и инкубируют при 37°C при осторожном встряхивании. Аликвоты отбирают в точках времени $t=0$, 2, 6 и 18 ч, отбрасывают и измеряют оптическую плотность выделившегося гемоглобина.

На фиг. 11 демонстрируют, что введение зондом D-пептидов мышам и последующее выделение их LDL делает LDL устойчивым к окислению клетками артериальной стенки, что измеряют с помощью биоанализа хемотаксиса моноцитов.

Другой эксперимент демонстрирует, что D-пептид всасывается из желудка и делает LDL не способным индуцировать хемотактическую активность моноцитов на модели кокультуры человеческих клеток артериальной стенки, тогда как L-пептид 2F не обладает данным свойством. Солевой раствор, либо 2F, синтезированный из D-аминокислот или из L-аминокислот, вливают в желудки мышей с помощью зонда (инстилляцией в желудок с помощью трубки). После вливания с помощью зонда у мышей берут кровь и их LDL выделяют и добавляют в кокультуры человеческих клеток артериальной стенки. D-пептид, будучи введенным через зонд, защищает LDL, что доказывают на основании пониженного хемотаксиса моноцитов, индуцируемого LDL, выделенного у мышей, которые получают пептид D-2F (D2FLDL) (синтезированный из D-аминокислот), тогда как LDL, выделенный у мышей, которые получают L-2F (синтезированный из природных L-аминокислот) (L2FLDL), легко индуцирует хемотаксис моноцитов (см. фиг. 12).

2F, синтезированный из L-аминокислот, при воздействии на LDL *in vitro* является эффективным в той же мере, что 2F, синтезированный из D-аминокислот (см. фиг. 9). Так, разница в результатах с данным экспериментом, в котором пептиды вводят *in vivo* через зонд, показывает, что 2F, синтезированный из D-аминокислот, должен всасываться из желудка интактным, тогда как пептид 2F, синтезированный из природных L-аминокислот, должен разлагаться в желудке в процессе переваривания и/или в плазме, что, как предполагают, могло бы быть в данном случае. В других исследованиях доказательств образования антитела против пептида D-2F не наблюдают.

Фиг. 13А и 13В представляют собой два графических отображения экспериментов, в которых мышам с выбитым (нокаутированным) рецептором LDL с помощью зонда вводят 50 мкг D-5F. У животных берут кровь через 1,5, 3 или 6 ч и выделяют их HDL, LDL и VLDL/IDL. Как показывают на графике, HDL, взятый через 1,5 ч после введения зонда, не защищает контрольный LDL от модификации, но HDL, взятый через 3 ч, немного меньше, чем через 6 ч после введения зонда, обладает теми же защитными свойствами в отношении продукции индуцированной LDL хемотактической активности моноцитов в человеческих клетках артериальной стенки, что контрольный HDL (см. фиг. 13А). На другом графике (см. фиг. 13В) представляют выделение мышинного LDL и VLDL/IDL через 1,5, 3 или 6 ч после введения через зонд 50 мкг D-5F. На левой панели показывают, что контрольный LDL добавляют к человеческим клеткам артериальной стенки без контрольного HDL или с контрольным HDL и измеряют хемотактическую активность моноцитов, образуемую клетками артериальной стенки. На средней панели представляют добавление LDL, взятого через 1,5, 3 или 6 ч после введения через зонд 50 мкг D-5F, к клеткам артериальной стенки. Результаты показывают, что через 3 и 6 ч LDL индуцирует значительно меньшую хемотактическую активность моноцитов. На правой стороне графика показывают, что добавление фракции VLDL/IDL липопротеинов (V/IDL), как представлено во временной точке 3 ч, индуцирует значительно меньшую хемотактическую активность моноцитов.

Пример 3. Эффекты повышения гидрофобности на физико-химические и биологические свойства пептида амфипатической спирали класса А.

Список сокращений.

As₂O - уксусный ангидрид; аро А-I - аполипопротеин А-I; BSA - бычий сывороточный альбумин; САД - заболевание коронарной артерии; CD - круговой дихроизм; DMPC - димиритоилфосфатидилхолин; DiPoPE-ди-(16:1) пальмитолеилфосфатидилэтанолламин; DSC - дифференциальная сканирующая калориметрия; EDTA - этилендиаминтетрауксусная кислота; EPC - яичный фосфатидилхолин; FMOC - флуоренилметилоксикарбонил; Gdn HCl - гуанидин гидрохлорид; HAEC - человеческие эндотелиальные клетки аорты; HASMC - человеческие клетки гладкой мускулатуры аорты; HBTU - 2-(Н-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурионгексафторфосфат; HDL - липопротеин высокой плотности; HPLC (ВЭЖХ) - высокоэффективная жидкостная хроматография; LCAT - лецитин-холестерин-ацилтрансфераза; MCP-1 - моноцитарный хемотактический белок-1; M-CSF - макрофагальный колониестимулирующий фактор; MLV - мультиламеллярные (многослойные) носители; NMM - N-метилморфолин; PBS - забуференный фосфатом солевой раствор; PIPES - пиперазин-N,N'-бис[2-этансульфоновая кислота]; RP-HPLC - высокоэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой; TPA - трифторуксусная кислота.

Резюме.

Недавно показано, что амфипатический пептид 5F класса А с повышенной амфипатичностью защищает мышей от индуцируемого кормом атеросклероза. Теперь исследуют эффекты повышения гидрофобности серии гомологичных амфипатических пептидов класса А, включая 5F, на физические и функциональные свойства, связанные с подавлением атеросклероза путем методичной замены имеющихся неполярных аминокислот фенилаланином. Пептиды на основе последовательности Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH₂ (SEQ ID NO:1, Ac-18A-NH₂ или 2F) представляют 3F³ (Ac-F³18A-NH₂), 3F¹⁴ (Ac-F¹⁴18A-NH₂), 4F (Ac-F^{3,14}18A-NH₂), 5F (Ac-F^{11,14,17}18A-NH₂), 6F (Ac-F^{10,11,14,17}18A-NH₂) и 7F (Ac-F^{3,10,11,14,17}18A-NH₂). Измерения растворимости в воде, времени удерживания при ВЭЖХ, исключаяющего давление проникновения в монослой яичного PC и скорости сольюбилизации яичного PC, показывающие резкое повышение гидрофобности между пептидами 4F и 5F, осуществляют на основании повышения способности связываться с фосфолипидами. Пептиды 6F и 7F являются менее эффективными, что указывает на ограничение стимуляции взаимодействия липидов с данными пептидами при повышении гидрофобности. Несмотря на данное заметное повышение аффинности к липидам, данные пептиды являются менее эффективными, чем аро А-I в плане активации плазменного фермента лецитин-холестерин-ацилтрансферазы (LCAT), при этом 5F лучше других активует LCAT (80% от уровня аро А-I). Пептиды 4F, 5F и 6F являются в равной степени сильными ингибиторами индуцированной LDL хемотактической активности моноцитов. Данные исследования предполагают, что для оптимальной биологической активности амфипатических пептидов необходим соответствующий баланс между пептидно-пептидными и пептидно-липидными взаимодействиями. Данные исследования представляют рациональную основу для конструирования маленьких миметиков аро А-I с повышенной способностью подавления атеросклероза.

Введение.

Показана обратная корреляция плазменных уровней липопротеинов высокой плотности (HDL) и аполипопротеина A-I (apo A-I), основного белкового компонента HDL, с заболеванием коронарной артерии (CAD) (см. статьи Sprecher и соавт., *Arterioscler. Thromb.*, 13:495-504 (1993); Philips и соавт., *Circulation*, 88:2762-2770 (1993)). Человеческий apo A-I представляет собой белок из 243 остатков, содержащий восемь повторов 22-мера амфипатической спирали, большинство из которых, как показано, содержат мотив класса A (см. статью Segrest и соавт., *Proteins*, 8:103-117 (1990); материал Anantharamaiah и соавт. в монографии Амфипатическая спираль (The Amphipathic Helix), под ред. Epand R.M., CRC Press, Boca Raton, FL, стр. 109-142 (1993)). Амфипатические спирали класса A имеют характерное распределение заряда; они содержат кластер положительно заряженных аминокислот на границе полярной и неполярной поверхностей α -спирали и отрицательно заряженные остатки в центре полярной поверхности (см. статью Segrest и соавт., *Proteins*, 8:103-117 (1990); материал Anantharamaiah и соавт. в монографии Амфипатическая спираль (The Amphipathic Helix), под ред. Epand R.M., CRC Press, Boca Raton, FL, стр. 109-142 (1993), статью Segrest и соавт., *J. Lipid Res.*, 33:141-166 (1992)). Считают, что данный уникальный мотив вторичной структуры отвечает за свойство apo A-I связывания с липидом (см. статью Segrest и соавт., *Proteins*, 8:103-117 (1990)). Многие исследования с синтетическими аналогами амфипатических спиралей класса A поддерживают данную концепцию (см. статьи Segrest и соавт., *Adv. Prot. Chem.*, 45:303-369 (1994); Brouillette и Anantharamaiah, *Biochim. Biophys. Acta*, 1256:103-129 (1995)). Недавно синтезированы спирали каждого из 22-меров, присутствующих в качестве мономеров и tandemных димеров в человеческом apo A-I, и показано, что N- и C-концевые амфипатические спирали обладают максимальной способностью связывания с липидами (см. статью Mishra и соавт., *Biochemistry*, 37:10313-10324 (1998)). Исследования рентгено-кристаллической структуры и молекулярное моделирование экзона 4 (остатки 44-243) apo A-I предполагают, что состояние самоассоциации целого apo A-I необходимо для связывания с липидом (см. статьи Borhani и соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94:12291-12296 (1999); Segrest и соавт., *Current Opin. Lipidol.*, 11:105-115 (2000)). В данной модели две молекулы apo A-I выстраиваются в форме димера "голова к хвосту" с помощью мономеров, взаимодействующих друг с другом, с целью стабилизации связанной с липидом структуры apo A-I.

Экспериментальное доказательство предполагает, что защитный эффект apo A-I и HDL в отношении заболевания коронарной артерии может быть обусловлен их ролью в "обратном транспорте холестерина" (см. статьи Fielding и Fielding, *J. Lipid Res.*, 36:211-228 (1995); Glomset, *J. Lipid Res.*, 9:155-167 (1968)). Обратный транспорт холестерина - это сумма трех стадий, включающих HDL/apo A-I: а) выход холестерина из клеток хх (см. статьи Johnson и соавт., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1085:273-298 (1991); Oram и Yokoyama, *J. Lipid Res.*, 37:2473-2491 (1996)), б) этерификацию с помощью LCAT связанного с HDL холестерина (см. статьи Fielding и соавт., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 46:1493-1498 (1972); Jonas, *Biochim. Biophys. Acta*, 1084: 205-220 (1991)) и в) рецептор-опосредованную доставку сложного эфира холестерина в печень (см. статью Kreiger, *Ann. Rev. Biochem.*, 68:523-558 (1999)). Исследования *in vivo* показывают, что как человеческий apo A-I, так и синтетический пептид амфипатической спирали класса A подавляют атеросклероз без изменения уровней плазменного холестерина посредством механизма, не зависящего от обратного транспорта холестерина (см. статью Shah и соавт., *Circulation*, 97:780-785 (1998)). Недавно сделано предположение, что ингибирование индуцируемого LDL хемотаксиса моноцитов в клетки артериальной стенки является другой основной ролью, которую играют apo A-I и HDL в предупреждении атеросклероза (см. статьи Navab и соавт., *J. Lipid Res.*, 41:1481-1494 (2000); Navab и соавт., *J. Lipid-Res.*, 41:1495-1508 (2000)).

Показано, что пептид, который, как демонстрируют, имитирует свойства человеческого apo A-I, 18A, обладает также способностями активировать LCAT (см. статьи Anantharamaiah и соавт., *Arteriosclerosis*, 10:95-105 (1990); Epand и соавт., *J. Biol. Chem.*, 262:9389-9396 (1987)) и вызывать выход холестерина (см. статьи Davidson и соавт., *J. Biol. Chem.*, 269:22975-22982 (1994); Yancey и соавт., *Biochemistry*, 34:7955-7965 (1995)). Нейтрализация концевых зарядов 18A с образованием Ac-18A-NH₂, как показано, повышает его аффинность к липидам и биологическую активность (см. статьи Yancey и соавт., *Biochemistry*, 34:7955-7965 (1995); Venkatachalapathi и соавт., *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 15:349-359 (1993)). Некоторые модификации последовательности аминокислот данной "родительской" молекулы 18A делают в попытке улучшения ее свойств, имитирующих apo A-I (см. статьи Brouillette и Anantharamaiah, *Biochim. Biophys. Acta*, 1256:103-129 (1995); Mishra и соавт., *J. Biol. Chem.*, 269:7185-7191 (1994); Mishra и соавт., *J. Biol. Chem.*, 270:1602-1611 (1995)). В более ранних исследованиях (см. статьи Brouillette и Anantharamaiah, *Biochim. Biophys. Acta*, 1256:103-129 (1995); Epand и соавт., *J. Biol. Chem.*, 262:9389-9396 (1987)) показывают, что повышение гидрофобности данного пептида повышает аффинность к липидам и свойства, имитирующие apo A-I. Синтетический пептид 5F, аналог Ac-18A-NH₂ с повышенной амфипатичностью, как показывают, подавляет индуцированный кормом атеросклероз у мышей (см., например, примеры 1 и 2). Однако пептид 2F не подавляет в значительной мере индуцированное кормом образование повреждений у мышей C57 BL6 (см. статью Garber и соавт., *Circulation*, 100:1538 (1999)). Исследование димеров пептида 18A показывает, что усиление пептидно-пептидной связи снижает пептидно-липидную связь (см. статью Mishra и соавт., *J. Biol. Chem.*, 270:1602-1611

(1995)). Для определения максимальной степени, до которой может доходить аффинность пептида 18A к липидам при положительном эффекте в плане связывания липидов и имитации свойств аро А-I, создают серию гомологичных пептидов, в которой число остатков Phe методично увеличивают путем замещения гидрофобных аминокислот, таких как Leu и Ala, на неполярной поверхности на Phe. В соответствии с экспериментально определенной шкалой гидрофобности Wimley и White (см. статью Wimley и White, *Nature Struc. Biol.*, 3:842-848 (1996)), Trp и Phe являются наиболее гидрофобными аминокислотами в том смысле, что они отличаются максимальным распределением в мембране из водной фазы. Для повышения гидрофобности пептида выбирают Phe, поскольку он является наиболее кислотоустойчивой гидрофобной аминокислотой в пептидах, активных в мембране, и Phe-содержащие пептиды можно синтезировать проще, чем Trp-содержащие пептиды. Изучают эффекты данного повышения гидрофобности на физические свойства и свойства связывания липидов, а также на биологические свойства, имитирующие аро А-I, такие как активация LCAT и подавление индуцированной LDL хемотактической активности.

Экспериментальные методики

Синтез пептидов.

Пептиды синтезируют твердофазным способом, используя автоматизированный твердофазный синтезатор (PS3 Protein Technologies, Woburn, MA). Fmoc-аминокислоты присоединяют к амидной смоле [0,536 мЭкв./г], (Peninsula Laboratories, Inc. Belmont, CA) в присутствии HBTU и NMM и ацетилируют уксусным ангидридом по N-концу. Пептиды отщепляют от твердой основы, используя 70% TFA в дихлорметане в присутствии анизол (1%), меркаптоэтанола (0,1%) и триптофана (20 мас.% от смолы для пептида) и очищают на колонке VYDAC C-4 (22 мм × 25 см, размер частиц 10 мкм) для ВЭЖХ с обращенной фазой при использовании градиента 25% - 58% ацетонитрила в воде, содержащем 0,1% TFA в течение 66 мин при скорости потока 4,8 мл/мин. Чистоту пептидов проверяют с помощью аналитической ВЭЖХ с обращенной фазой, используя колонку с C18 (VYDAC, 4.6 мм × 25 см, 5 мкм) и линейный градиент ацетонитрил-вода (в присутствии 0,1% TFA) 25-58% в течение 33 мин, а также масс-спектральным анализом.

Круговой дихроизм.

CD-спектры регистрируют на спектрополяриметре AVIV 62DS, как описано в статье Mishra и соавт., *J. Biol. Chem.*, 269:7185-7191 (1994). Вкратце, спектры получают, используя камеру с длиной дорожки 0,1 см, измерения проводят с интервалом 1 нм от 260 до 190 нм при 25°C. Для всех CD-спектров сигнал усредняют путем введения четырех сканирований, корректируют базовую линию и сглаживают. Растворы пептидов в PBS, pH 7,4, используют в концентрации 11 мкМ. Комплексы пептид-DMPC (1:20 моль:моль) используют для определения эффекта связывания липида на спиральность данных пептидов. Данные комплексы готовят добавлением соответствующего объема раствора пептида к многослойным носителям DMPC. Многослойные носители DMPC готовят следующим образом: известное количество липида растворяют в этаноле и удаляют растворитель медленным выпариванием под слабым током азота. Остаточный растворитель удаляют путем хранения липидной пленки под вакуумом в течение ночи. Соответствующий объем PBS, pH 7,4 добавляют к тонкой липидной пленке, получая необходимую конечную концентрацию DMPC. Липидно-пептидные комплексы готовят добавлением объема пептидных растворов, требующегося для получения молярного соотношения липида к пептиду 20:1. Вследствие плохой растворимости данных пептидов, используют концентрацию пептидов 11 мкМ. Среднюю остаточную эллиптичность $[\theta]_{MRE}$ (град · см² · дмоль⁻¹) при 222 нм рассчитывают, используя следующее уравнение:

$$[\theta]_{MRE} = MRW[\theta]/10cl,$$

где MRW - средняя остаточная масса пептида,

θ - обнаруженная эллиптичность в градусах,

c - концентрация пептида в г/мл и

l - длина дорожки камеры в сантиметрах.

Процент спиральности пептида определяют из следующего уравнения, как описано в статье Morissett и соавт., *Biochemistry*, 12:1290-1299 (1973):

$$\% \alpha\text{-спиральности} = ([\theta]_{222} + 3000)/(36000 + 3000),$$

где $[\theta]_{222}$ - средняя остаточная эллиптичность при 222 нм.

Дифференциальная сканирующая калориметрия.

Исследования DSC проводят с использованием сканирующего калориметра Microcal MC-2 (MicroCal, Inc., Amherst, MA) при скорости сканирования 20°C ч⁻¹ для DMPC и 37°C ч⁻¹ для DiPoPE с помощью процедуры, описанной в статье Mishra и соавт., *J. Biol. Chem.*, 269:7185-7191 (1994). Известное количество фосфолипида растворяют в хлороформе. Для одной партии образцов пептид растворяют в метаноле и добавляют в раствор DiPoPE в системе хлороформ/метанол (2:1, об.:об.). В обоих случаях, как в случае образцов чистых липидов, так и в случае органических растворов липида и пептида, растворитель удаляют под медленным током азота. Остаточный растворитель удаляют под вакуумом. К высушенной пленке добавляют чистый буфер (PBS, pH 7,4 для DMPC или 20 mM PIPES, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl и 0,002% NaN₃, pH 7,4 для DiPoPE) или раствор пептида в буфере известной концентрации для получения

специфического молярного соотношения липида/пептида и гидратируют ее интенсивным перемешиванием при комнатной температуре в течение 30 мин. Для DMPC проводят четыре последовательных сканирования при времени уравнивания 60 мин. Термограммы DSC анализируют с использованием программного обеспечения MicroCal Inc., Amherst, MA и Origin, версия 5.0.

Измерения поверхностного давления.

Измерение монослоя с исключением давления дает значение аффинности пептидов к границе раздела липида и воды; эксперимент проводят согласно процедуре, описанной Phillips и Krebs (см. статьи Phillips и Krebs, *Methods Enzymol.*, 128:387-403 (1986); Ibdah и соавт., *Biochim. Biophys. Acta*, 1004:300-308 (1989)). Нерастворимый монослой яичного фосфатидилхолина (EPC) распределяют на границе раздела воздуха и воды в тефлоновой чашке при комнатной температуре, получая исходное поверхностное давление (π_i) в интервале 5-45 дин/см. Раствор пептидов в PBS, содержащий 1,5 M Gdn.HCl, осторожно инъецируют в субфазу до конечной концентрации 50 мкг/дл. Gdn.HCl разводят в субфазе до конечной концентрации <1 mM для создания возможности ренатурации пептидов. Субфазу постоянно перемешивают и регистрируют возрастание поверхностного давления монослоя EPC ($\Delta\pi$) до получения постоянной величины. Величину исходного поверхностного давления (π_i), при котором пептиды более не проникают в монослой EPC, т.е. исключающее давление (π_c), вычисляют путем экстраполяции π_i относительно линейной регрессии $\Delta\pi$, соответствующей уравнению $\Delta\pi = 0$ дин/см.

Измерения прямоугольного рассеяния света.

Связывание данных пептидов с яичным фосфатидилхолином определяют путем последующего растворения многослойных носителей EPC (MLV) с помощью прямоугольного рассеяния света с использованием считывающего фотона спектрофлуорометра SLM 8000C, как описано в статье Mishra и соавт., *J. Biol. Chem.*, 269:7185-7191 (1994)). MLV EPC получают выпариванием раствора EPC (Avanti Polar, AL) под азотом и гидратацией липидной пленки забуференным фосфатом соевым раствором (pH 7,4). Образец, содержащий 105 мкМ EPC и эквимольное количество пептида, поддерживают при 25°C и постоянно перемешивают. Уменьшение мутности мониторируют в течение 30 мин. Полного растворения носителей EPC достигают добавлением Triton X-100 до конечной концентрации 1 mM.

Очистка лецитин-холестерин-ацилтрансферазы (LCAT).

LCAT выделяют из свежей нормолипидемической плазмы способом, предложенным в статье Albers и соавт., *Methods Enzymol.*, 129:763-783 (1986) с некоторыми модификациями. Плотность плазмы доводят до 1,21 г/мл и центрифугируют ее при 175000 g в течение 24 ч. Фракцию, содержащую LCAT, подвергают хроматографии на Affi-Gel Blue с последующей хроматографией на DE-52. LCAT элюируют с колонки DE-52, используя градиент 75-200 mM NaCl в Tris буфере (10 mM, pH 7,6). Данные SDS-PAGE показывают, что фермент имеет более чем 90% чистоту и не содержит примеси человеческого аро A-I.

Анализ активности LCAT.

Субстрат готовят путем обработки ультразвуком яичного PC/холестерина (90:20 моль/моль), содержащего следовые количества 7 α -3H-холестерина, в устройстве для ультразвуковой обработки Branson 250 в течение 12 мин для получения маленьких однослойных носителей. Субстрат (50 мкл) инкубируют с 5 мкг пептида или человеческого аро A-I и 50 мкл BSA (40 мкг/мл) в течение 1 ч при 37°C. Общий объем доводят до 150 мкл. После инкубирования в течение 1 ч добавляют 100 мкл LCAT и инкубируют в течение 1 ч при 37°C, затем реакцию останавливают нанесением 10 мкл в виде пятна на полоску силикагеля. Холестерин и холестерин-сложный эфир разделяют с помощью тонкослойной хроматографии на полосках силикагеля в системе гексан:хлороформ (2:1 об./об.). Стандарты холестерина и холестерилолеата визуализируют, погружая пластинку для ТСХ (тонкослойной хроматографии) в буфер, содержащий 3% ацетата меди, 8% фосфорной кислоты и нагревая ее. Положения стандартов используют для того, чтобы разрезать полоску на две, и две части полоски подсчитывают в скантинляционной жидкости при использовании Packard Tri Carb 4530. Все реакции делают в трех повторностях. Активацию LCAT пептидами выражают как процент от общей активации посредством аро A-I.

Электрофорез.

Неденатурирующий SDS-PAGE проводят, используя способ, описанный в статье Laemmli, *Nature*, 227:680-685 (1970). Используют гели Premade Novex и с целью идентификации белковых полос гель окрашивают Кумасси синим.

Индукцированная LDL хемотактическая активность моноцитов.

Получение кокультур человеческих клеток артериальной стенки, выделение моноцитов, выделение липопротеинов из плазмы нормальных доноров-людей ультрацентрифугированием или из мышиной плазмы с помощью FPLC и определение гидропероксидов липидов и хемотактической активности моноцитов осуществляют, как описано в работах Navab и соавт. (см. статьи Navab и соавт., *J. Clin. Invest.*, 88:2039-2046 (1991); Navab и соавт., *J. Clin. Invest.*, 99:2005-2019 (1997)). Вкратце, LDL и HDL выделяют из человеческой плазмы способом, предложенным Havel и соавт. (см. статью Havel и соавт., *J. Clin. Invest.*, 43:1345-1353 (1955)). Человеческие эндотелиальные клетки аорты (HAEC) и клетки гладкой мускулатуры (HASMC) выделяют, как описано в статье Navab и соавт., *J. Clin. Invest.*, 88:2039-2046 (1991). Платы для микротитрования обрабатывают 0,1% желатином при 37°C в течение ночи. HASMC добавля-

ют до конфлуэнтной густоты 1×10^5 клеток/см². Клетки культивируют в течение двух суток, за это время они покрывают всю поверхность лунки и образуют достаточное количество экстрацеллюлярного матрикса. НАЕС последовательно добавляют при густоте 2×10^5 клеток/см² и позволяют расти, образуя полный монослой конфлуэнтных НАЕС, в течение двух суток. Во всех экспериментах НАЕС и аутологичные HASMC (от одного донора) используют на уровне четырех-шести пассажей. Моноциты выделяют из крови нормальных доноров, как описано в статье Fogelman и соавт., J. Lipid Res., 29:1243-1247 (1988). Кокультуры обрабатывают нативным LDL (250 мкг белка/мл) или введением HDL (350 мкг белка/мл), или пептидов в течение 8 ч. Затем кокультуры промывают и инкубируют со средой 199 в течение дополнительных 8 ч. Супернатанты полученных кокультур анализируют на хемотактическую активность моноцитов, как описано в статье Navab и соавт., J. Clin. Invest., 99:2005-2019 (1997).

Результаты.

Анализ пептидов.

В табл. 6 представлены последовательности различных аналогов 18A, которые синтезируют. Пептид Ac-18A-NH₂, который содержит 2 остатка Phe в положениях 6 и 18 (близко к находящимся на границе раздела остаткам Lys), обозначают 2F. Синтезируют два пептида 3F, 3F³ или 3F¹⁴, где Leu в положении 3 и 14 (оба находятся в центре неполярной поверхности) замещены Phe соответственно. Пептид 4F содержит два остатка Phe в центре неполярной поверхности, что является результатом замены двух центральных остатков Leu. Замены в пептидах (3F-7F) представляют в табл. 6. С увеличением числа остатков Phe теоретическая гидрофобность/остаток на неполярной поверхности повышается от 2,05 для пептида 2F до 3,15 для 7F.

Таблица 6

Модификации Ac-18A-NH ₂ для повышения гидрофобности			
Пептид	Последовательность ¹	Гидрофобность ²	Теоретическая аффинность к липидам (Λ) ³
2F	Ac-18A-NH ₂	2,05	13,03
3F ³	Ac-[F ³ 18A]-NH ₂	2,20	13,84
3F ¹⁴	Ac-[F ¹⁴ 18A]-NH ₂	2,20	13,79
4F	Ac-[F ^{3,14} 18A]-NH ₂	2,35	14,59
5F	Ac-[F ^{11,14,17} 18A]-NH ₂	2,81	19,07
6F	Ac-[F ^{10,11,14,17} 18A]-NH ₂	2,96	19,87
7F	Ac-[F ^{3,10,11,14,17} 18A]-NH ₂	3,15	20,78

¹ - Базовая последовательность 18A DWLKAFYDKVAEKLKEAF (SEQ ID NO:2)

² - Гидрофобность выражают, как гидрофобность/остаток на неполярной поверхности

³ - Теоретическую аффинность к липидам рассчитывают, как показано в статье Palgunachari и соавт., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 16:328-338 (1996))

Пептиды очищают на препаративной колонке Vydac C₄ с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой, используя воду (с 0,1% трифторуксусной кислотой) и ацетонитрил (0,1% трифторуксусной кислоты). Чистоту и время удерживания пептидов определяют на аналитической колонке Vydac C₁₈, используя градиент 25-58% ацетонитрила в воде, содержащей 0,1% TFA. Чистоту данных пептидов подтверждают также масс-спектрометрией. Масса согласуется с вычисленной молекулярной массой. Время удерживания пептидов приведено в табл. 7. Хотя оба пептида как 3F, так и 4F содержат дополнительные остатки Phe по сравнению с 2F, время удерживания данных пептидов на колонке с C₁₈ не очень отличается (~22 мин). Резкое увеличение времени удерживания является очевидным для 5F, 6F и 7F (~26 мин). При увеличении числа остатков Phe снижается растворимость данных пептидов в PBS. Как можно заметить из табл. 7, растворимость 2F, 3F³, 3F¹⁴ и 4F (1,25-1,4 мг/мл) значительно выше, чем у 5F, 6F и 7F (0,03-0,1 мг/мл).

Физические свойства F-пептидов

Пептид	Молекулярная масса ¹	Время удерживания (мин.) ²	Растворимость (мг/мл) ³	Исключающее давление монослоя (π_e) ⁴
аро A-I	28000	28,0	>2,0	34
18A	2200	19,8	>2,0	30
37pA	4580	26,0	>2,0	41
2F	2242	22,5	>2,0	38
3F ³	2276	21,0	1,25	38
3F ¹⁴	2276	21,2	1,45	39
4F	2310	22,0	1,30	40
5F	2429	26,5	0,10	45
6F	2462	27,0	0,03	46
7F	2510	26,0	0,10	45

¹ - Масса, как определяют путем масс-спектропии, является очень близкой к теоретически рассчитанной молекулярной массе

² - Время удерживания представляет собой время, необходимое для элюции пептидов с колонки Vydac C₁₈ при использовании градиента 25-58% ацетонитрила в воде, содержащего 0,1% TFA в течение 33 мин

³ - Растворимость определяют в PBS

⁴ - Воспроизводимость данных измерений составляет ± 1 дин/см

Самоассоциацию данных амфипатических пептидов исследуют с помощью неденатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (PAGE). На фиг. 14 показывают подвижность 2F как в денатурирующем SDS (см. фиг. 14A), так и в неденатурирующем (см. фиг. 14B) гелях. Молекулярная масса 2F составляет 2242, что можно наблюдать в виде одной полосы на SDS-геле (см. фиг. 14A), которая движется немного ниже, чем стандарт с самой низкой молекулярной массой (3,5-2,5 кД). Однако в неденатурирующих условиях он образует агрегаты в зависимости от концентрации, как видно на фиг. 14B. При более низких концентрациях (100 мкг/мл) он образует агрегаты двух размеров, тогда как в более высоких концентрациях (250 мкг/мл) наблюдают только более крупные агрегаты (см. фиг. 14B). Все другие изученные пептиды также демонстрируют агрегацию в неденатурирующих условиях, что предполагает наличие у пептидов сильной тенденции к самоассоциации.

Круговой дихроизм.

[0189] Вторичную структуру пептидов определяют с помощью спектроскопии кругового дихроизма. В табл. 8 представлен процент спиральности пептидов в PBS и в присутствии DMPC. В PBS гомологи 2F, 4F, 5F, 6F и 7F имеют более высокий процент спиральности, чем 3F³ и 3F¹⁴ (см. табл. 8). Поскольку 5F, 6F и 7F плохо растворимы в PBS, исследования CD проводят с использованием 11 мкМ пептидов (концентрация, при которой все они растворимы). Пептид 2F демонстрирует спиральность 55%, сравнимую с 5F в растворе. Оба пептида как 6F, так и 7F являются несколько более спиральными (67 и 58% соответственно), тогда как 4F обладает немного меньшей спиральностью (45%). Оба пептида 3F являются значительно менее спиральными ($\approx 20\%$). Однако связывание с DMPC значительно повышает спиральность всех пептидов за исключением 6F (см. табл. 8). В жидкой среде 2F, 5F и 7F демонстрируют высокое содержание спирали (68-76%). Хотя пептиды 3F³ и 3F¹⁴ имеют очень маленькое содержание спиралей в PBS, наблюдают значительное повышение спиральности в липидной среде (от приблизительно 22 до 42% для 3F³ и от 19 до 55% для 3F¹⁴). Спиральность пептидов 6F и 4F не изменяется в значительной степени в присутствии липида. Однако данные пептиды являются еще менее спиральными, чем пептиды 2F и 5F. По результатам CD предполагают, что системное изменение спиральности пептидов при повышении числа замен на Phe отсутствует; пептиды 2F и 5F демонстрируют максимум спиральности в растворе и в присутствии фосфолипида.

Таблица 8

Спиральность F-пептидов в водной и липидной среде		
Пептиды	Процент спиральности	
	PBS ¹	DMPC ¹
2F	55	72
3F ³	22	42
3F ¹⁴	19	55
4F	45	44
5F	55	76
6F	67	50
7F	58	68

¹ - используют 11 мкМ растворы пептида. Используемое соотношение пептид:ОМРС составляет 1:20 (моль/моль). Произведено три измерения с получением ошибки $\pm 10\%$

Исследования DSC с DMPC и DiPoPE.

Эффект данных аналогов 18A на переход плавления цепи многослойных носителей DMPC изучают с помощью DSC, используя пептидно-липидные смеси в молярном соотношении липид/пептид 100:1. В табл. 9 представлены температуры перехода и значения энтальпии перехода плавления цепи DMPC в присутствии и в отсутствие пептидов. Чистый липид проходит предпереходное состояние при 13°C и главный переход плавления цепи при 23°C. Добавление пептидов к DMPC приводит к расширению состояния геля до перехода из жидкости в кристалл и снижению энтальпии перехода (см. табл. 9). В присутствии каких-либо пептидов предпереходное состояние не отмечают. Среди исследованных пептидов 2F, 3F³, 5F и 6F снижают энтальпию перехода в максимальной степени (см. табл. 9). Ни один из пептидов не изменяет температуру перехода более чем на 0,2°C.

Таблица 9

Эффект F-пептидов на параметры перехода плавления цепи DMPC

Пептид	T _{см} (°C)	ΔH _{см} (ккал/моль)	ΔT _{1/2} (°C)
DMPC	23,1	6,4	0,2
2F	23,2	4,5	0,5
3F ³	23,2	4,9	0,4
3F ¹⁴	23,2	5,5	0,3
4F	23,2	5,3	0,4
5F	23,2	4,9	0,5
6F	23,1	4,0	0,5
7F	23,2	4,5	0,5

Используют соотношение DMPC/пептид 100:1 (моль/моль). Используемая концентрация DMPC составляет 1,5 мМ. T_{см} - температура, при которой происходит переход плавления цепи, ΔH_{см} - энтальпия перехода и ΔT_{1/2} - ширина половины максимума перехода.

Сдвиг в двухслойной структуре относительно гексагональной фазы температуры перехода (T_н) используют для оценки эффектов пептидов на свойство внутренней кривизны фосфолипидов (см. статью Erand, Biochim. Biophys. Acta, 1376:353-368 (1998)). Ранее было показано, что 2F приводит к повышению T_н DiPoPE (см. статью Tytler и соавт., J. Biol. Chem., 268:22112-22118 (1993)). В настоящем исследовании пептидно-липидные смеси готовят двумя путями. Один путь - это добавление пептида в органическом растворителе к липиду в органическом растворителе, затем выделение материала в виде пленки с последующей гидратацией буфером. Согласно другому методу пептид и липид смешивают после отдельной гидратации каждого из них. Если смесь уравнивается до проведения анализа DSC, вопросов исходном смешивании пептида и липида не является важным. Однако системы мембран могут уравниваться медленно, в данном случае в системе может быть больше пептида в липиде при его инкорпорации в липидную пленку в высоких концентрациях. В целом результаты приготовления образцов обоими способами близки (не представлено), но сдвиг в T_н имеет тенденцию к увеличению для образцов, в которых пептид инкорпорируют в пленку, содержащую липид и пептид. Изменение T_н в зависимости от молярной фракции пептида представлено для различных пептидов и аро A-I (см. фиг. 15). Линейное повышение T_н наблюдают для 2F и 5F, тогда как поведение 4F ближе к аро A-I в плане более быстрого повышения, отмечаемого при более низких концентрациях пептида. С другой стороны, два аналога 3F, а также 6F и 7F не влияют на T_н в значительной степени.

Взаимодействие пептидов с фосфолипидными монослоями.

Исключающее давление в монослое π_c представляет собой поверхностное давление, при котором пептиды более не способны проникать в монослой EPC. Значение π_c отражает теоретическую аффинность пептида к липиду. Исключающее давление пептидов F повышается с увеличением числа остатков Phe (см. табл. 7). Все пептиды, исследованные в данном контексте, имеют более высокое исключаяющее давление, чем аро A-I и исходный пептид 18A. Величина π_c постепенно возрастает от 2F до 4F (от 38 до 40 дин/см). Это возрастание находится в интервале, показанном для 37pA, tandemного повтора 18A, прерываемого пролином. Величина исключаяющего давления значительно возрастает для 5F, 6F и 7F (от 40 до 45 дин/см). Очевидно, что гомологи 5F, 6F и 7F обладают близкой способностью взаимодействовать с монослоями EPC, как определяют с помощью исключаяющего давления. Интересно, что время удерживания при ВЭЖХ и величины исключаяющего давления в монослоях для F-пептидов, приведенных в табл. 7, имеют тенденцию к параллельному развитию с резким увеличением между пептидами 4F и 5P.

Прямоугольное рассеяние света.

Как можно видеть на фиг. 16, все пептиды способны к осветлению MLV EPC в отличие от аро A-I, который не осветляет MLV EPC. Два гомолога пептида 3F являются наименее эффективными в плане осветления MLV EPC. Все гомологичные пептиды 2F, 5F, 6F и 7F осветляют MLV EPC в близкой степени. Пептид 4F является наиболее эффективным в осветлении MLV EPC при активности, близкой активности Triton X-100. Для гомолога 4F время 50% осветления мутности MLV EPC также является самым коротким. Самое длительное время, требуемое для достижения 50% осветления, у пептида 7F, что обусловлено исходным lag-периодом приблизительно 300 с (см. фиг. 16). Возможно, этот эффект объясняется необходимостью диссоциации самоассоциированных молекул 7F перед тем, как они смогут взаимодействовать с MLV EPC и солиubilизировать их. Более низкие скорости осветления, показанные гомологами 2F, 5F и 6F могут быть также обусловлены более высокой степенью самоассоциации данных пептидов.

Активация плазменного фермента LCAT.

Способность данных пептидов активировать плазменный фермент LCAT определяют путем измерения исходной вязкости реакции LCAT с носителями из яичного PC-холестерина в качестве субстрата (см. фиг. 17). Активацию LCAT выражают относительно активации LCAT с помощью аро A-I, которую принимают за 100%. Активация LCAT 20 мкг/мл пептидов и аро A-I показана на фиг. 4. При данной концентрации аро A-I активирует LCAT лучше, чем любой из пептидов. Однако среди пептидов, исследованных в данном контексте, 5F является наилучшим активатором (80% от аро A-I). В плане активации LCAT, пептиды 3F³ и 3F¹⁴ имеют близкие активирующие способности. Вследствие этого они представлены в виде одного столбика (см. фиг. 17).

Индукированная LDL хемотактическая активность моноцитов.

При инкубировании LDL с системой кокультуры человеческих клеток артериальной стенки он захватывается в субэндотелиальном пространстве и окисляется с образованием биологически активных липидов. Данные липиды индуцируют хемотаксис моноцитов. Так, хемотаксис кокультуры моноцитов является хорошо разработанным тестом на образование биологически активных липидов. Показывают, что подавление хемотаксиса прямо коррелирует с удалением молекул-"затравок", которые отвечают за секрецию моноцитарного хемотаксического белка-1 (MCP-I) (см. статьи Navab и соавт., J. Lipid Res., 41:1481-1494, (2000); Navab и соавт. J. Lipid Res., 41:1495-1508 (2000)) и фактора дифференцировки макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF). На фиг. 18 показывают, что LDL после инкубирования с пептидами проявляет различные эффекты с гомологами 4F, 5F и 6F, снижая хемотаксические свойства LDL в наибольшей степени. Пептиды 3F не настолько эффективны в сравнении с 2F и 7F, которые являются менее эффективными, чем пептиды 4F, 5F и 6F.

Обсуждение.

Эффект повышения гидрофобности аналога амфипатического спирального пептида класса A на его физико-химические свойства и свойство связывания липидов

Пептиды, исследуемые в данной работе, являются гомологами исходного пептида 18A. Рассчитанная гидрофобность/остаток (в соответствии с модифицированной шкалой вычислительного способа (Palgunachari и соавт., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 16:328-338 (1996)) на неполярной поверхности повышается с повышением числа остатков Phe. Данное повышение гидрофобности (см. табл. 6) отражается в теоретической аффинности к липидам, Δ (Ibid.). Однако величина Δ постепенно повышается от 2F до 4F (от 13,03 до 14,59) при резком повышении величины от 14,59 (для 4F) до 19,07 для 5F. После 5F снова отмечают постепенное повышение величин Δ для 6F и 7F (см. табл. 6). Данный факт обусловлен заменой Leu в положениях 3 и 14 в Ac-18A-NH₂ на Phe, что приводит к небольшому повышению гидрофобности неполярной поверхности и, таким образом, небольшому повышению величин Δ для двух аналогов 3F и 4F. Однако в гомологах 5F, 6F и 7F, кроме замен Leu на Phe, в положениях 11 и 17 Ala также замещены на Phe, что приводит к значительному повышению величин Δ (см. табл. 6). Поскольку Ala является менее гидрофобным, чем Leu, и Leu является менее гидрофобным, чем Phe, замена Ala на Phe вызывает большее изменение в гидрофобности и теоретической аффинности к липидам у полученного пептида, чем замена Leu на Phe.

Время удерживания в колонке для ВЭЖХ с обращенной фазой C_{18} , растворимость денных пептидов и их способность проникать в монослой ЕРС демонстрируют тенденции, близкие тем, что отмечены в теоретических величинах аффинности к липидам (см. табл. 7). Время удерживания пептидов 2F, 3F³, 3F¹⁴ и 4F приблизительно равно (21-22 мин) и существенно меньше, чем у 5F, 6F и 7F, которые составляют вторую группу (26-27 мин). Пептиды 2F-4F имеют значительно большую растворимость в воде, чем гомологи 5F-7F, которые плохо растворимы (см. табл. 7). Постепенное повышение исключаяющего давления наблюдают от 2F до 4F, после чего происходит резкое повышение от 40 дин/см до 45 дин/см. Величины исключаяющего давления для пептидов 5F, 6F и 7F не очень отличаются друг от друга и значительно превышают данные величины для аро А-I (табл. 7). Исходный пептид 18А (30 дин/см) и даже димер 18А, 37рА (40 дин/см) также значительно менее эффективны в плане проникновения в монослой яичного РС, находящегося на границе раздела воздуха и воды. На основе вышеуказанных физических свойств пептиды F можно разделить на две группы: группу I, содержащую 2F, 3F³, 3F¹⁴, 4F, и группу II, содержащую пептиды 5F, 6F и 7F.

Данные по CD (см. табл. 8) показывают, что величина процента спиральности всех пептидов возрастает в присутствии DMPC, что предполагает связывание всех пептидов с липидами. Связывание данных пептидов с DMPC, по-видимому, аналогично тому, которое предполагают для DSC (см. табл. 9). Однако эффект данных пептидов на стабилизацию двухслойной структуры DiPoPE имеет иной характер. Очевидно, 4F и 5F лучше взаимодействуют с DiPoPE, поскольку они, по-видимому, являются лучшими стабилизаторами, чем другие пептиды.

Хотя аро А-I не обладает способностью осветлять MLV ЕРС, все аналоги пептида обладают такой способностью, но в различной степени. Среди пептидов группы I, которые хорошо растворяются в водном буфере и имеют величину исключаяющего давления в монослое в интервале 38-40 дин/см (аналоги 2F, 3F и 4F), 4F, по-видимому, является наиболее эффективным и при исследовании соотношения пептид:липид проявляет кинетические характеристики, близкие Triton X-100 (см. фиг. 16). Хотя величины исключаяющего давления в монослое у пептидов 2F и 3F близки, гомологи 3F медленнее всех осветляют MLV ЕРС. Причина пониженной способности гомологов 3F осветлять ЕРС в данное время не ясна. Пептиды группы II (5F, 6F и 7F), которые плохо растворяются в водном буфере и имеют величины поверхностного давления 45 дин/см, солибилизируют MLV ЕРС относительно медленно. Данные результаты согласуются с необходимостью диссоциации пептидных агрегатов перед взаимодействием с ЕРС. Высокую реактивность 4F можно объяснить тем фактом, что его гидрофобность является оптимальной, при этом гидрофобные взаимодействия типа пептид:пептид, для которых предпочтительна самоассоциация, не препятствуют взаимодействиям типа пептид:липид.

Эффект повышенной гидрофобности на активацию LCAT

Активация LCAT представляет собой сложный процесс и зависит не только от аффинности к липидам, но также от взаимодействия амфипатического спирального белка с ферментом LCAT (см. статью Jonas, Biochim. Biophys. Acta, 1529:245-256 (2000)). В соответствии с этими данными показано, что способность активировать LCAT должна быть различной у гомологичных пептидов. Пептид 5F проявляет максимальную способность активации LCAT, что согласуется с физическими свойствами, приведенными в табл. 7, в которой видно резкое повышение от 4F до 5F, включая величины исключаяющего давления на границе раздела яичного РС-воды. Тот факт, что пептиды 6F и 7F не настолько эффективны, как 5F, можно было бы объяснить повышенным взаимодействием типа пептид:пептид (что выражается в низкой растворимости в воде данных пептидов), которое не позволяет осуществляться взаимодействию типа пептид:липид или пептид:LCAT. Данные результаты согласуются с более ранними исследованиями димерных пептидов 18А, в которых показано, что повышенная самоассоциация димера пептида 18А-18А (36А) снижает его способность взаимодействовать с липидами по сравнению с пептидом 18А-Pro-18А (см. статью Jonas, Biochim. Biophys. Acta, 1529:245-256 (2000)). Хотя активация LCAT пептидами сравнима с активацией аро А-I, следует заметить, что аро А-I и пептиды различным образом взаимодействуют с субстратом, поскольку все они имеют различные реактивности с ЕРС (см. фиг. 16). Аналогичные наблюдения делают Chung и соавт., которые показывают, что синтетический пептид 18А-Pro-18А и аро А-I различным образом взаимодействуют с ЕРС (см. статью Chung и соавт., J. Biol. Chem., 260:10256-10262 (1985)).

Эффект повышенной гидрофобности неполярной поверхности на индуцированный LDL хемотаксис моноцитов

Поскольку удаление "молекул-затравок" зависит от амфипатичности пептида, как описано разными авторами (см. статьи Navab и соавт., J. Lipid Res., 41: 1481-1494 (2000); Navab и соавт., J. Lipid Res., 41:1495-1508 (2000)), исследуют способность данных пептидов ингибировать индуцированный LDL хемотаксис моноцитов. В данном эксперименте на базе одностороннего дисперсионного анализа, пептиды 4F, 5F и 6F на уровне 100 мкг/мл проявляют значительное и близкое по величине подавление индуцированного LDL хемотаксиса. Хотя гомолог 2F проявляет некоторую ингибирующую активность, пептидные аналоги 3F по неясным причинам не проявляют ингибирования по сравнению с одним LDL. Данные результаты согласуются с тем фактом, что пептид 3F не способен удалять липидные гидропероксиды (результаты не приводят) и имеет пониженную способность осветлять MLV ЕРС. Пептид 7F является

значительно менее эффективным, чем пептиды 4F, 5F и 6F ($P < 0,001$). Пониженная способность 7F снова может быть объяснена повышенной самоассоциацией пептида, что снижает его способность взаимодействовать с липидом, как видно из исследований по осветлению MLV EPC. Данные результаты снова демонстрируют, что тонкое равновесие, существующее между вкладом гидрофобности пептида в самоассоциацию, может оказывать важное воздействие на свойства, имитирующие аро A-I.

Введение *in vivo* пептида 5F, который обладает повышенной способностью активации LCAT и повышенной способностью удаления "молекул-затравок", защищает мышей от индуцированного кормом атеросклероза. Напротив, введение 2F, который по способности активировать LCAT близок 4F, но менее эффективен, чем 4F и 5F в плане удаления "молекул-затравок" из LDL, не подавляет в значительной степени индуцированное кормом образование повреждений у мышей C57 BL6 (средняя площадь повреждения для контрольных мышей, получающих PBS, $14,7 \pm 1,8 \text{ мкм}^2 \times 10^{-3}$ относительно мышей, получающих 2F, $13,2 \pm 1,7 \text{ мкм}^2 \times 10^{-3}$, $n = 15$). Из этого следует, что в данной модели на мышах подавление индуцированного LDL хемотаксиса моноцитов более атерогенно, чем активация LCAT. Поскольку пептиды 2F и 4F близки по активации LCAT, а пептиды 4F и 5F близки в плане удаления "затравочных молекул" из LDL, пептид 4F может служить реагентом для дифференцирования важности активации LCAT и подавления индуцируемого LDL хемотаксиса моноцитов в различных моделях на мышах, чувствительных к атеросклерозу. Если подавление индуцированного LDL хемотаксиса является более важным, чем способность активации LCAT, то 4F был бы более удачным пептидом для применения в качестве ингибитора атеросклероза, поскольку данный пептид лучше растворим, чем пептиды 5F, 6F и 7F.

Пример 4. Пептиды D-4F поддерживают уровни параоксоназы и блокируют образование окисленных фосфолипидов в период острой воспалительной ответной реакции.

Показывают, что интраназальное вливание вируса гриппа А мышам вызывает зависимость от времени потерю противовоспалительных свойств HDL, которая длится максимум 7-9 дней после введения. Выбранная доза является дозой, не вызывающей виремии, поэтому изменения не обуславливаются непосредственно вирусом, но связаны с воспалительным состоянием, индуцируемым системной реакцией хозяина на вирусную инфекцию. Данная реакция является частью природной иммунной системы и известна как ответная реакция острой фазы или ответ острой фазы.

Одним из последствий является снижение активности параоксоназы и тромбоцит-активирующей ацетилгидролазы в HDL мышей после инфекции гриппа. В результате потери данных ферментативных активностей HDL, а также в результате ассоциации прооксидантных белков с HDL во время ответа острой фазы, HDL не способен более предупреждать окисление LDL и не способен более предотвращать индуцируемое LDL образование эндотелиальными клетками хемотактической активности моноцитов. Нормальный HDL способен предупреждать индуцируемое LDL образование хемотактической активности моноцитов эндотелиальными клетками, поскольку нормальный HDL имеет достаточно активности параоксоназы и тромбоцит-активирующей ацетилгидролазы для разрушения биологически активных окисленных фосфолипидов.

В данном примере демонстрируют, что вскоре (через два дня) после инфекции гриппа А печени инфицированных мышей образуются данные окисленные фосфолипиды (см. фиг. 19) и позднее (через 7-9 дней после инфекции) данные биологически активные окисленные фосфолипиды появляются в аорте мышей. Однако если мышам ежедневно инъецируют 20 мкг D-4F после инфекции вируса гриппа А, уровни параоксоназы не снижаются (см. фиг. 20) и биологически активные окисленные фосфолипиды не образуются на уровне выше фонового (см. фиг. 21).

Данные результаты показывают, что D-4F (и/или другие пептиды, соответствующие данному изобретению) могут быть введены перорально или путем инъекции больным с диагностированным заболеванием коронарной артерии во время инфекции гриппа или других событий, которые могут вызывать воспалительную ответную реакцию острой фазы (например, вследствие вирусной инфекции, бактериальной инфекции, травмы, трансплантата, различных аутоиммунных состояний и т.п.), и, таким образом, можно с помощью кратковременного курса лечения предупредить повышенную вероятность сердечного приступа и инсульта, связанных с патологиями, которые создают данные воспалительные состояния.

Пример 5. Пероральное применение пептидных миметиков Аро A-I, синтезированных из D-аминокислот, резко снижает атеросклероз у мышей.

Пептидные миметики Аро A-I, как из D-, так и из L-аминокислот, эффективны *in vitro* в плане защиты липопротеина низкой плотности (LDL) от окисления клетками артериальной стенки. Однако когда мышам, нуллисомным по рецептору LDL, перорально вводят данные пептиды и их HDL выделяют и тестируют на способность защищать LDL от окисления *in vitro*, эффективными оказываются только пептиды, синтезированные из D-аминокислот. Пептид, синтезированный из D-аминокислот, стабилен в кровотоке и его обнаруживают во фракциях, связанных с липопротеинами высокой плотности (HDL). Пептид, синтезированный из L-аминокислот, быстро разлагается и выделяется с мочой. Когда пептид, синтезированный из D-аминокислот, известный как D-4F, два раза в день перорально вводят мышам, нуллисомным по рецептору LDL, которые получают западный корм, повреждения снижаются на 79%. Добавление D-4F в воду для питья мышам, нуллисомным по аро E, приводит к снижению повреждений более, чем на

84%. В заключение отмечают, что пероральное применение пептидных миметиков аро А-I, синтезированных из D-аминокислот, эффективно для профилактики и лечения атеросклероза и других хронических воспалительных заболеваний, которые вызывают окисленные липиды.

Технические предпосылки.

Концентрации HDL-холестерина находятся в обратной зависимости от риска атеросклеротического заболевания коронарной артерии (см. статью Miller и Miller, *Lancet*, 1:16-19, (1975)). Вливание (см. статью Badimon и соавт., *J. Clin. Invest.*, 85:1234-1241 (1990)) или трансгенная экспрессия (см. статью Plump и соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91:9607-9611 (1994)) аро А-I, основного аполипопротеина HDL, как показано в моделях на животных, защищают от атеросклероза. Считают, что механизмы, с помощью которых аро А-I защищает от развития атеросклероза, включают обратный транспорт холестерина (см. статью Shah и соавт., *Circulation*, 103:3047-3050 (2001)) и удаление низких уровней окисленных липидов, "молекул-затравок", которые необходимы для окисления LDL (см. статьи Navab и соавт., *J. Lipid Res.*, 41:1481-1494 (2000); Navab и соавт., *J. Lipid Res.*, 41:1495-1508 (2000); Navab и соавт., *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol.*, 21:481-488 (2001)). Показывают, что аналоги амфипатических спиральных пептидов класса А имитируют *in vitro* ряд свойств аро А-I, в том числе удаление "молекул-затравок", которые требуются для окисления LDL (см. статьи Navab и соавт., *J. Lipid Res.*, 41:1481-1494 (2000); Navab и соавт., *J. Lipid Res.*, 41:1495-1508 (2000)). Внутривенное введение амфипатического спирального пептида класса А, как недавно показано, защищает мышей от индуцированного кормом атеросклероза, не изменяя уровней плазменного холестерина (см. статью Garber и соавт., *J. Lipid Res.*, 42:545-552 (2001)). Уменьшение повреждений связывают со значительным повышением способности HDL подавлять окисление LDL *in vitro* (Id.). До настоящего времени основным ограничением применения аро А-I или пептидных миметиков аро А-I в качестве фармакологического агента является необходимость парентерального введения.

Ферменты млекопитающих, такие как протеазы, распознают пептиды и белки, синтезированные из L-аминокислот, но редко распознают данные материалы, синтезированные из D-аминокислот. В данном контексте показывают, что специфические препараты пептидных миметиков аро А-I, синтезированных из D-аминокислот, могут вводиться перорально, и они резко подавляют атеросклероз у мышей.

Методы.

Мыши.

Самки мышей на основе мышей C57BL/6J, нуллисомных по рецептору LDL или аро Е, приобретают в фирме Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME. Мышей, нуллисомных по рецептору LDL, поддерживают на смешанном корме Purina (Ralston Purina Co.) до достижения ими возраста 4 недель, после чего переводят из на западный корм (Teklad, Madison, WI, diet # 88137) на период 6 недель. Мышей, нуллисомных по аро Е, поддерживают на смешанном корме Purina в течение всего периода исследований. Мышам, нуллисомным по рецептору LDL, два раза в день с помощью желудочного зонда вводят тест-пептид или носитель в качестве контроля в период времени, указанный в надписях на фигурах. В возрасте четырех недель тест-пептид добавляют к воде для питья некоторым мышам, нуллисомным по аро Е, в концентрациях, указанных в надписях на фигурах, при этом мыши, нуллисомные по аро Е, продолжают получать смешанный корм.

У мышей берут кровь под анестезией из ретроорбитального венозного плексуса в соответствии с протоколами, утвержденными Комитетом по исследованиям на животных (Animal Research Committee) UCLA. Атеросклеротические повреждения измеряют, как описывают выше.

Липопротеины LDL и HDL выделяют, как описано (см. статью Navab и соавт., *J. Lipid Res.*, 41:1481-1494 (2000) и примеры в данном контексте), у людей-добровольцев, после получения от них подтвержденного согласия, и из мышинной крови, как указано выше.

Культуры, клеточное окисление LDL, выделение моноцитов и анализ хемотаксиса моноцитов.

Человеческие клетки эндотелия и гладкой мускулатуры аорты выделяют и культивируют, как описано ранее (Id.). Клеточное окисление LDL в присутствии и в отсутствие HDL определяют, как описано (Id.). Человеческие кровяные моноциты выделяют после получения подтвержденного согласия и хемотаксис моноцитов определяют, как описано ранее.

Синтез и получение пептидных миметиков аро А-I.

Пептидные миметики Аро А-I синтезируют, как описано ранее за исключением того, что в ряде случаев каждая аминокислота в пептиде является D-стереоизомером аминокислоты. Основой пептидов является последовательность Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH₂ (SEQ ID NO: 1) (Ac-18A-NH₂ или 2F). В исследованиях, описываемых в данном контексте, используют 2F или аналог 2F с первичной последовательностью аминокислот Ac-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH₂ (SEQ ID NO:5, обозначаемой также 4F). Пептиды, синтезированные из L-аминокислот, обозначают буквой L (например, L-4F), а пептиды, синтезированные из D-аминокислот, обозначают буквой D (например, D-4F). В некоторых случаях пептиды иодируют, используя реагент IODO-BEAD (Pierce, Rockford, IL) в соответствии с рекомендациями изготовителя. Липосомы из L- α -1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфохолина (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), содержащие или не содержащие D-4F, получают в соответствии с рекомендациями изготовителя. Экстракцию и детекцию интактных пептидов из мышинной

плазмы проводят, как описано в статье Garber и соавт., *Arterioscler. Thromb.*, 12:886-894, (1992), используя ВЭЖХ с обращенной фазой.

Другие методы.

Содержание белка (см. статью Navab и соавт., *J. Lipid Res.*, 41: 1481-1494 (2000)) и холестерина (см. статью Van Lenten и соавт., *Circulation*, 103:2283-2288 (2001)) в липопротеинах и статистические анализы проводят, как описано в статье Van Lenten и соавт., *Circulation*, 103:2283-2288 (2001) с достоверностью $P < 0,05$.

Результаты.

In vitro как L-2F, так и D-2F в равной степени способны блокировать окисление LDL и индуцируемую LDL хемотактическую активность моноцитов в кокультурах человеческих клеток артериальной стенки (данные не приводят). Однако *in vivo*, как показывают на фиг. 22А, после перорального введения только D-4F сохраняется интактным в кровотоке и способен повышать защитную активность HDL (см. фиг. 22В) и снижать индуцированную LDL хемотактическую активность моноцитов (см. фиг. 22С). Через 2 ч после перорального введения ^{125}I -L-4F или ^{125}I -D-4F моча мышей, получающих L-4F, содержит приблизительно в 15 раз больше радиоактивности, чем в случае мышей, получающих D-4F (данные не приводят).

На фиг. 23 демонстрируют, что введение два раза в сутки D-4F с помощью зонда уменьшает атеросклеротические повреждения у мышей, нуллисомных по рецептору LDL, получающих западный корм, до 79%. Уровни общего плазменного холестерина не отличаются в значительной степени у мышей, нуллисомных по рецептору LDL, которые получают D-4F, и у мышей, получающих только липосомы или только солевой раствор. Общий холестерин составляет 761 ± 69 мг/дл для группы D-4F, 677 ± 52 мг/дл для группы, получающей липосомы, и 699 ± 31 мг/дл для группы, получающей солевой раствор. Средний уровень HDL-холестерина несколько выше в группе D-4F и составляет $73 \pm 8,7$ мг/дл против $65,9 \pm 9,2$ мг/дл для группы, получающей липосомы, и $67,1 \pm 6,3$ для группы, получающей солевой раствор, но данные различия не достигают статистической значимости.

На фиг. 24 демонстрируют, что у мышей, нуллисомных по аро Е, получающих D-4F в воде для питья, происходит уменьшение повреждений более, чем на 84%, при этом в случаях, когда мыши получают 2,5 мг/сутки/мышь или 5,0 мг/сутки/мышь, отсутствует достоверная разница. Достоверная разница отсутствует также в количестве потребляемой воды (2,5 мл/сутки/мышь) между мышами, нуллисомными по аро Е, которые не получают пептид, или мышами, получающими 2,5 мг D-4F/мышь/сутки или 5,0 мг D-4F/мышь/сутки, и отсутствует также достоверная разница в массах тела, сердца или печени мышей, нуллисомных по аро Е, в трех группах (данные не приводят). Более того, концентрация плазменного общего холестерина достоверно не различается у мышей, нуллисомных по аро Е, которые получают D-4F (478 ± 149 мг/дл для мышей, получающих воду без пептида, $534 \pm 12,3$ мг/дл для мышей, получающих D-4F в дозе 2,5 мг/мышь/сутки, и $579 \pm 4,6$ мг/дл для мышей, получающих D-4F в дозе 5,0 мг/мышь/сутки). Средний уровень HDL-холестерина немного повышается у мышей, получающих D-4F, но разница не достигает статистической значимости ($32,2 \pm 7$ мг/дл для мышей, получающих воду без пептида, $38,7 \pm 5$ для мышей, получающих D-4F в дозе 2,5 мг/мышь/сутки, и $43,4 \pm 6$ мг/дл для мышей, получающих D-4F в дозе 5,0 мг/мышь/сутки).

Обсуждение.

До настоящего времени применение аро А-I и пептидных миметиков аро А-I в качестве фармакологических агентов была ограничена необходимостью парентерального введения. Заметное снижение атеросклеротических повреждений в данном исследовании происходит несмотря на отсутствие значительных изменений в уровне общего плазменного холестерина. Хотя имеется тенденция к небольшому повышению уровней HDL-холестерина у мышей, получающих D-4F, она не достигает статистической значимости. Представленные в данном контексте исследования предлагают, что введенные перорально пептидные миметики аро А-I, синтезированные из D-аминокислот, могут быть использованы для профилактики и лечения атеросклероза и других хронических воспалительных заболеваний, которые вызывают окисленные липиды.

Подразумевается, что примеры и варианты осуществления, описанные в данном контексте, служат только для иллюстративных целей и что различные модификации или изменения в свете различных модификаций, которые могут быть предложены компетентными специалистами в данной области, должны быть включены в сущность и сферу действия данной заявки и объем прилагаемых пунктов формулы изобретения. Все публикации, патенты и патентные заявки, приведенные в данном контексте, включены, таким образом, в виде ссылки во всей их полноте для всех целей.

Перечень последовательностей

<110> Зе Риджентс оф зи Юнивесити оф Кэлифонье (The Regents of the University of California)

<120> Пептид, композиция для перорального введения, набор (варианты), способ уменьшения интенсивности симптома атеросклероза (варианты) и способ облегчения или предупреждения коронарного осложнения у млекопитающего (варианты)

<130> 407T-911220PC

<150> US 09/896,841

<151> 2001-06-29

<150> US 09/645,454

<151> 2000-08-24

<160> 87

<170> Patentin version 3.0

<210> 1

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 1

Asp	Trp	Leu	Lys	Ala	Phe	Tyr	Asp	Lys	Val	Ala	Glu	Lys	Leu	Lys	Glu
1				5					10					15	

Ala Phe

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 2

Asp	Trp	Leu	Lys	Ala	Phe	Tyr	Asp	Lys	Val	Ala	Glu	Lys	Leu	Lys	Glu
1				5					10					15	

Ala Phe

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 3

Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
 1 5 10 15

Ala Phe

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 4

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu
 1 5 10 15

Ala Phe

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 5

Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu
 1 5 10 15

Ala Phe

<210> 6

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 6

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu
 1 5 10 15

Phe Phe

<210> 7

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса A

<400> 7

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Phe Phe Glu Lys Phe Lys Glu
 1 5 10 15

Phe Phe

<210> 8

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса A

<400> 8

Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Phe Phe Glu Lys Phe Lys Glu
 1 5 10 15

Phe Phe

<210> 9

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса A

<400> 9

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
 1 5 10 15

Phe Phe

<210> 10

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса A

<400> 10

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu
 1 5 10 15

Ala Phe

<210> 11

<211> 18
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> синтетический или рекомбинантный пептид класса A

<400> 11

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Leu Lys Glu
 1 5 10 15

Phe Phe

<210> 12
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> синтетический или рекомбинантный пептид класса A

<400> 12

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu
 1 5 10 15

Phe Phe

<210> 13
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> синтетический или рекомбинантный пептид класса A

<400> 13

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu
 1 5 10 15

Phe Phe

<210> 14
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> синтетический или рекомбинантный пептид класса A

<400> 14

Glu Trp Leu Lys Leu Phe Tyr Glu Lys Val Leu Glu Lys Phe Lys Glu
 1 5 10 15

Ala Phe

<210> 15

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 15

Glu	Trp	Leu	Lys	Ala	Phe	Tyr	Asp	Lys	Val	Ala	Glu	Lys	Phe	Lys	Glu
1				5					10					15	

Ala Phe

<210> 16

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 16

Glu	Trp	Leu	Lys	Ala	Phe	Tyr	Asp	Lys	Val	Ala	Glu	Lys	Leu	Lys	Glu
1				5					10					15	

Phe Phe

<210> 17

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 17

Glu	Trp	Leu	Lys	Ala	Phe	Tyr	Asp	Lys	Val	Phe	Glu	Lys	Phe	Lys	Glu
1				5					10					15	

Ala Phe

<210> 18

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 18

Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Leu Lys Glu
 1 5 10 15

Phe Phe

<210> 19

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 19

Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu
 1 5 10 15

Phe Phe

<210> 20

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 20

Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu
 1 5 10 15

Phe Phe

<210> 21

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 21

Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu Ala Phe
 1 5 10

<210> 22

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 22

Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu Ala Phe
 1 5 10

<210> 23

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 23

Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu Ala Phe
 1 5 10

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 24

Ala Phe Tyr Asp Lys Phe Phe Glu Lys Phe Lys Glu Phe Phe
 1 5 10

<210> 25

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 25

Ala Phe Tyr Asp Lys Phe Phe Glu Lys Phe Lys Glu Phe Phe
 1 5 10

<210> 26

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 26

Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu Ala Phe
 1 5 10

<210> 27

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса A

<400> 27

Ala	Phe	Tyr	Asp	Lys	Val	Ala	Glu	Lys	Leu	Lys	Glu	Phe	Phe
1				5					10				

<210> 28

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса A

<400> 28

Ala	Phe	Tyr	Asp	Lys	Val	Phe	Glu	Lys	Phe	Lys	Glu	Ala	Phe
1				5					10				

<210> 29

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса A

<400> 29

Ala	Phe	Tyr	Asp	Lys	Val	Phe	Glu	Lys	Leu	Lys	Glu	Phe	Phe
1				5					10				

<210> 30

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса A

<400> 30

Ala	Phe	Tyr	Asp	Lys	Val	Ala	Glu	Lys	Phe	Lys	Glu	Phe	Phe
1				5					10				

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса A

<400> 31

Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu Phe
 1 5 10

<210> 32

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса A

<400> 32

Leu Phe Tyr Glu Lys Val Leu Glu Lys Phe Lys Glu Ala Phe
 1 5 10

<210> 33

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса A

<400> 33

Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu Ala Phe
 1 5 10

<210> 34

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса A

<400> 34

Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu Phe Phe
 1 5 10

<210> 35

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса A

<400> 35

Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu Ala Phe
 1 5 10

<210> 36
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 36

Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Leu Lys Glu Phe Phe
 1 5 10

<210> 37
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 37

Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu Phe Phe
 1 5 10

<210> 38
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 38

Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu Phe Phe
 1 5 10

<210> 39
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 39

Asp Trp Leu Lys Ala Leu Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
 1 5 10 15

Ala Leu

<210> 40
 <211> 18
 <212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 40

Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
1 5 10 15

Phe Phe

<210> 41

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 41

Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Phe Phe Glu Lys Phe Lys Glu
1 5 10 15

Phe Phe

<210> 42

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 42

Glu Trp Leu Lys Ala Leu Tyr Glu Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
1 5 10 15

Ala Leu

<210> 43

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 43

Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
1 5 10 15

Ala Phe

<210> 44
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 44

Glu Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
 1 5 10 15

Phe Phe

<210> 45
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 45

Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu
 1 5 10 15

Phe Phe

<210> 46
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 46

Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Phe Phe Glu Lys Phe Lys Glu
 1 5 10 15

Phe Phe

<210> 47
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 47

Glu Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Phe Phe Glu Lys Phe Lys Glu
 1 5 10 15

Phe Phe

<210> 48

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 48

Asp phe Leu Lys Ala Trp Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
1 5 10 15

Ala Trp

<210> 49

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 49

Glu Phe Leu Lys Ala Trp Tyr Glu Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
1 5 10 15

Ala Trp

<210> 50

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 50

Asp Phe Trp Lys Ala Trp Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
1 5 10 15

Trp Trp

<210> 51

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 51

Glu Phe Trp Lys Ala Trp Tyr Glu Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
 1 5 10 15

Trp Trp

<210> 52

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 52

Asp Lys Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Trp Ala Lys Glu
 1 5 10 15

Ala Phe

<210> 53

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 53

Asp Lys Trp Lys Ala Val Tyr Asp Lys Phe Ala Glu Ala Phe Lys Glu
 1 5 10 15

Phe Leu

<210> 54

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 54

Glu Lys Leu Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Val Phe Glu Trp Ala Lys Glu
 1 5 10 15

Ala Phe

<210> 55

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 55

Glu Lys Trp Lys Ala Val Tyr Glu Lys Phe Ala Glu Ala Phe Lys Glu
 1 5 10 15

Phe Leu

<210> 56

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса A

<400> 56

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Val Asp Lys Phe Ala Glu Lys Phe Lys Glu
 1 5 10 15

Ala Tyr

<210> 57

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса A

<400> 57

Glu Lys Trp Lys Ala Val Tyr Glu Lys Phe Ala Glu Ala Phe Lys Glu
 1 5 10 15

Phe Leu

<210> 58

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса A

<400> 58

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Val Tyr Asp Lys Val Phe Lys Leu Lys Glu
 1 5 10 15

Phe Phe

<210> 59

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 59

Glu Trp Leu Lys Ala Phe Val Tyr Glu Lys Val Phe Lys Leu Lys Glu
1 5 10 15

Phe Phe

<210> 60

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 60

Asp Trp Leu Arg Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
1 5 10 15

Ala Phe

<210> 61

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 61

Glu Trp Leu Arg Ala Phe Tyr Glu Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
1 5 10 15

Ala Phe

<210> 62

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 62

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Arg Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
1 5 10 15

Ala Phe

<210> 63

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 63

Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Glu Arg Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
1 5 10 15

Ala Phe

<210> 64

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 64

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Arg Leu Lys Glu
1 5 10 15

Ala Phe

<210> 65

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 65

Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Val Ala Glu Arg Leu Lys Glu
1 5 10 15

Ala Phe

<210> 66

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

 $\langle 220 \rangle$

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 66

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Arg Glu
1 5 10 15

Ala Phe

<210> 67

<400> 67

<400> 68

<400> 69

<400> 70

<210> 71
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 71

Glu Trp Leu Arg Ala Phe Tyr Glu Lys Val Ala Glu Lys Leu Arg Glu
 1 5 10 15

Ala Phe

<210> 72
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 72

Asp Trp Leu Arg Ala Phe Tyr Asp Arg Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
 1 5 10 15

Ala Phe

<210> 73
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 73

Glu Trp Leu Arg Ala Phe Tyr Glu Arg Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
 1 5 10 15

Ala Phe

<210> 74
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 74

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Arg Leu Arg Glu
 1 5 10 15

Ala Phe

<210> 75

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 75

Glu	Trp	Leu	Lys	Ala	Phe	Tyr	Glu	Lys	Val	Ala	Glu	Arg	Leu	Arg	Glu
1			5						10					15	

Ala Phe

<210> 76

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 76

Asp	Trp	Leu	Arg	Ala	Phe	Tyr	Asp	Lys	Val	Ala	Glu	Arg	Leu	Lys	Glu
1			5						10					15	

Ala Phe

<210> 77

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 77

Glu	Trp	Leu	Arg	Ala	Phe	Tyr	Glu	Lys	Val	Ala	Glu	Arg	Leu	Lys	Glu
1			5						10					15	

Ala Phe

<210> 78

<211> 37

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 78

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
 1 5 10 15
 Ala Phe Pro Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys
 20 25 30
 Leu Lys Glu Ala Phe
 35

<210> 79

<211> 37

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса A

<400> 79

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
 1 5 10 15
 Phe Phe Pro Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys
 20 25 30
 Leu Lys Glu Phe Phe
 35

<210> 80

<211> 37

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса A

<400> 80

Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
 1 5 10 15
 Ala Phe Pro Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys
 20 25 30
 Leu Lys Glu Ala Phe
 35

<210> 81

<211> 37

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса A

<400> 81

Asp Lys Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Trp Ala Lys Glu
 1 5 10 15
 Ala Phe Pro Asp Lys Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Trp
 20 25 30
 Leu Lys Glu Ala Phe
 35

<210> 82

<211> 37

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 82

```

Asp Lys Trp Lys Ala Val Tyr Asp Lys Phe Ala Glu Ala Phe Lys Glu
1          5          10          15
Phe Leu Pro Asp Lys Trp Lys Ala Val Tyr Asp Lys Phe Ala Glu Ala
          20          25          30
Phe Lys Glu Phe Leu
          35

```

<210> 83

<211> 37

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 83

```

Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu
1          5          10          15
Ala Phe Pro Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys
          20          25          30
Phe Lys Glu Ala Phe
          35

```

<210> 84

<211> 37

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 84

```

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Val Tyr Asp Lys Val Phe Lys Leu Lys Glu
1          5          10          15
Phe Phe Pro Asp Trp Leu Lys Ala Phe Val Tyr Asp Lys Val Phe Lys
          20          25          30
Leu Lys Glu Phe Phe
          35

```

<210> 85

<211> 37

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<400> 85

```

Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Phe Ala Glu Lys Phe Lys Glu
1      5      10      15
Phe Phe Pro Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Phe Ala Glu Lys
20      25      30
Phe Lys Glu Phe Phe
35

```

<210> 86

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Хаа означает аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту или их гомологи или аналоги

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> Хаа означает триптофан, фенилаланин, аланин, лейцин, тирозин, изолейцин, валин, σ -нафтилаланин или их гомологи или аналоги

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Хаа означает лизин или аргинин

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Хаа означает серин, треонин, аланин, глицин, гистидин или их гомологи или аналоги

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> Хаа означает триптофан, фенилаланин, аланин, лейцин, тирозин, изолейцин, валин, σ -нафтилаланин или их гомологи или аналоги

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Хаа означает аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту или их гомологи или аналоги

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> Хаа означает лизин или аргинин

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(11)

<223> Хаа означает триптофан, фенилаланин, аланин, лейцин, тирозин, изолейцин, валин, σ -нафтилаланин или их гомологи или аналоги

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> Хаа означает аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту или их гомологи или аналоги

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> Хаа означает серин, треонин, аланин, глицин, гистидин или их гомологи или аналоги

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> Хаа означает триптофан, фенилаланин, аланин, лейцин, тирозин, изолейцин, валин, σ -нафтилаланин или их гомологи или аналоги

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> Хаа означает серин, треонин, аланин, глицин, гистидин или их гомологи или аналоги

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> Хаа означает аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту или их гомологи или аналоги

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> Хаа означает триптофан, фенилаланин, аланин, лейцин, тирозин, изолейцин, валин, σ -нафтилаланин или их гомологи или аналоги

<400> 86

Хаа	Хаа	Хаа	Хаа	Хаа	Хаа	Хаа	Хаа	Хаа	Хаа	Хаа	Хаа	Хаа	Хаа	Хаа	Хаа
1				5					10					15	

Хаа Хаа

<210> 87

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетический или рекомбинантный пептид класса А

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Хаа означает аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту или их гомологи или

аналоги

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Хаа означает аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту или их гомологи или аналоги

<220>

<221> misc_feafcure

<222> (12)..(12)

<223> Хаа означает аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту или их гомологи или аналоги

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> Хаа означает аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту или их гомологи или аналоги

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> Хаа означает триптофан, фенилаланин, аланин, лейцин, тирозин, изолейцин, валин, α -нафтилаланин или их гомологи или аналоги

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> Хаа означает триптофан, фенилаланин, аланин, лейцин, тирозин, изолейцин, валин, α -нафтилаланин или их гомологи или аналоги

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(11)

<223> Хаа означает триптофан, фенилаланин, аланин, лейцин, тирозин, изолейцин, валин, α -нафтилаланин или их гомологи или аналоги

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> Хаа означает триптофан, фенилаланин, аланин, лейцин, тирозин, изолейцин, валин, α -нафтилаланин или их гомологи или аналоги

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> Хаа означает триптофан, фенилаланин, аланин, лейцин, тирозин, изолейцин, валин, α -нафтилаланин или их гомологи или аналоги

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Хаа означает лизин или аргинин

<220>

<221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Хаа означает лизин или аргинин

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Хаа означает лизин или аргинин

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> Хаа означает лизин или аргинин

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа означает серин, треонин, аланин, глицин, гистидин или их гомологи или аналоги

 <400> 87

 Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа
 1 5 10 15

 Хаа Хаа

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид, уменьшающий интенсивность симптома атеросклероза, содержащий последовательность аминокислот D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F (SEQ ID NO:5) и содержащий по меньшей мере один остаток D-аминокислоты.
2. Пептид по п.1, отличающийся тем, что он смешан с фармакологически приемлемым наполнителем.
3. Пептид по п.1, отличающийся тем, что он смешан с фармакологически приемлемым наполнителем, пригодным для перорального введения млекопитающему.
4. Пептид по п.1, отличающийся тем, что все энантиомерные аминокислоты представлены D-аминокислотами.
5. Пептид по п.1, отличающийся тем, что дополнительно содержит защитную группу, присоединенную к аминоконцу или карбоксильному концу.
6. Пептид по п.5, отличающийся тем, что указанная защитная группа представляет собой защитную группу, выбранную из группы, состоящей из ацетила (Ac), амида, алкильных групп, содержащих от 3 до 20 атомов углерода, Fмос, t-бутоксикарбонила (Tbos), 9-флуоренацетильной группы, 1-флуоренкарбоксильной группы, 9-флуоренкарбоксильной группы, 9-флуоренон-1-карбоксильной группы, бензилоксикарбонила, ксантила (Xan), тритила (Trt), 4-метилтритила (Mtt), 4-метокситритила (Mmt), 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонила (Mtr), мезитилен-2-сульфонила (Mts), 4,4-диметоксибензгидрила (Mbh), тозила (Tos), 2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-сульфонила (Pmc), 4-метилбензила (MeBzl), 4-метоксибензила (MeOBzl), бензилоксигруппы (BzlO), бензила (Bzl), бензоила (Bz), 3-нитро-2-пиридинсульфенила (Npys), 1-(4,4-диметил-2,6-диаксоциклогексиден)этила (Dde), 2,6-дихлорбензила (2,6-ди-Cl-Bzl), 2-хлорбензилоксикарбонила (2-Cl-Z), 2-бромбензилоксикарбонила (2-Br-Z), бензилоксиметила (Bom), циклогексиксигруппы (сHxO), t-бутоксиметила (Bum), t-бутоксигруппы (tBuO), t-бутила (tBu) и трифторацетила (TFA).
7. Пептид по п.5, отличающийся тем, что он содержит защитную группу, присоединенную к аминоконцу, и указанная аминоконцевая защитная группа представляет собой защитную группу, выбранную из группы, состоящей из ацетила, пропеонила и алкила, содержащего от 3 до 20 атомов углерода.
8. Пептид по п.1, отличающийся тем, что он содержит защитную группу, присоединенную к карбоксильному концу, и указанная карбоксильная концевая защитная группа представлена амидом.
9. Пептид по п.5, отличающийся тем, что дополнительно содержит первую защитную группу, присоединенную к аминоконцу, и вторую защитную группу, присоединенную к карбоксильному концу.
10. Пептид по п.9, отличающийся тем, что содержит первую защитную группу, присоединенную к аминоконцу, где указанная защитная группа представляет собой защитную группу, выбранную из группы, состоящей из ацетила, пропеонила и алкила, содержащего от 3 до 20 атомов углерода, и вторую защитную группу, присоединенную к карбоксильному концу, и указанная карбоксильная концевая защитная группа представлена амидом.
11. Пептид по п.10, отличающийся тем, что все энантиомерные аминокислоты представлены D-аминокислотами.

12. Пептид по п.1, отличающийся тем, что более чем половина энантиомерных аминокислот указанного пептида представлены D-аминокислотами.

13. Пептид по п.10, отличающийся тем, что указанная первая защитная группа представляет собой ацетильную группу и вторая защитная группа представляет собой амид.

14. Пептид по п.1, отличающийся тем, что указанный пептид имеет формулу: P^1 -D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F- P^2 , где P^1 и P^2 являются защитными группами, и все указанные аминокислоты указанного пептида являются D-аминокислотами.

15. Пептид по п.14, отличающийся тем, что P^1 представляет собой ацетильную группу и P^2 представляет собой амид.

16. Композиция для введения млекопитающему, уменьшающая интенсивность симптома атеросклероза, отличающаяся тем, что она содержит фармакологически приемлемый наполнитель и пептид, содержащий аминокислотную последовательность D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F (SEQ ID NO: 5), при этом указанный пептид содержит по крайней мере один D-аминокислотный остаток и где указанный пептид содержит первую защитную группу, присоединенную к аминоконцу, и вторую защитную группу, присоединенную к карбоксильному концу.

17. Композиция по п.16, отличающаяся тем, что указанная первая защитная группа и указанная вторая защитная группа независимо выбраны из группы, состоящей из ацетила (Ac), амида, алкильных групп, содержащих от 3 до 20 атомов углерода, Fmoc, t-бутоксикарбонила (Tboc), 9-флуоренацетильной группы, 1-флуоренкарбоксильной группы, 9-флуоренкарбоксильной группы, 9-флуоренон-1-карбоксильной группы, бензилоксикарбонила, ксантила (Xan), тритила (Trt), 4-метилтритила (Mtt), 4-метокситритила (Mmt), 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонила (Mtr), мезитилен-2-сульфонила (Mts), 4,4-диметоксибензгидрила (Mbh), тозила (Tos), 2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-сульфонила (Pmc), 4-метилбензила (MeBzl), 4-метоксибензила (MeOBzl), бензилоксигруппы (BzlO), бензила (Bzl), бензоила (Bz), 3-нитро-2-пиридинсульфенила (Npys), 1-(4,4-диметил-2,6-диаксоциклогексидил)этила (Dde), 2,6-дихлорбензила (2,6-ди-Cl-Bzl), 2-хлорбензилоксикарбонила (2-Cl-Z), 2-бромбензилоксикарбонила (2-Br-Z), бензилоксиметила (Bom), циклогексилоксигруппы (cHxO), t-бутоксиметила (Bum), t-бутоксигруппы (tBuO), t-бутила (tBu) и трифторацетила (TFA).

18. Композиция по п.16, отличающаяся тем, что первая защитная группа представлена ацетилом.

19. Композиция по п.16, отличающаяся тем, что вторая защитная группа представлена амидом.

20. Композиция по п.16, отличающаяся тем, что более половины энантиомерных аминокислот, входящих в состав указанного пептида, представлены D-аминокислотами.

21. Композиция по п.16, отличающаяся тем, что все энантиомерные аминокислоты, входящие в состав указанного пептида, представлены D-аминокислотами.

22. Композиция по п.16, отличающаяся тем, что указанный наполнитель представляет собой наполнитель, пригодный для перорального введения.

23. Композиция по п.16, отличающаяся тем, что указанный наполнитель представляет собой наполнитель, пригодный для инъекции.

24. Композиция по п.16, отличающаяся тем, что указанный пептид состоит из множества остатков D-аминокислот.

25. Композиция по п.16, отличающаяся тем, что указанный пептид имеет формулу P^1 -D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F- P^2 , где P^1 и P^2 являются защитными группами, и все указанные аминокислоты указанного пептида являются D-аминокислотами.

26. Композиция по п.25, отличающаяся тем, что P^1 представляет собой ацетильную группу и P^2 представляет собой амид.

27. Способ уменьшения интенсивности симптома атеросклероза, отличающийся тем, что в организм перорально вводят пептид, содержащий аминокислотную последовательность D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F (SEQ ID NO: 5), при этом указанный пептид содержит по крайней мере один D-аминокислотный остаток.

28. Способ по п.27, отличающийся тем, что у указанного организма диагностирован по меньшей мере один симптом атеросклероза.

29. Способ по п.27, отличающийся тем, что у указанного организма диагностирован риск развития атеросклероза.

30. Способ по п.27, отличающийся тем, что указанный организм представлен человеком.

31. Способ по п.27, отличающийся тем, что указанный организм представлен млекопитающим животным.

32. Способ по п.27, отличающийся тем, что используют пептид, дополнительно содержащий защитную группу, присоединенную к аминоконцу или карбоксильному концу.

33. Способ по п.32, отличающийся тем, что указанную защитную группу выбирают из группы, состоящей из ацетила (Ac), амида, алкильных групп, содержащих от 3 до 20 атомов углерода, Fmoc, t-бутоксикарбонила (Tboc), 9-флуоренацетильной группы, 1-флуоренкарбоксильной группы, 9-флуоренкарбоксильной группы, 9-флуоренон-1-карбоксильной группы, бензилоксикарбонила, ксантила (Xan), тритила (Trt), 4-метилтритила (Mtt), 4-метокситритила (Mmt), 4-метокси-2,3,6-триметил-

бензолсульфонила (Mtr), мезитилен-2-сульфонила (Mts), 4,4-диметоксибензгидрила (Mbh), тозила (Tos), 2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-сульфонила (Pmc), 4-метилбензила (MeBzl), 4-метоксибензила (MeOBzl), бензилоксигруппы (BzlO), бензила (Bzl), бензоила (Bz), 3-нитро-2-пиридинсульфенила (Npys), 1-(4,4-диметил-2,6-диаксоциклогексиден)этила (Dde), 2,6-дихлорбензила (2,6-ди-Cl-Bzl), 2-хлорбензилокси-карбонила (2-Cl-Z), 2-бромбензилоксикарбонила (2-Br-Z), бензилоксиметила (Bom), циклогексилокси-группы (сHxO), t-бутоксиметила (Bum), t-бутоксигруппы (tBuO), t-бутила (tBu) и трифторацетила (TFA).

34. Способ по п.27, отличающийся тем, что используют пептид, дополнительно содержащий первую защитную группу, присоединенную к аминоконцу, которая представляет собой ацетильную группу и вторую защитную группу, присоединенную к карбоксильному концу, которая представляет собой амид.

35. Способ по п.27, отличающийся тем, что указанный пептид смешивают с фармакологическим наполнителем.

36. Способ по п.27, отличающийся тем, что указанный пептид смешивают с фармакологическим наполнителем, пригодным для перорального введения млекопитающему.

37. Способ по п.27, отличающийся тем, что указанный пептид имеет формулу P^1 -D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F- P^2 , где P^1 и P^2 являются защитными группами, и все указанные аминокислоты указанного пептида являются D-аминокислотами.

38. Способ по п.37, отличающийся тем, что P^1 представляет собой ацетильную группу и P^2 представляет собой амид.

39. Способ уменьшения интенсивности симптома атеросклероза, отличающийся тем, что в организм перорально вводят пептид, содержащий аминокислотную последовательность D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F (SEQ ID NO: 5), при этом указанный пептид содержит по крайней мере один D-аминокислотный остаток.

40. Способ по п.39, отличающийся тем, что используют пептид, дополнительно содержащий защитную группу, присоединенную к аминоконцу или карбоксильному концу.

41. Способ по п.40, отличающийся тем, что указанную защитную группу выбирают из группы, состоящей из ацетила, $CH_3-(CH_2)_n-CO-$, где n находится в интервале от 1 до 20, и амида.

42. Способ по п.40, отличающийся тем, что указанный пептид дополнительно содержит первую защитную группу, присоединенную к аминоконцу, и вторую защитную группу, присоединенную к карбоксильному концу.

43. Способ по п.42, отличающийся тем, что указанная первая защитная группа и указанная вторая защитная группа независимо выбраны из группы, состоящей из ацетила (Ac), амида, алкильных групп, содержащих от 3 до 20 атомов углерода, Fmoc, t-бутоксикарбонила (Tboc), 9-флуоренацетильной группы, 1-флуоренкарбоксильной группы, 9-флуоренкарбоксильной группы, 9-флуоренон-1-карбоксильной группы, бензилоксикарбонила, ксантила (Xan), тритила (Trt), 4-метилтрита (Mtt), 4-метокситрита (Mmt), 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонила (Mtr), мезитилен-2-сульфонила (Mts), 4,4-диметоксибензгидрила (Mbh), тозила (Tos), 2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-сульфонила (Pmc), 4-метилбензила (MeBzl), 4-метоксибензила (MeOBzl), бензилоксигруппы (BzlO), бензила (Bzl), бензоила (Bz), 3-нитро-2-пиридинсульфенила (Npys), 1-(4,4-диметил-2,6-диаксоциклогексиден)этила (Dde), 2,6-дихлорбензила (2,6-ди-Cl-Bzl), 2-хлорбензилоксикарбонила (2-Cl-Z), 2-бромбензилоксикарбонила (2-Br-Z), бензилоксиметила (Bom), циклогексилоксигруппы (сHxO), t-бутоксиметила (Bum), t-бутоксигруппы (tBuO), t-бутила (tBu) и трифторацетила (TFA).

44. Способ по п.43, отличающийся тем, что в качестве первой защитной группы используют ацетил.

45. Способ по п.43, отличающийся тем, что в качестве второй защитной группы используют амид.

46. Способ по п.43, отличающийся тем, что указанная первая защитная группа представляет собой ацетильную группу и вторая защитная группа представляет собой амид.

47. Способ по п.43, отличающийся тем, что более чем половина энантиомерных аминокислот указанного пептида представлены D-аминокислотами.

48. Способ по п.43, отличающийся тем, что все энантиомерные аминокислоты указанного пептида представлены D-аминокислотами.

49. Способ по п.46, отличающийся тем, что все энантиомерные аминокислоты указанного пептида представлены D-аминокислотами.

50. Способ уменьшения интенсивности симптома атеросклероза, отличающийся тем, что в организм перорально вводят пептид, содержащий аминокислотную последовательность D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F (SEQ ID NO: 5), при этом указанный пептид содержит по крайней мере один D-аминокислотный остаток и где указанный пептид содержит первую защитную группу, присоединенную к аминоконцу, и вторую защитную группу, присоединенную к карбоксильному концу.

51. Способ по п.50, отличающийся тем, что у указанного организма диагностирован по меньшей мере один или более симптомов атеросклероза.

52. Способ по п.50, отличающийся тем, что у указанного организма диагностирован риск развития атеросклероза.

53. Способ по п.50, отличающийся тем, что указанный организм представлен человеком.

54. Способ по п.50, отличающийся тем, что указанный организм является млекопитающим животным.
55. Способ по п.50, отличающийся тем, что указанную защитную группу выбирают из группы, состоящей из ацетила, $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n\text{-CO-}$, где n находится в интервале от 1 до 20, и амида.
56. Способ по п.50, отличающийся тем, что первая защитная группа представлена ацетиллом.
57. Способ по п.50, отличающийся тем, что вторая защитная группа представлена амидом.
58. Способ по п.50, отличающийся тем, что в качестве указанной композиции используют композицию, дополнительно содержащую фармацевтически приемлемый наполнитель.
59. Способ по п.58, отличающийся тем, что выбирают наполнитель, пригодный для перорального введения.
60. Способ по п.50, отличающийся тем, что указанный пептид содержит множество остатков D-аминокислот.
61. Способ по п.50, отличающийся тем, что указанный пептид имеет формулу: $\text{P}^1\text{-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-P}^2$, где P^1 и P^2 являются защитными группами и все указанные аминокислоты указанного пептида являются D-аминокислотами.
62. Способ по п.61, отличающийся тем, что P^1 представляет собой ацетильную группу и P^2 представляет собой амид.
63. Набор для уменьшения интенсивности симптома атеросклероза, отличающийся тем, что он включает в себя контейнер, содержащий пептид, содержащий последовательность аминокислот D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F (SEQ ID NO: 5) и содержащий по меньшей мере один остаток D-аминокислоты.
64. Набор по п.63, отличающийся тем, что указанный пептид объединен с фармацевтически приемлемым наполнителем в унифицированном лекарственном препарате.
65. Набор по п.64, отличающийся тем, что указанный унифицированный лекарственный препарат предназначен для перорального введения.
66. Набор по п.63, отличающийся тем, что он дополнительно содержит инструкционные материалы, разъясняющие применение указанного пептида для уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома атеросклероза.
67. Набор для уменьшения интенсивности симптома атеросклероза, отличающийся тем, что он включает в себя контейнер, содержащий композицию, пригодную для перорального введения, уменьшающую интенсивность симптома атеросклероза, причем указанная композиция содержит пептид, содержащий аминокислотную последовательность D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F (SEQ ID NO: 5), при этом указанный пептид содержит по крайней мере один D аминокислотный остаток и где указанный пептид имеет первую защитную группу, присоединенную к аминоконцу, и вторую защитную группу, присоединенную к карбоксильному концу.
68. Набор по п.67, отличающийся тем, что указанный пептид объединен с фармацевтически приемлемым наполнителем в унифицированном лекарственном препарате.
69. Набор по п.67, отличающийся тем, что он дополнительно содержит инструкционные материалы, разъясняющие применение указанного пептида для уменьшения интенсивности по меньшей мере одного или более симптомов атеросклероза.
70. Набор по п.67, отличающийся тем, что указанный пептид имеет формулу: $\text{P}^1\text{-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-P}^2$, где P^1 и P^2 являются защитными группами и все указанные аминокислоты указанного пептида являются D-аминокислотами.
71. Набор по п.70, отличающийся тем, что P^1 представляет собой ацетильную группу и P^2 представляет собой амид.
72. Способ облегчения или предупреждения коронарного осложнения, связанного с ответной реакцией острой фазы на воспаление у млекопитающего, где указанное коронарное осложнение является симптомом атеросклероза, отличающийся тем, что млекопитающему, у которого имеется ответная реакция острой фазы или с риском возникновения ответной реакции острой фазы, вводят полипептид по любому из пп.1-15.
73. Способ по п.72, отличающийся тем, что указанное введение осуществляют методом, выбранным из группы, состоящей из перорального введения, назального введения, ректального введения, внутривенной инъекции и внутрисосудистой инъекции, подкожной инъекции, чрескожного введения и внутримышечной инъекции.
74. Способ по п.72, отличающийся тем, что указанный полипептид вводят в комбинации с таким же полипептидом, содержащим только L-формы.
75. Способ по п.72, отличающийся тем, что указанный полипептид используют в виде унифицированного препарата в фармацевтически приемлемом наполнителе.
76. Способ по п.72, отличающийся тем, что ответная реакция острой фазы является воспалительной реакцией, связанной с рецидивом воспалительного заболевания.
77. Способ по п.73, отличающийся тем, что ответная реакция острой фазы связана с заболеванием, выбранным из группы, состоящей из лепры, туберкулеза, системной красной волчанки, ревматической

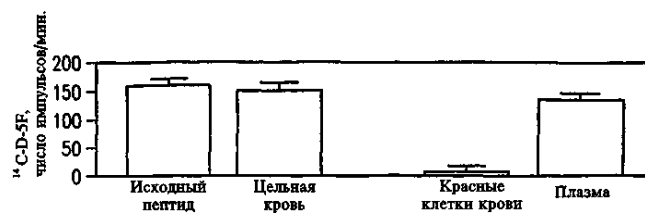
полимиалгии, нодозного полиартериита, склеродермы, идиопатического легочного фиброза, хронического обструктивного легочного заболевания, болезни Альцгеймера, СПИДа, кальцификации коронарной артерии, кальцификационного аортального стеноза, остеопороза и ревматоидного артрита.

78. Способ по п.72, отличающийся тем, что ответная реакция острой фазы представлена воспалительной реакцией, связанной с состоянием, выбранным из группы, состоящей из бактериальной инфекции, вирусной инфекции, грибковой инфекции, трансплантатом органа, раной, имплантированным протезом, паразитарной инфекцией, сепсисом, синдромом эндотоксического шока и образованием биопленки.

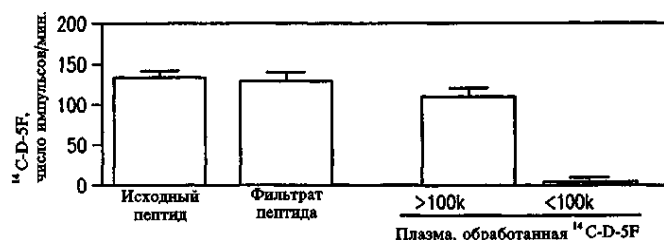
79. Способ облегчения или предупреждения коронарного осложнения, связанного с ответной реакцией острой фазы на воспаление у млекопитающего, где указанное коронарное осложнение является симптомом атеросклероза, отличающийся тем, что у млекопитающего проводят анализ уровня белка острой фазы (APR), указывающего на ответную реакцию острой фазы или значительный риск возникновения ответной реакции острой фазы, и млекопитающему с уровнем белка острой фазы (APR), указывающим на ответную реакцию острой фазы, вводят полипептид по любому из пп.1-15.

80. Способ по п.79, отличающийся тем, что указанный белок острой фазы (APR) представляет собой положительный APR, выбранный из группы, состоящей из сывороточного амилоида А, с-реактивного белка, компонента сывороточного амилоида Р, белка комплемента С2, белка комплемента С3, белка комплемента С4, белка комплемента С5, белка комплемента С9, белка комплемента В, ингибитора С1, связывающего белка С4, фибриногена, фактора фон Виллебранда, $\alpha 1$ -антитрипсина, $\alpha 1$ -антихимотрипсина, $\alpha 1$ -антиплазмина, гепаринового кофактора II, ингибитора I активатора плазминогена, гаптоглобина, гемопексина, церулоплазмينا, магний-супероксид-дисмутаза, $\alpha 1$ -кислого гликопротеина, гемоксигеназы, маннозасвязывающего белка, лейкоцитарного белка I, липопротеина (а) и липополисахаридсвязывающего белка.

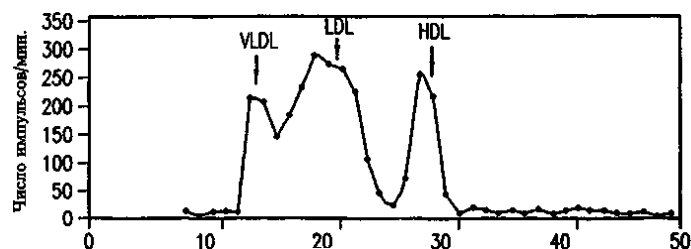
81. Способ по п.79, отличающийся тем, что указанный белок острой фазы (APR) является негативным APR, выбранным из группы, состоящей из альбумина, преальбумина, трансферина, ароАI, ароАII, $\alpha 2$ -HS-гликопротеина, ингибитора интер- α -трипсина, гликопротеина, обогащенного гистидином.



Фиг. 1А



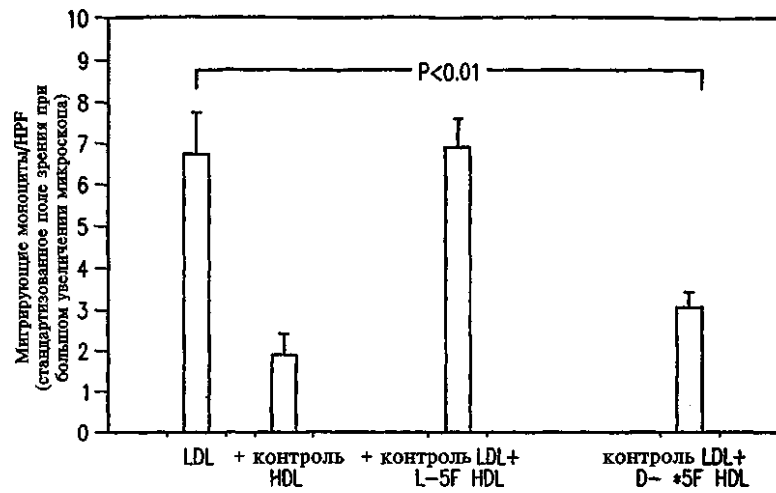
Фиг. 1В



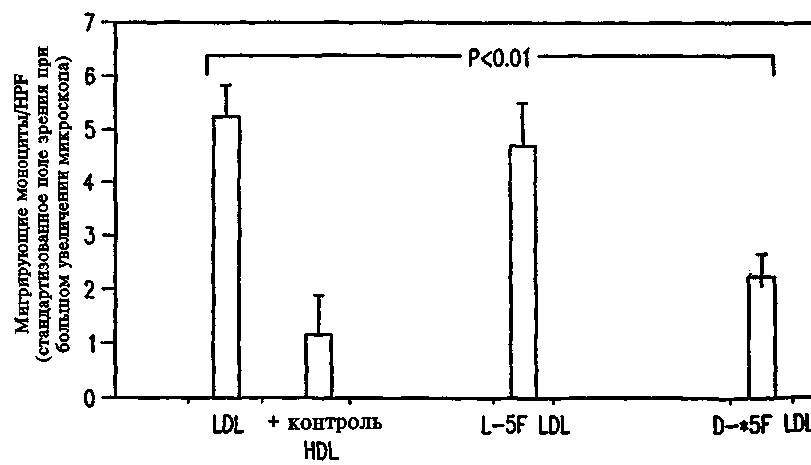
Фиг. 1С



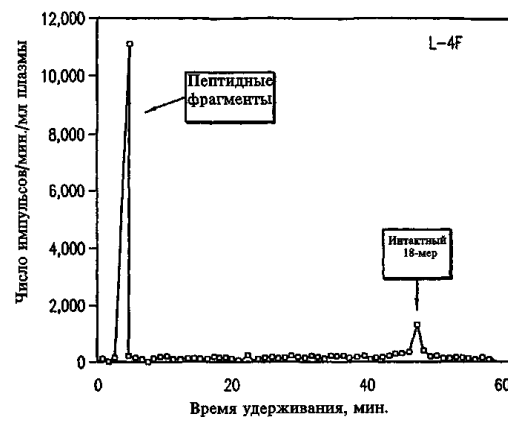
Фиг. 1D



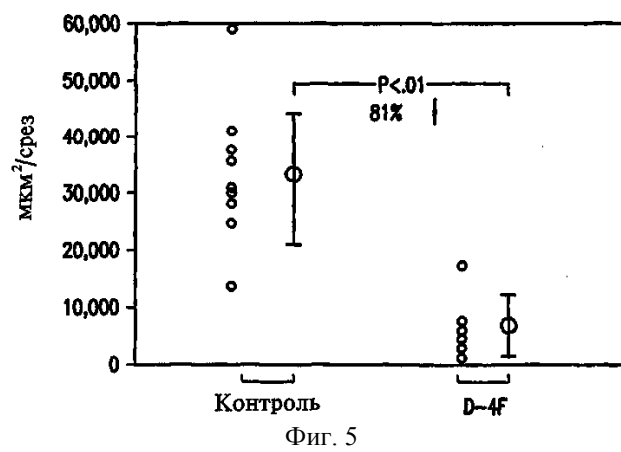
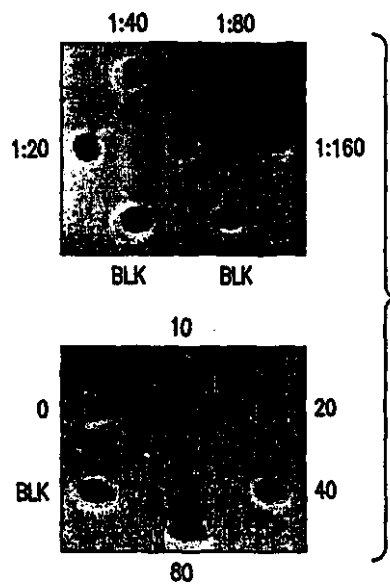
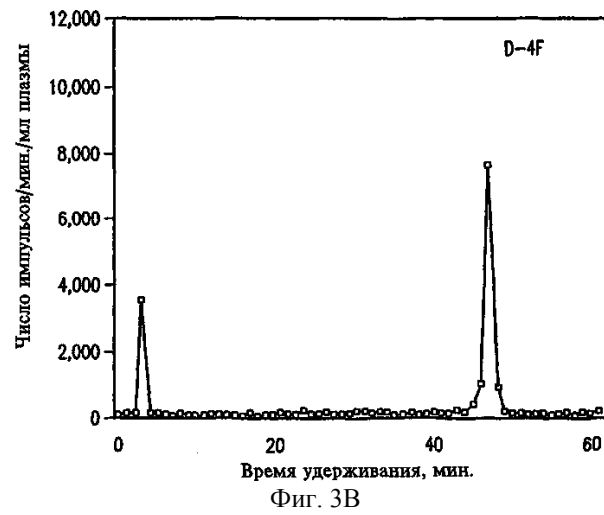
Фиг. 2A

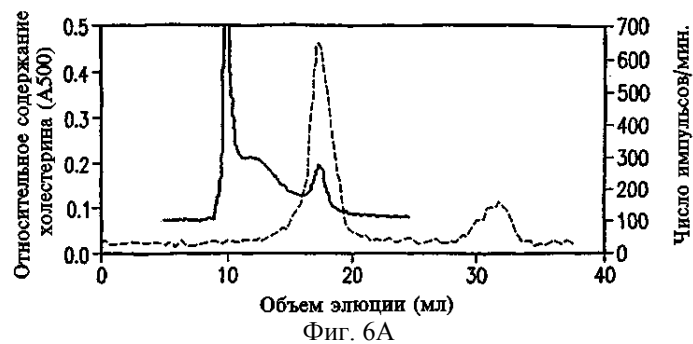


Фиг. 2B

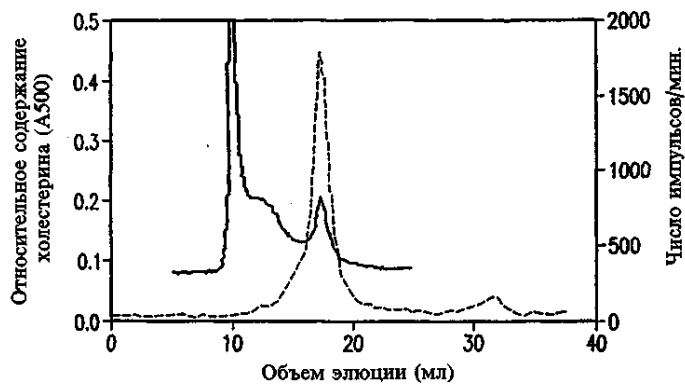


Фиг. 3A

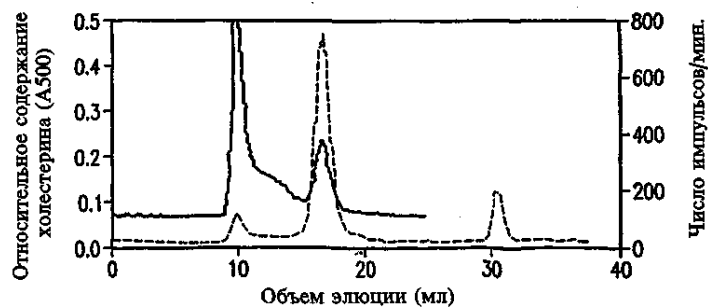




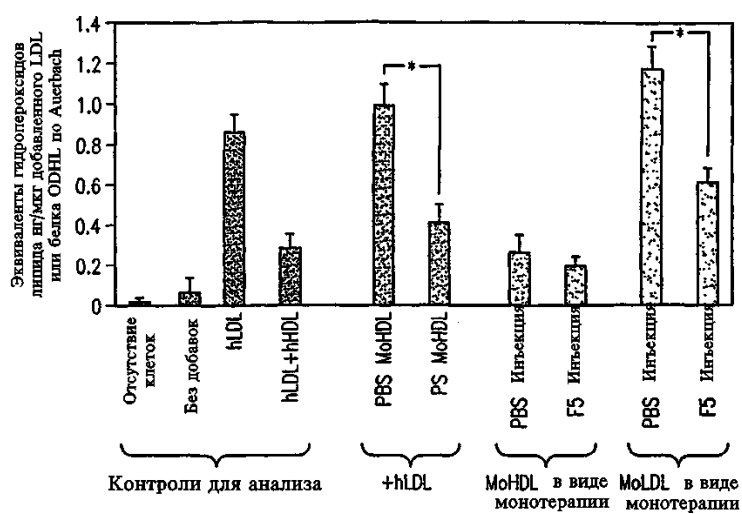
Фиг. 6А



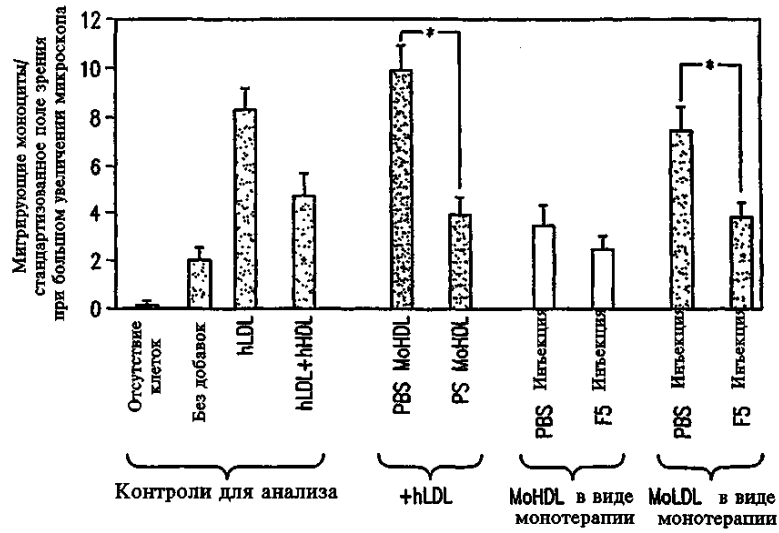
Фиг. 6В



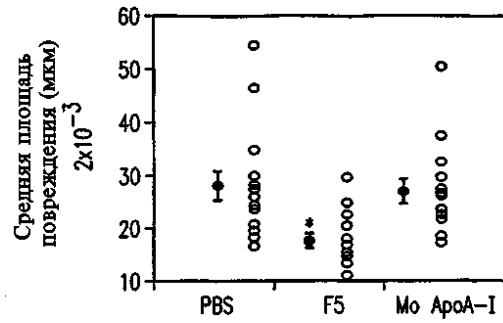
Фиг. 6С



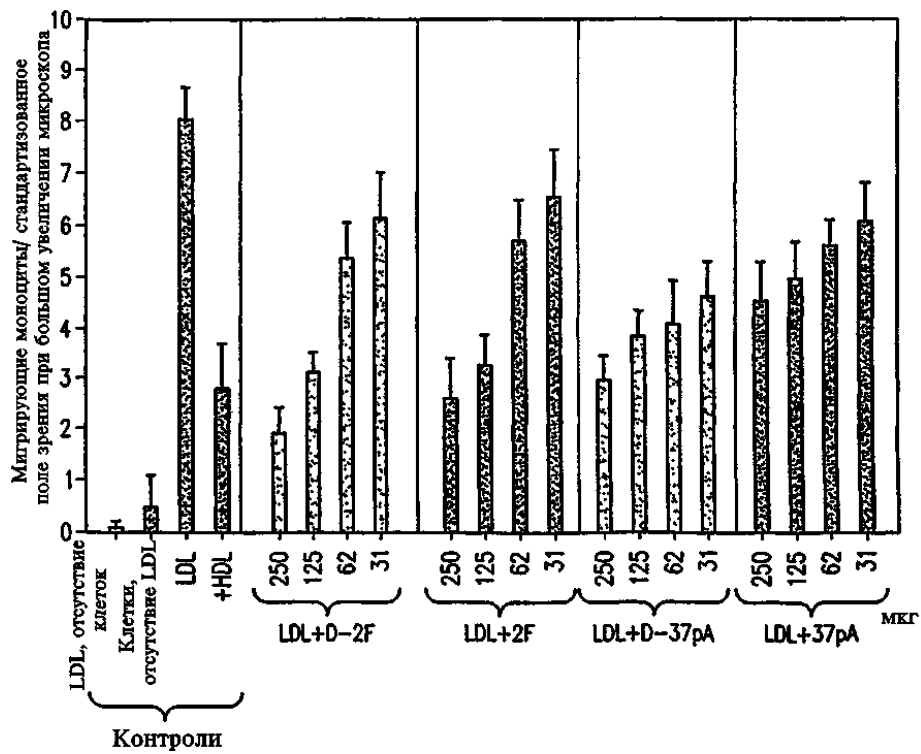
Фиг. 7А



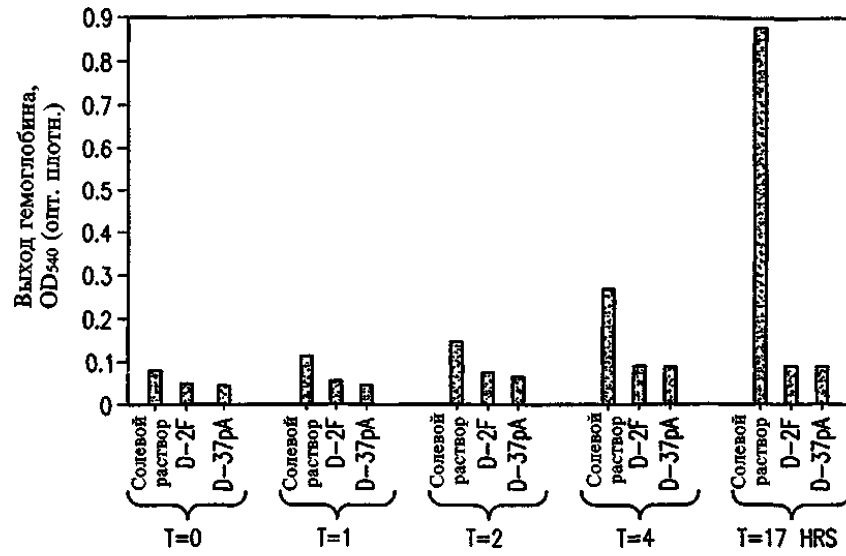
Фиг. 7B



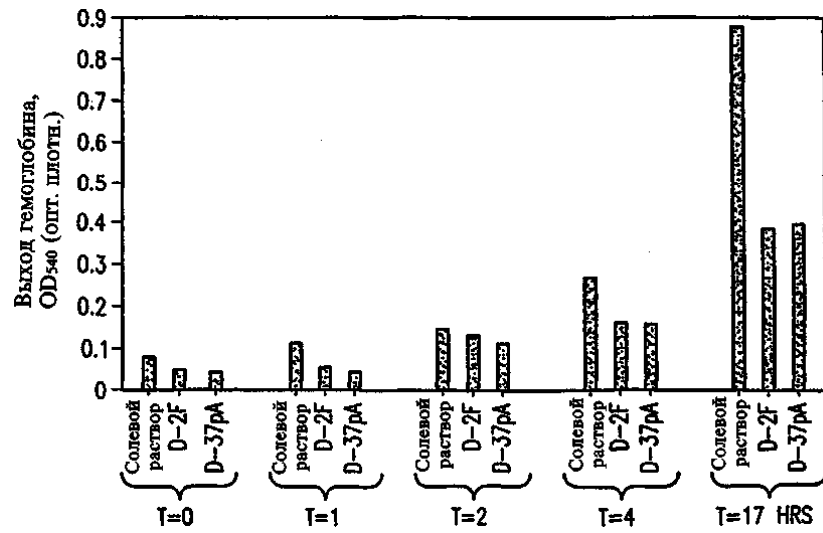
Фиг. 8



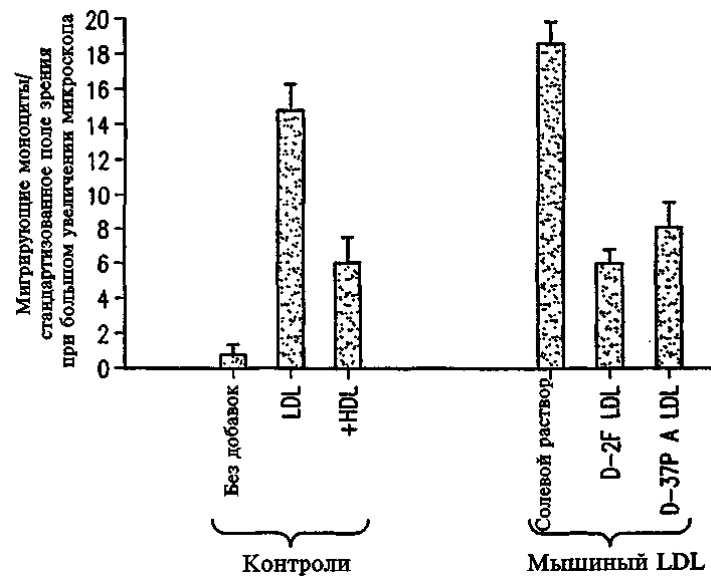
Фиг. 9



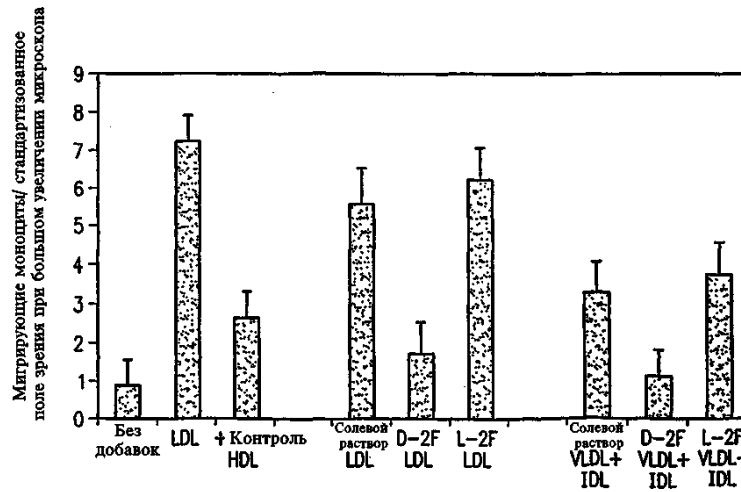
Фиг. 10А



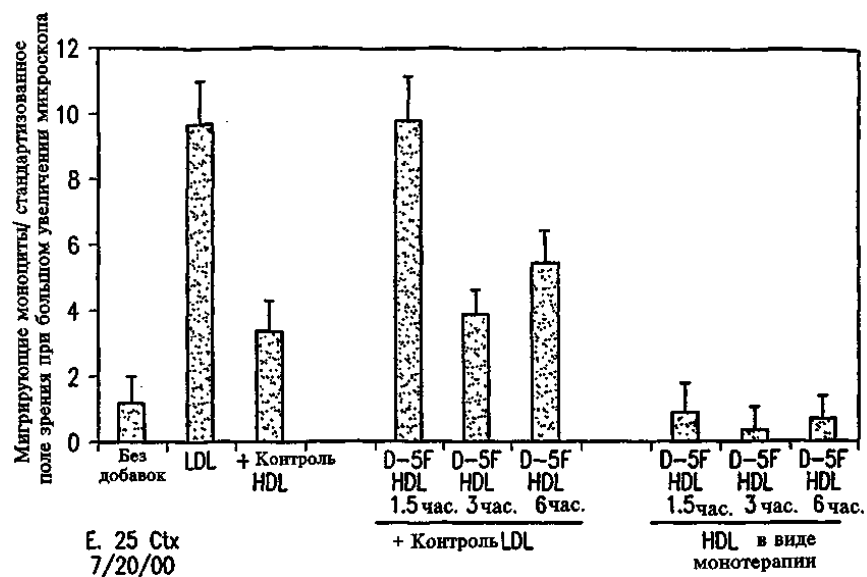
Фиг. 10 В



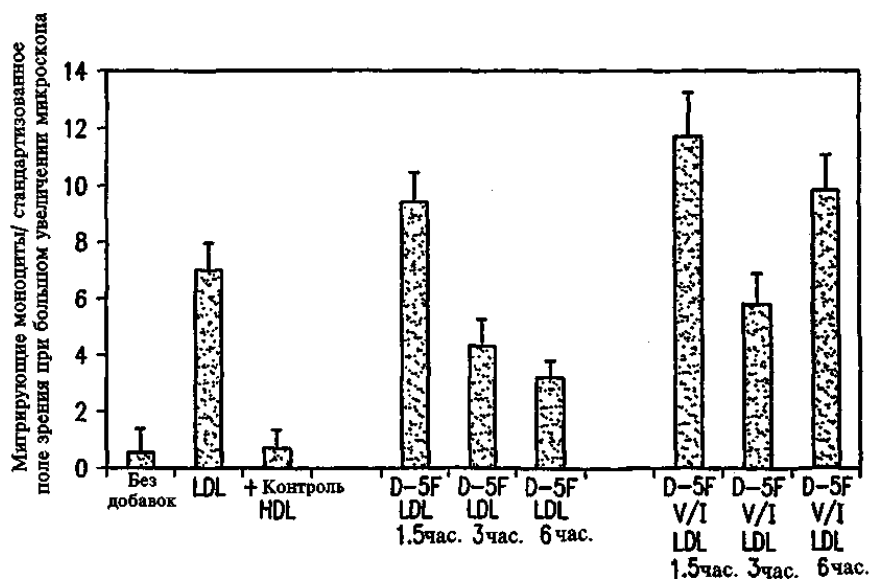
Фиг. 11



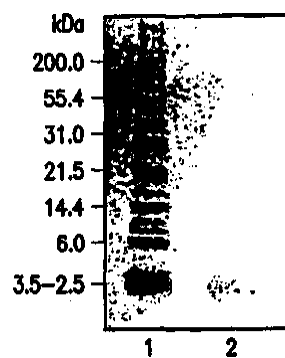
Фиг. 12



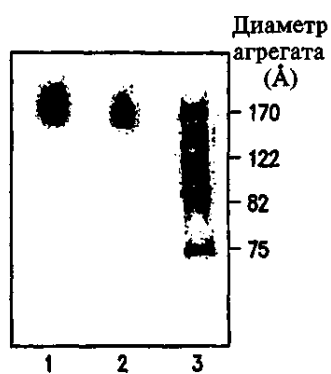
Фиг. 13А



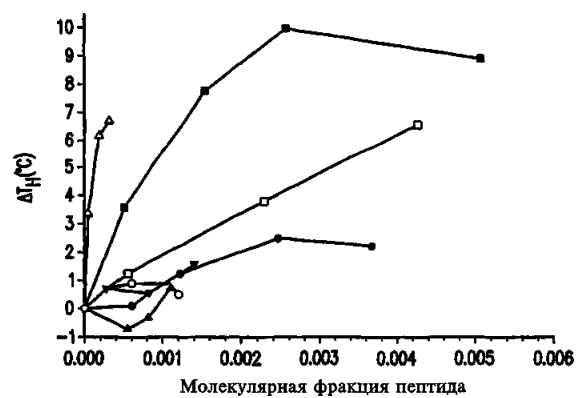
Фиг. 13В



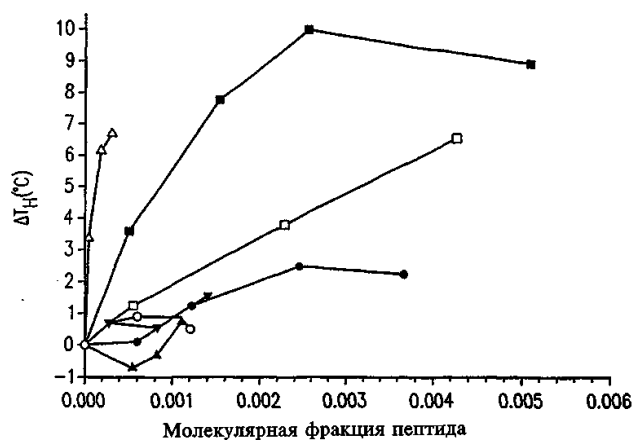
Фиг. 14А



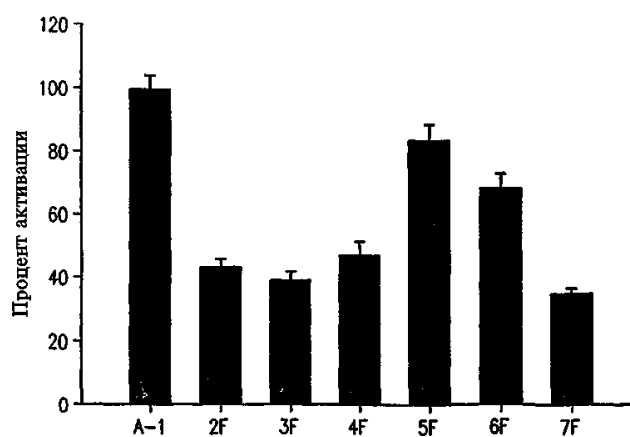
Фиг. 14В



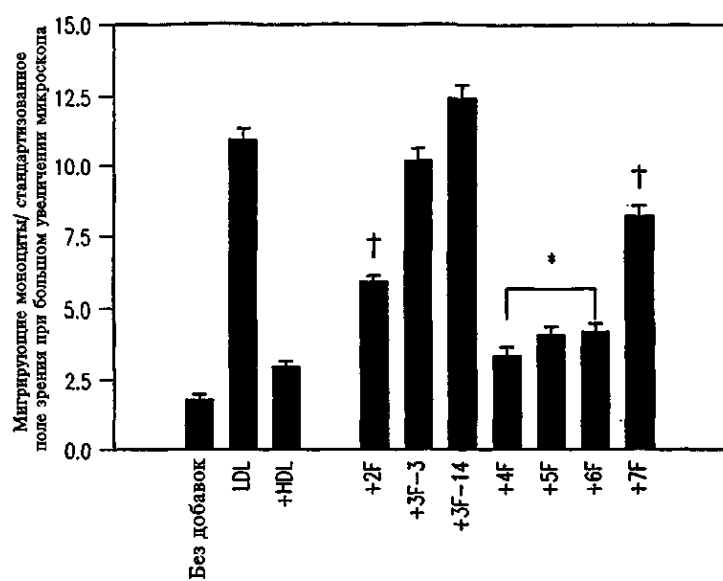
Фиг. 15



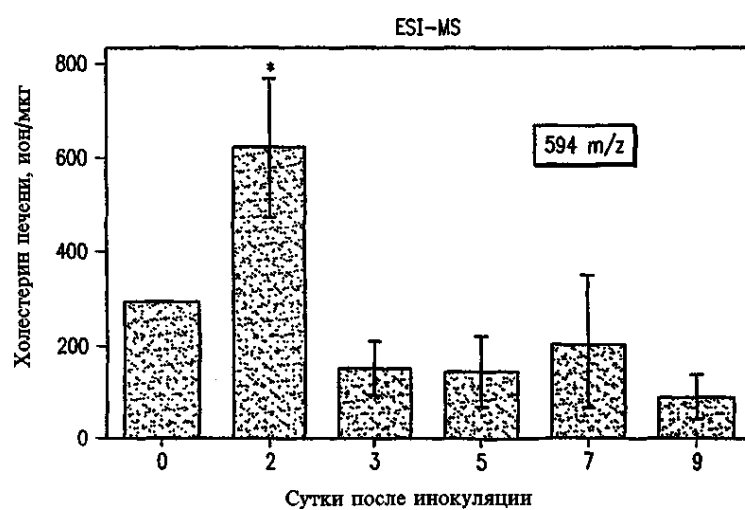
Фиг. 16



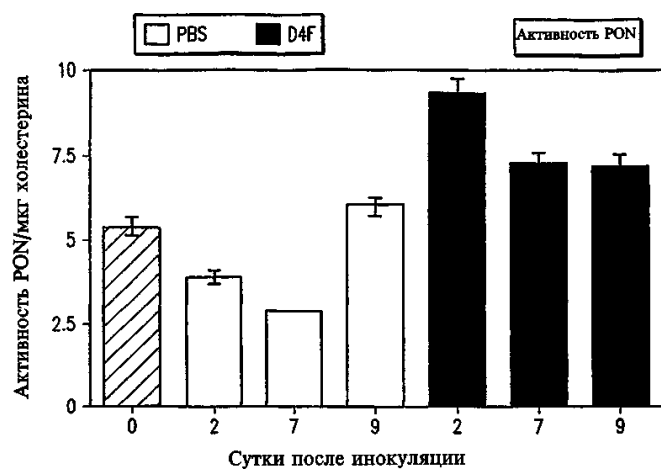
Фиг. 17



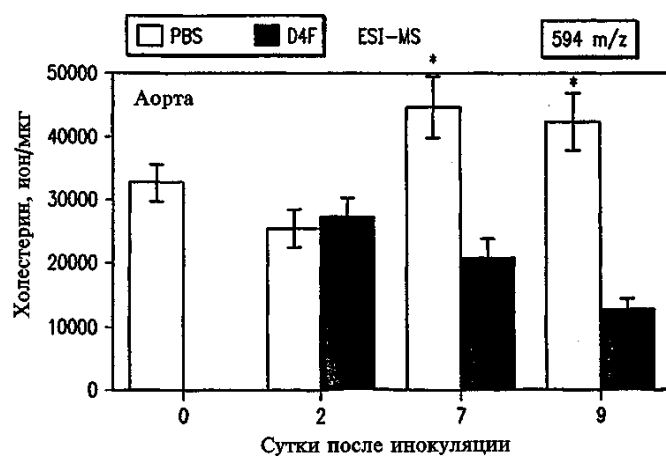
Фиг. 18



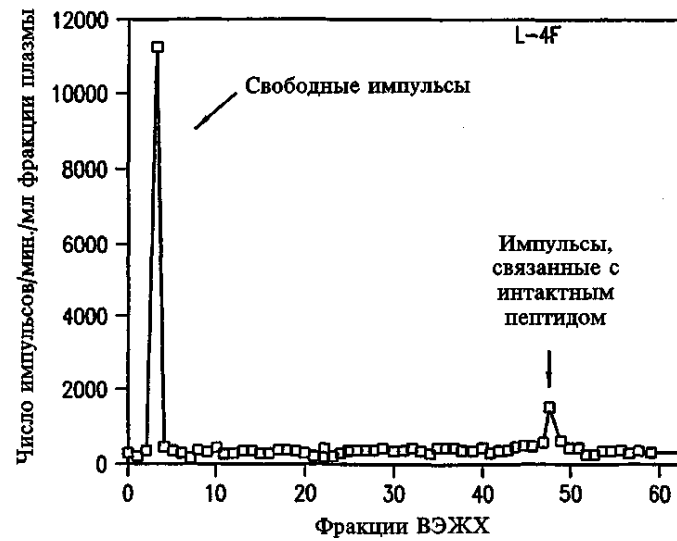
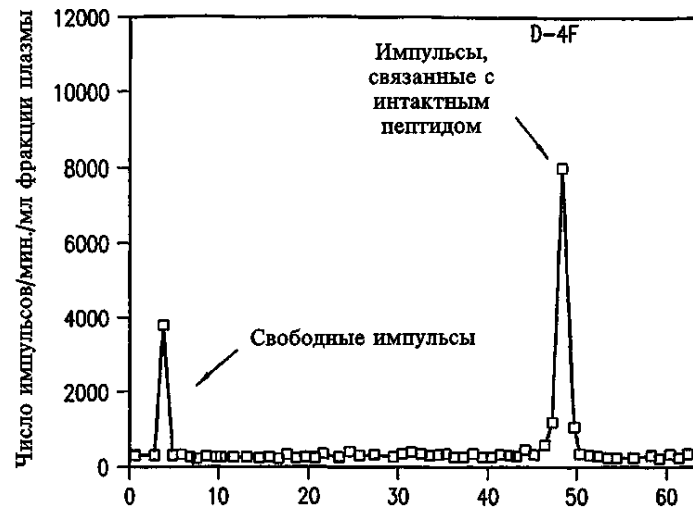
Фиг. 19



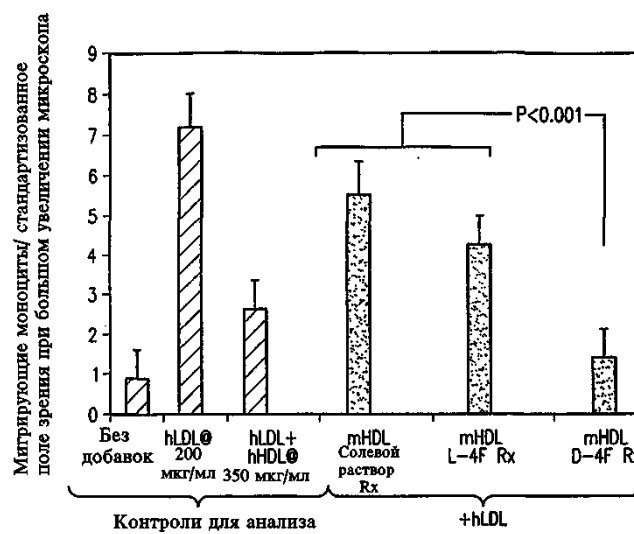
Фиг. 20



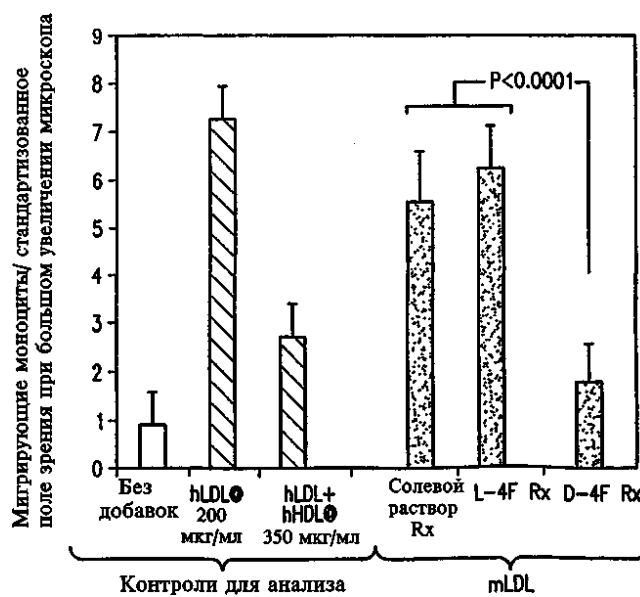
Фиг. 21



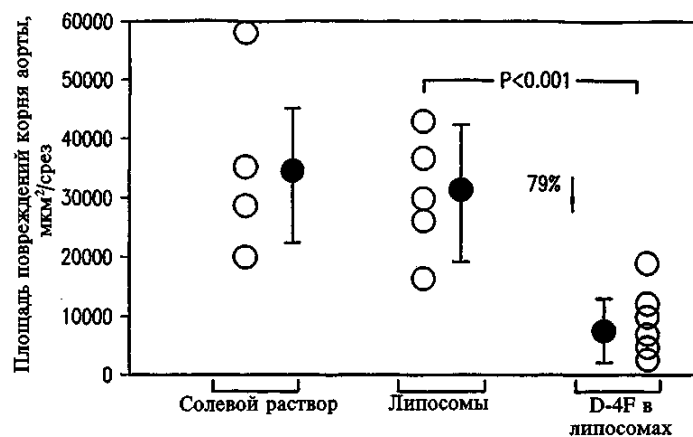
Фиг. 22А



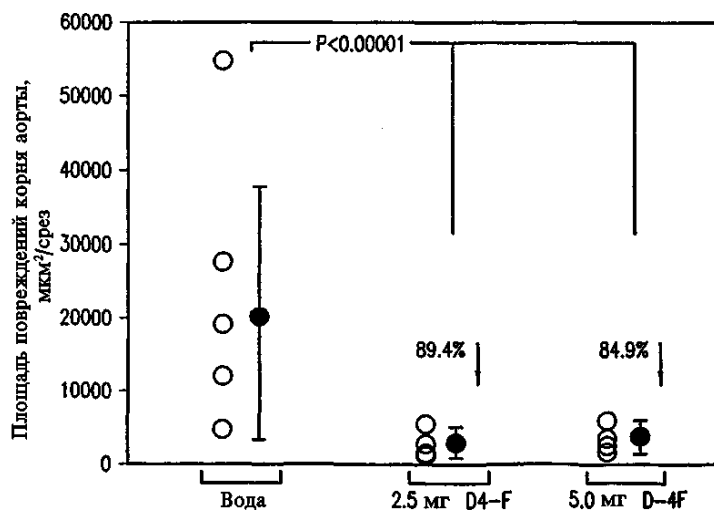
Фиг. 22В



Фиг. 22С



Фиг. 23



Фиг. 24



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2/6