

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 042134

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.01.18

(21) Номер заявки
201991491

(22) Дата подачи заявки
2018.01.19

(51) Int. Cl. C07K 14/00 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(54) МИМЕТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ ароС-II

(31) 62/448,358; 62/476,535; 62/476,531

(32) 2017.01.19; 2017.03.24; 2017.03.24

(33) US

(43) 2019.12.30

(86) PCT/US2018/014532

(87) WO 2018/136803 2018.07.26

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЗЕ ЮНАЙТЕД СТЕЙТС ОФ
АМЕРИКА, ЭЗ РЕПРЕЗЕНТЕД БАЙ
ДЗЕ СЕКРЕТАРИ, ДЕПАРТМЕНТ
ОФ ХЕЛС ЭНД ХЬЮМАН
СЕРВИСИС (US); НОВО НОРДИСК
А/С (DK)

(72) Изобретатель:
Римейли Алан Томас, Гош Сумитра
Шанкер, Девалараджа Мадхав Н.,
Ло Чжи-Хун, Свиридов Денис О.,
Вольска Анна (US)

(74) Представитель:
Хмара М.В., Рыбаков В.М., Липатова
И.И., Новоселова С.В., Дощечкина
В.В., Пантелеев А.С., Ильмер Е.Г.,
Осипов К.В. (RU)

(56) US-A1-20110033518
US-B2-8119590
US-A1-20100016173

(57) В изобретении представлены миметические пептиды аполипопротеина С-II (ароС-II) и способы лечения гипертриглицеридемии у больного с помощью эффективного количества миметического пептида ароС-II.

042134 B1

042134 B1

Заявление о федеральном спонсировании исследования или разработки

Настоящее изобретение было создано при выполнении Соглашения о совместных исследованиях и разработках № HL-CR-16-005 с Национальными институтами здравоохранения, Агентством Министерства здравоохранения и социальных служб. Правительство Соединенных Штатов Америки обладает определенными правами на настоящее изобретение.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был представлена через EFS-Web и тем самым включен в настоящий документ посредством ссылки во всей свое полноте. Указанная копия ASCII, созданная в XX месяце 2018 г., называется XXXXXUS_sequencelisting.txt, и ее размер составляет XXXXXX байтов.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Гипертриглицеридемию, как правило, определяют как содержание триглицеридов в сыворотке крови выше 150 мг/дл (Berglund et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 97:2969-2989, 2012). Больные с умеренным увеличением содержания триглицеридов подвержены риску сердечно-сосудистого заболевания (Budoff, Am J Cardiol 118:138-45, 2016). Больные с тяжелой гипертриглицеридемией, кроме того, подвергаются риску острого панкреатита (Viljoen and Wierzbicki, Expert Rev Cardiovasc Ther 10:505-514, 2012).

Гипертриглицеридемия чаще всего является вторичной по отношению к ожирению, сахарному диабету, беременности, употреблению спирта и широкого ряда лекарственных средств (Anderson et al., Pancreatol 9:252-257, 2009; Dominguez-Munoz et al., Int. J. Pancreatol. 10:261-267, 1991). Триглицериды содержатся в хиломикронах и липопротеине очень низкой плотности (VLDL), и липолиз липопротеин-липазой (LPL) является важной стадией катаболизма этих богатых триглицеридами липопротеиновых частиц. Редко гипертриглицеридемия является результатом генетических дефектов в LPL или apoC-II, облигатном активаторе LPL (Fojo et al., J. Intern. Med. 231:669-677, 1992) или в других генах.

Фибраты и добавки, которыми богаты омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты, такие как рыбий жир, являются основным средством лечения гипертриглицеридемии (Berglund et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 97:2969-2989, 2012). Однако не было четко продемонстрировано, что эти средства эффективны в снижении связанных с повышенным содержанием триглицеридов рисков, таких как сердечнососудистое заболевание (Budoff, Am J Cardiol 118:138-45, 2016).

Следовательно, существует потребность в новых терапевтических средствах для лечения гипертриглицеридемии, как распространенных форм гипертриглицеридемии, так и гипертриглицеридемии, вызванной генетическими дефектами.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Авторы настоящего изобретения разработали и получили миметические пептиды apoC-II, которые обладают способностью снижать содержание триглицерида как *in vitro*, так и *in vivo*. Такие пептиды могут быть использованы для лечения гипертриглицеридемии.

Согласно типичным вариантам осуществления миметический пептид apoC-II представляет собой многоспиральный пептид, в котором один или несколько спиральных доменов являются амфипатическими, обеспечивающими пептиду способность связываться с липидами и/или с поверхностью липопротеинов, а другие из спиральных доменов активируют LPL. Согласно некоторым вариантам осуществления миметический пептид apoC-II является двухспиральным пептидом, содержащим первый спиральный домен, шарнирную область и второй спиральный домен в порядке от N-конца до C-конца, при этом первый спиральный домен является амфипатическим, а второй спиральный домен активирует LPL. Авторы настоящего изобретения выяснили, что подходят различные амфипатические спирали, при этом некоторые моделируются на амфипатических спиралях известных апополипротеинов, таких как apoC-II. Также авторы настоящего изобретения обнаружили, что способность пептидов снижать содержание триглицеридов не ограничивается активацией LPL, что позволяет использовать их при нарушениях, при которых LPL снижается или отсутствует, и что они могут вытеснять apoC-III с поверхности липопротеинов, что позволяет их использовать при нарушениях, при которых содержание apoC-III повышено.

Следовательно, в первом аспекте настоящего документа представлен выделенный миметический пептид apoC-II из не более чем 50 аминокислот, содержащий от N-конца до C-конца первый спиральный домен, шарнирную область и второй спиральный домен, при этом первый спиральный домен является амфипатическим, при этом миметический пептид apoC-II не является пептидом под SEQ ID NO: 56.

Согласно некоторым вариантам осуществления первый домен выделенного миметического пептида apoC-II представляет собой нативную спираль 1 apoC-II. Согласно некоторым другим вариантам осуществления первый домен выделенного миметического пептида apoC-II представляет собой вариант спирали 1 apoC-II. Согласно некоторым вариантам осуществления первый домен выделенного миметического пептида apoC-II представляет собой нативную спираль 2 apoC-II. Согласно некоторым другим вариантам осуществления первый домен выделенного миметического пептида apoC-II представляет собой вариант спирали 2 apoC-II.

Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 2 apoC-II включает удлинение спирали 2 apoC-II. Согласно различным вариантам осуществления спираль 2 apoC-II удлиняется на 1-10 аминокислот на N-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 2 apoC-II удлиняется

[illegible]

ланином, серин в положении 54 заменяется глутаминовой кислотой, а серин в положении 56 заменяется фенилаланином.

Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 2 ароС-II включает по меньшей мере одну химическую модификацию. Согласно некоторым вариантам осуществления химическая модификация представляет собой ковалентную связь жирной кислоты. Согласно различным вариантам осуществления жирная кислота включает 4-26 атомов углерода. Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота включает 10 атомов углерода. Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота включает 12 атомов углерода. Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота включает 14 атомов углерода. Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота включает 16 атомов углерода. Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота включает 18 атомов углерода. Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота включает 20 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота является насыщенной. Согласно некоторым другим вариантам осуществления жирная кислота является ненасыщенной. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота связана с N-концевой аминокислотой. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота связана с боковой группой аминокислоты. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота связана с ϵ -амином лизинового остатка. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область выделенного миметического пептида ароС-II включает 5-10 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область включает 7 аминокислот. Согласно конкретным вариантам осуществления шарнирная область включает пролин. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления шарнирная область включает пролин в положении 58. Согласно конкретным вариантам осуществления шарнирная область включает аланин. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления шарнирная область включает аланин в положении 58. Согласно конкретным вариантам осуществления шарнирная область включает норлейцин. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления шарнирная область включает норлейцин в положении 60. Согласно конкретным вариантам осуществления шарнирная область включает лизин. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления шарнирная область включает лизин в положении 60. Согласно конкретным вариантам осуществления шарнирная область включает валин. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления шарнирная область включает валин в положении 60. Согласно конкретным вариантам осуществления шарнирная область включает лейцин. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления шарнирная область включает лейцин в положении 60. Согласно конкретным вариантам осуществления шарнирная область включает метионин. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления шарнирная область включает метионин в положении 60.

Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область включает по меньшей мере одну химическую модификацию. Согласно некоторым вариантам осуществления химическая модификация представляет собой ковалентную связь жирной кислоты. Согласно различным вариантам осуществления жирная кислота включает 4-26 атомов углерода. Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота включает 10 атомов углерода. Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота включает 12 атомов углерода. Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота включает 14 атомов углерода. Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота включает 16 атомов углерода. Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота включает 18 атомов углерода. Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота включает 20 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота является насыщенной. Согласно некоторым другим вариантам осуществления жирная кислота является ненасыщенной. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота связана с боковой группой аминокислоты. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота связана с s-амином лизинового остатка.

Согласно различным вариантам осуществления шарнирная область позволяет первому спиральному домену и второму спиральному домену сохранять почти прямую конформацию, при этом второй домен отклоняется от первого домена на угол не более чем приблизительно 20° .

Согласно некоторым вариантам осуществления второй домен выделенного миметического пептида ароС-II представляет собой нативную спираль 3 ароС-II. Согласно некоторым другим вариантам осуществления второй домен выделенного миметического пептида ароС-II представляет собой вариант спирали 3 ароС-II. Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 3 ароС-II включает удлинение спирали 3 ароС-II. Согласно различным вариантам осуществления спираль 3 ароС-II удлиняется на 1-10 аминокислот на С-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 3 ароС-II удлиняется на 4 аминокислоты на С-конце. Согласно конкретным вариантам осуществления спираль 3 ароС-II удлиняется на аминокислоты лизин, глицин, глутаминовая кислота и глутаминовая кислота от N-конца до С-конца.

Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 3 ароС-II включает по меньшей мере одну мутацию спирали 3 ароС-II. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления мутация представляет собой аминокислотную замену. Согласно некоторым вариантам осуществления оригинальная аминокислота спирали 3 ароС-II заменяется природной аминокислотой. Согласно некоторым вариантам осуществления оригинальная аминокислота спирали 3 ароС-II заменяется неприродной аминокисло-

той. Согласно некоторым вариантам осуществления оригинальная аминокислота спирали 3 аroC-II заменяется аналогом аминокислоты. Согласно конкретным вариантам осуществления аминокислотная замена осуществляется в положении 70. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления глутамин в положении 70 заменяется аргинином. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления глутамин в положении 70 заменяется лизином.

Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 3 аroC-II включает по меньшей мере одну химическую модификацию. Согласно некоторым вариантам осуществления химическая модификация представляет собой ковалентную связь жирной кислоты. Согласно различным вариантам осуществления жирная кислота включает 4-26 атомов углерода. Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота включает 10 атомов углерода. Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота включает 12 атомов углерода. Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота включает 14 атомов углерода. Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота включает 16 атомов углерода. Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота включает 18 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота является насыщенной. Согласно некоторым другим вариантам осуществления жирная кислота является ненасыщенной. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота связана с С-концевой аминокислотой. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота связана с боковой группой аминокислоты. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота связана с ϵ -амином лизинового остатка. Согласно некоторым вариантам осуществления С-концевая аминокислота модифицируется С-концевым амидом.

Согласно различным вариантам осуществления выделенный миметический пептид аroC-II дополнительно включает метку очистки. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления метка очистки представляет собой полигистидиновую метку, тус-метку или НА-метку.

Согласно различным вариантам осуществления первый домен миметического пептида аroC-II обладает аффинностью связывания с липопротеинами. Согласно различным вариантам осуществления второй домен способен активировать липопротеинлипазу (LPL). Согласно некоторым вариантам осуществления пептид способен активировать липолиз с помощью LPL. Согласно некоторым вариантам осуществления пептид способен заменять аroC-III в липопротеинах. Согласно некоторым вариантам осуществления пептид способен снижать содержание триглицерида (TG) *in vivo*. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления пептид способен снижать повышенное содержание TG, вызванное дефицитом LPL. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления пептид способен снижать повышенное содержание TG, вызванное повышенным содержанием аroC-III. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления пептид способен снижать повышенное содержание TG, вызванное дефицитом аroC-II. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления пептид способен снижать постпрандиальное повышенное содержание TG.

Согласно конкретным вариантам осуществления пептид имеет последовательность, указанную под SEQ ID NO: 6.

Согласно конкретным вариантам осуществления пептид имеет последовательность, указанную под SEQ ID NO: 9.

Согласно другому аспекту настоящего документа представлен выделенный миметический пептид аroC-II из не более чем 30 аминокислот, состоящий из варианта спирали 3 аroC-II.

Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 3 аroC-II включает удлинение спирали 3 аroC-II. Согласно различным вариантам осуществления спираль 3 аroC-II удлиняется на 1-10 аминокислот на N-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 3 аroC-II удлиняется на 6 аминокислот на N-конце.

Согласно конкретным вариантам осуществления вариант спирали 3 аroC-II включает лизин или метионин в положении 60. Согласно различным вариантам осуществления спираль 3 аroC-II удлиняется на 1-10 аминокислот на С-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 3 аroC-II удлиняется на 4 аминокислоты на С-конце.

Согласно конкретным вариантам осуществления спираль 3 аroC-II удлиняется на аминокислоты лизин, глицин, глутаминовая кислота и глутаминовая кислота от N-конца до С-конца.

Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 3 аroC-II включает по меньшей мере одну мутацию спирали 3 аroC-II. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления мутация представляет собой аминокислотную замену.

Согласно некоторым вариантам осуществления оригинальная аминокислота спирали 3 аroC-II заменяется природной аминокислотой. Согласно некоторым вариантам осуществления оригинальная аминокислота спирали 3 аroC-II заменяется неприродной аминокислотой. Согласно некоторым вариантам осуществления оригинальная аминокислота спирали 3 аroC-II заменяется аналогом аминокислоты.

Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 3 аroC-II включает по меньшей мере одну химическую модификацию. Согласно некоторым вариантам осуществления химическая модификация представляет собой ковалентную связь жирной кислоты. Согласно различным вариантам

осуществления жирная кислота включает 4-26 атомов углерода. Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота включает 10 атомов углерода. Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота включает 12 атомов углерода. Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота включает 14 атомов углерода. Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота включает 16 атомов углерода. Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота включает 18 атомов углерода. Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота включает 20 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота является насыщенной. Согласно некоторым другим вариантам осуществления жирная кислота является ненасыщенной. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота связана с N-концевой аминокислотой. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота связана с C-концевой аминокислотой. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота связана с боковой группой аминокислоты. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота связана с ϵ -амином лизинового остатка.

Согласно различным вариантам осуществления выделенный миметический пептид ароС-II дополнительно включает метку очистки. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления метка очистки представляет собой полигистидиновую метку, тус-метку или НА-метку.

Согласно различным вариантам осуществления вариант спирали 3 ароС-II обладает аффинностью связывания с липопротеинами. Согласно различным вариантам осуществления вариант спирали 3 ароС-II способен активировать липопротеинлипазу (LPL). Согласно некоторым вариантам осуществления пептид способен активировать липолиз с помощью LPL. Согласно некоторым вариантам осуществления пептид способен заменять ароС-III в липопротеинах. Согласно некоторым вариантам осуществления пептид способен снижать содержание триглицерида (TG) *in vivo*. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления пептид способен снижать повышенное содержание TG, вызванное дефицитом LPL. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления пептид способен снижать повышенное содержание TG, вызванное повышенным содержанием ароС-III. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления пептид способен снижать повышенное содержание TG, вызванное дефицитом ароС-II. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления пептид способен снижать постпрандиальное повышенное содержание TG.

Согласно другому аспекту настоящего документа представлена фармацевтическая композиция, содержащая миметический пептид ароС-II и фармацевтически приемлемый носитель. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическая композиция подходит для подкожной инъекции.

Согласно другому аспекту настоящего документа представлен способ лечения гипертриглицеридемии у больного, предусматривающий введение больному эффективного количества миметического пептида ароС-II или фармацевтической композиции, содержащей миметический пептид ароС-II. Согласно некоторым вариантам осуществления гипертриглицеридемия связана с ожирением. Согласно некоторым вариантам осуществления гипертриглицеридемия связана с сахарным диабетом. Согласно некоторым вариантам осуществления гипертриглицеридемия связана с употреблением спирта. Согласно некоторым вариантам осуществления гипертриглицеридемия связана с медикаментом.

Согласно некоторым вариантам осуществления гипертриглицеридемия вызвана дефицитом LPL. Согласно некоторым вариантам осуществления гипертриглицеридемия является наследственным дефицитом липопротеинлипазы. Согласно некоторым вариантам осуществления дефицит LPL вызван мутацией гена LPL. Согласно некоторым вариантам осуществления мутация ведет к пониженной ферментативной активности LPL. Согласно некоторым вариантам осуществления мутация ведет к отсутствию ферментативной активности LPL. Согласно некоторым вариантам осуществления дефицит LPL диагностируют по отсутствию активности LPL в сыворотке крови больного. Согласно некоторым вариантам осуществления мутацию выявляют с помощью анализа последовательности ДНК. Согласно некоторым вариантам осуществления гипертриглицеридемия вызвана дефицитом ароС-II. Согласно некоторым вариантам осуществления гипертриглицеридемия вызвана повышенным содержанием ароС-III. Согласно некоторым вариантам осуществления концентрация триглицерида (TG) в сыворотке крови до лечения больного составляет от 150 до 199 мг/дл. Согласно некоторым вариантам осуществления концентрация триглицерида (TG) в сыворотке крови до лечения больного составляет от 200 до 499 мг/дл. Согласно некоторым вариантам осуществления концентрация триглицерида (TG) в сыворотке крови до лечения больного составляет от 500 до 999 мг/дл. Согласно некоторым вариантам осуществления концентрация триглицерида (TG) в сыворотке крови до лечения больного составляет от 1000 до 1999 мг/дл. Согласно некоторым вариантам осуществления концентрация триглицерида (TG) в сыворотке крови до лечения больного равняется или превышает 2000 мг/дл.

Согласно конкретным вариантам осуществления у больного развился острый панкреатит или существует риск его развития. Согласно конкретным вариантам осуществления у больного развилось острое сердечно-сосудистое заболевание или существует риск его развития.

Согласно другому аспекту настоящего документа также представлен способ получения миметического пептида ароС-II, предусматривающий получение пептида рекомбинантным путем.

Согласно еще одному аспекту настоящего документа также представлен способ получения миметического пептида ароС-II, предусматривающий получение пептида с помощью химического синтеза.

Краткое описание графических материалов

Эти и другие признаки, аспекты и преимущества настоящего изобретения станут более понятными из следующего описания и прилагаемых графических материалов.

На фиг. 1 показана гомология аминокислотных остатков 40-58 зрелого человеческого белка ароС-II у разных видов.

На фиг. 2А и 2В представлены спиральные круглые графики аминокислотных остатков 40-57 нативного ароС-II и варианта Delta4', при этом на фиг. 2А представлен нативный ароС-II, а на фиг. 2В представлен вариант Delta4'. Размер и цвет шаров указывают на степень заряда и гидрофобность. Первое число в центре спирального круга указывает гидрофобный момент. Второе число в центре спирального круга и стрелка указывают угол гидрофобного момента.

На фиг. 3А и 3В представлены спиральные круглые графики аминокислотных остатков 40-57 нативного ароС-II и варианта Delta5', при этом на фиг. 3А представлен нативный ароС-II, а на фиг. 3В представлен вариант Delta5'.

На фиг. 4А и фиг. 4В представлены спиральные круглые графики аминокислотных остатков 40-57 нативного ароС-II и варианта Delta6', при этом на фиг. 4А представлен нативный ароС-II, а на фиг. 4В представлен вариант Delta6'.

На фиг. 5 показаны примеры химической модификации варианта Delta4'. Моно-ацил-Delta4' включает модифицированный стеариновой кислотой N-конец. Ди-ацил-Delta4' включает модифицированный стеариновой кислотой N-конец и модифицированный стеариновой кислотой лейциновый остаток в положении 49.

На фиг. 6 представлены результаты *in vitro* анализа LPL типичных миметических пептидов ароС-II и вариантов с химическими модификациями с использованием сыворотки крови больного с дефицитом ароС-II в качестве субстрата. Нативный полноразмерный человеческий белок ароС-II использовали в качестве контроля.

На фиг. 7 представлены результаты *in vitro* анализа LPL типичных миметических пептидов ароС-II и вариантов с химическими модификациями с использованием интралипида в качестве субстрата. Нативный полноразмерный человеческий белок ароС-II использовали в качестве контроля.

На фиг. 8 представлены результаты *in vitro* анализа LPL типичного миметического пептида ароС-II Delta4, вариантов Delta4 и вариантов третьей спирали ароС-II с использованием сыворотки крови больного с дефицитом ароС-II в качестве субстрата.

На фиг. 9 показаны результаты *in vitro* анализа LPL вариантов третьей спирали ароС-II с использованием сыворотки крови больного с дефицитом ароС-II в качестве субстрата.

На фиг. 10 показаны результаты *in vitro* анализа LPL вариантов типичного миметического пептида ароС-II Delta4 с использованием сыворотки крови больного с дефицитом ароС-II в качестве субстрата.

На фиг. 11 показаны результаты *in vitro* анализа LPL вариантов типичного миметического пептида ароС-II Delta4 с использованием сыворотки крови больного с дефицитом ароС-II в качестве субстрата.

На фиг. 12 представлены результаты *in vitro* анализа LPL типичного миметического пептида ароС-II Delta4 и его вариантов с использованием сыворотки крови больного с дефицитом ароС-II в качестве субстрата. Концентрация миметического пептида ароС-II варьирует от 100 пМ до 10 мкМ. Нативный полноразмерный человеческий белок ароС-II использовали в качестве контроля.

На фиг. 13 представлены результаты *in vitro* анализа LPL вариантов усечения типичного миметического пептида ароС-II Delta4 с использованием сыворотки крови больного с дефицитом ароС-II в качестве субстрата. Концентрация миметического пептида ароС-II варьирует от 10 пМ до 100 мкМ.

На фиг. 14 представлены результаты *in vitro* анализа LPL вариантов типичного миметического пептида ароС-II Delta5 и типичного миметического пептида ароС-II Delta6 с использованием сыворотки крови больного с дефицитом ароС-II в качестве субстрата. Концентрация миметического пептида ароС-II варьирует от 100 пМ до 10 мкМ.

На фиг. 15А, 15В, 15С и 15D показан процент изменения активности LPL в *in vitro* анализе LPL типичного миметического пептида ароС-II Delta6 и его вариантов с использованием сыворотки крови больного гипертриглицеридемией в качестве субстрата. Концентрация триглицерид в сыворотке крови больного на фиг. 15А, 15В, 15С и 15D составляет 1084, 1224, 1442 и 1669 мг/дл соответственно.

На фиг. 16 представлено содержание триглицерида (TG) в сыворотке крови нокаутных по ароС-II мышей после подкожной инъекции миметического пептида ароС-II Delta4. Солевой раствор использовали в качестве контроля.

На фиг. 17 представлено содержание суммарного холестерина (TC) нокаутных по ароС-II мышей после подкожной инъекции миметического пептида ароС-II Delta4. Солевой раствор использовали в качестве контроля.

На фиг. 18 представлено содержание триглицерида (TG) в сыворотке крови нокаутных по ароС-II мышей после внутривентральной инъекции миметического пептида ароС-II Delta4. Солевой раствор использовали в качестве контроля.

На фиг. 19 представлено содержание суммарного холестерина (TC) нокаутных по ароС-II мышей после внутривентральной инъекции миметического пептида ароС-II Delta4. Солевой раствор исполь-

зовали в качестве контроля.

На фиг. 20 показан процент изменения содержания триглицерида (TG) в сыворотке крови мышей дикого типа после кормления растительным маслом через желудочный зонд в присутствии или отсутствии внутриперитонеальной инъекции миметического пептида apoC-II. Тестируемые миметические пептиды apoC-II включали Delta4, Delta4b и Delta4b-3. Солевой раствор использовали в качестве контроля.

На фиг. 21 представлено содержание триглицерида (TG) в сыворотке крови нокаутных по apoC-II мышей после внутриперитонеальной инъекции миметического пептида apoC-II Delta6. Солевой раствор использовали в качестве контроля.

На фиг. 22 представлено содержание суммарного холестерина (TC) нокаутных по apoC-II мышей после внутриперитонеальной инъекции миметического пептида apoC-II Delta6. Солевой раствор использовали в качестве контроля.

На фиг. 23 представлено содержание триглицерида (TG) в сыворотке крови нокаутных по apoC-II мышей после внутриперитонеальной инъекции разных доз миметического пептида apoC-II Delta6. Солевой раствор использовали в качестве контроля. Вычисляли процент содержания TG в сыворотке крови в разные моменты времени после инъекции по сравнению с содержанием TG в сыворотке крови на момент инъекции.

На фиг. 24 представлен процент изменения триглицерида (TG) в сыворотке крови нокаутных по apoC-II мышей после внутриперитонеальной инъекции вариантов Delta6.

Солевой раствор использовали в качестве контроля. Вычисляли процент изменения TG в сыворотке крови по сравнению с TG в сыворотке крови на момент инъекции.

На фиг. 25 показано замещение apoC-III миметическим пептидом apoC-II Delta6 в VLDL и хиломикронах, выделенных из плазмы человека.

На фиг. 26 показано замещение apoC-III вариантами миметического пептида apoC-II Delta6 в VLDL, выделенном из плазмы человека.

На фиг. 27 показаны результаты *in vitro* анализа LPL миметических пептидов apoC-II Delta4 и Delta6 с использованием сыворотки крови больного гипертриглицеридемией с высоким содержанием apoC-III в качестве субстрата.

На фиг. 28 показано замещение apoC-III пептидом apoC-II-a в VLDL, выделенном из плазмы человека (TG=291 мг/дл).

На фиг. 29А и 29В показано зависимое от дозы замещение apoC-III пептидом apoC-II-a, анализируемое с помощью масс-спектрометрии (MALDI-TOF), при этом на фиг. 29А показано, что apoC-II-a селективно замещает apoC-III и apoC-I, но не apoC-II, а на фиг. 29В показано, что связывание пептида apoC-II-a с VLDL приблизительно пропорционально его концентрации.

На фиг. 30 показано замещение apoC-III пептидом apoC-II-a в хиломикронах, выделенных из плазмы человека.

На фиг. 31 представлены результаты анализа активации LPL с интралипидом в качестве субстрата и рекомбинантным apoC-III в качестве ингибитора. Пептид apoC-II-a преодолевает ингибирование с помощью apoC-III.

На фиг. 32 представлены результаты анализа активации LPL с плазмой человека с высоким содержанием TG в качестве субстрата и рекомбинантным apoC-III в качестве ингибитора. Пептид apoC-II-a преодолевает ингибирование с помощью apoC-III.

На фиг. 33 представлены графики результатов анализа активации LPL с использованием плазмы трансгенных (tg) по apoC-III мышей в качестве субстрата. Концентрации TG мышей ApoC-III tg1, ApoC-III tg2 и ApoC-III tg3 составляют 323 мг/дл, 497 мг/дл и 478 мг/дл соответственно. Пептид apoC-II-a преодолевает ингибиторный эффект повышенной экспрессии apoC-III во всех трех образцах плазмы трансгенных мышей.

На фиг. 34А и фиг. 34В показано 24-часовое постпрандиальное содержание TG в сыворотке крови у мышей после перорального кормления через желудочный зонд растительным маслом в присутствии или отсутствии ингибитора LPL Triton WR1339 и в присутствии или отсутствии пептида apoC-II-a, при этом на фиг. 34А внимание акцентируется на диапазоне концентрации TG 0-100 мг/дл, а на фиг. 34В показан диапазон концентрации TG 0-4500 мг/дл.

На фиг. 35А и 35В показан процент изменения содержания TG в сыворотке крови мышей дикого типа после инъекции интралипида с внутриперитонеальной инъекцией пептида Delta6PV или без таковой в присутствии или отсутствии ингибитора LPL Triton, при этом на фиг. 35А показана хронология инъекции, а на фиг. 35В показан процент изменения содержания TG в сыворотке крови после внутриперитонеальной инъекции Delta6PV в присутствии или отсутствии Triton. Солевой раствор использовали в качестве контроля.

На фиг. 36А, 36В и 36С показан процент изменения содержания TG в сыворотке крови нокаутных по apoC-II мышей после инъекции миметического пептида apoC-II Delta6PV, при этом на фиг. 36А показана хронология инъекции, на фиг. 36В показан процент изменения содержания TG в сыворотке крови после внутриперитонеальной инъекции Delta6PV, а на фиг. 36С показан процент изменения содержания TG в сыворотке крови после подкожной инъекции Delta6PV. Солевой раствор использовали в качестве

контроля. SM представляет собой условия, при которых Delta6PV смешивали со сфингомиелином (SM), компонентом клеточной мембраны.

На фиг. 37А и 37В показан процент изменения содержания TG в сыворотке крови нокаутных по apoC-II мышей после инъекции интралипида с внутривентральной инъекцией пептида Delta6PV или без таковой, при этом на фиг. 37А показана хронология инъекции, а на фиг. 37В показан процент изменения содержания TG в сыворотке крови после внутривентральной инъекции Delta6PV при 5 мкмоль/кг и 10 мкмоль/кг (B. W.). Солевой раствор использовали в качестве контроля.

На фиг. 38А и 38В показан процент изменения содержания TG в сыворотке крови трансгенных по apoC-III мышей после инъекции миметического пептида apoC-II Delta6PV, при этом на фиг. 38А показана хронология инъекции, на фиг. 38В показан процент изменения содержания TG в сыворотке крови после внутривентральной инъекции Delta6PV при 1 мкмоль/кг, 5 мкмоль/кг и 10 мкмоль/кг (B.W.). Солевой раствор использовали в качестве контроля.

На фиг. 39 показан процент изменения содержания TG в сыворотке крови трансгенных по apoC-III мышей после инъекции интралипида с внутривентральной инъекцией пептида Delta6PV или без таковой при 5 мкмоль/кг и 10 мкмоль/кг (B.W.). Солевой раствор использовали в качестве контроля.

На фиг. 40 показан процент изменения содержания TG в сыворотке крови нокаутных по apoC-II мышей после нескольких инъекций миметического пептида apoC-II Delta6PV при 0,25 мкмоль/кг и 1 мкмоль/кг (B.W.). Стрелки указывают моменты времени инъекции Delta6PV. Солевой раствор использовали в качестве контроля.

На фиг. 41 представлены результаты SEC-FPLC разделения различных липидных фракций у нокаутных по apoC-II мышей, которым вводили 1 мкмоль/кг (B. W.) Delta6PV.

Содержание липопротеиновых частиц представлено с помощью фосфолипида.

На фиг. 42 представлены результаты SEC-FPLC разделения различных липидных фракций у нокаутных по apoC-II мышей, которым вводили 1 мкмоль/кг Delta6PV.

Содержание липопротеиновых частиц представлено с помощью TG.

На фиг. 43А и фиг. 43В показан процент изменения содержания TG в сыворотке крови трансгенных по apoC-III мышей после нескольких инъекций миметического пептида apoC-II Delta6PV, при этом на фиг. 43А показана хронология инъекций, а на фиг. 43В показан процент изменения содержания TG в сыворотке крови после внутривентральной инъекции Delta6PV при 5 мкмоль/кг (B. W.). Стрелки указывают моменты времени инъекции Delta6PV. Солевой раствор использовали в качестве контроля.

На фиг. 44 показан процент изменения содержания TG в сыворотке крови трансгенных по apoC-III мышей после нескольких инъекций миметического пептида apoC-II Delta6PV при 5 мкмоль/кг (B.W.). Стрелки указывают моменты времени инъекции Delta6PV. Солевой раствор использовали в качестве контроля.

На фиг. 45А и 45В показано содержание apoC-III после инъекций Delta6PV у трансгенных по apoC-III мышей, как измерено с помощью ELISA, при этом на фиг. 45А показано содержание apoC-III в частицах VLDL в день 1 и день 5 до и через 3 часа после инъекции, а на фиг. 45В показано содержание apoC-III в частицах HDL в день 1 и день 5 до и через 3 часа после инъекции.

На фиг. 46А и 46В показан процент изменения содержания TG в сыворотке крови мышей дикого типа после инъекции интралипида с несколькими внутривентральными инъекциями пептида Delta6PV или без таковых, при этом на фиг. 46А показана хронология инъекции, а на фиг. 46В показан процент изменения содержания TG в сыворотке крови после внутривентральной инъекции Delta6PV при 0,25 мкмоль/кг и 1 мкмоль/кг (B.W.). Солевой раствор использовали в качестве контроля.

На фиг. 47 показано отношение TG в сыворотке крови на модели обезьяны с ожирением с внутривенной инъекцией пептида Delta6PV или без таковой при 1 мг/кг и 5 мг/кг (B. W.) по сравнению с исходным содержанием. Солевой раствор использовали в качестве контроля.

На фиг. 48А, 48В и 48С показаны проценты VLDL, LDL и HDL на модели обезьяны с ожирением с внутривенной инъекцией пептида Delta6PV или без таковой при 1 мг/кг и 5 мг/кг (B.W.) по сравнению с исходным содержанием, при этом на фиг. 48А показан процент VLDL на модели обезьяны с ожирением по сравнению с исходным содержанием, на фиг. 48В показан процент LDL на модели обезьяны с ожирением по сравнению с исходным содержанием, а на фиг. 48С показан процент HDL на модели обезьяны с ожирением по сравнению с исходным содержанием.

На фиг. 49 показано замещение apoC-III пептидом Delta6PV в VLDL, выделенном из плазмы человека.

На фиг. 50 представлены результаты анализа активации LPL с плазмой человека с высоким содержанием TG в качестве субстрата и рекомбинантным apoC-III в качестве ингибитора. Delta6PV пептид преодолевает ингибирование apoC-III.

На фиг. 51 представлены результаты *in vitro* анализа LPL пептидов Delta6 и Delta6PV с использованием сыворотки крови больного с дефицитом apoC-II в качестве субстрата.

На фиг. 52 представлены результаты *in vitro* анализа LPL миметических пептидов apoC-II Delta6PV, Delta6-T18F-PV, Delta6-T18F-PV-AIB7, 17 и Delta6-T31-PV с использованием сыворотки крови больного с дефицитом apoC-II в качестве субстрата.

На фиг. 53 представлен процент изменения TG в сыворотке крови у нокаутных по apoC-II мышей после внутривентрикулярной инъекции вариантов Delta6, Delta6PV и Delta6-T18F-PV. Солевой раствор использовали в качестве контроля. Вычисляли процент изменения TG в сыворотке крови по сравнению с TG в сыворотке крови на момент инъекции.

На фиг. 54A, 54B и 54C представлены спиральные круглые и сеточные графики миметического пептида apoC-II - apoC-II-a.

На фиг. 54A показан спиральный круглый график спирали 18A. Размер и цвет шаров указывают на степень заряда и гидрофобность (желтый - неполярный; зеленый - полярный/незаряженный; розовый - кислотный; синий - основной).

На фиг. 54B показан спиральный круглый график третьей спирали apoC-II.

На фиг. 54C показан спиральный сеточный график пептида apoC-II-a.

ApoC-II-a имеет последовательность DWLKAFYDKVAEKLKEAFPMSTYTGIFTDQVLSVLKGEE (SEQ ID NO: 56).

Центральная область указывает положение гидрофобной лицевой поверхности.

На фиг. 55 показана схема исследования для тестирования постпрандиальной гипертриглицеридемии у мышей.

На фиг. 56 показана схема исследования для тестирования постпрандиальной гипертриглицеридемии у мышей в присутствии ингибитора LPL.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Определения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют значения, традиционно известные рядовому специалисту в области, к которой относится настоящее изобретение.

Термин "аминокислота" относится к природным аминокислотам, неприродным аминокислотам и аналогам аминокислот. Если не указано иное, термин "аминокислота" включает как D, так и L стереоизомеры, если соответствующая структура обеспечивает такие стереоизомерные формы.

Природные аминокислоты включают аланин (Ala или A), аргинин (Arg или R), аспарагин (Asn или N), аспарагиновую кислоту (Asp или D), цистеин (Cys или C), глутамин (Gln или Q), глутаминовую кислоту (Glu или E), глицин (Gly или G), гистидин (His или H), изолейцин (Ile или I), лейцин (Leu или L), лизин (Lys или K), метионин (Met или M), фенилаланин (Phe или F), пролин (Pro или P), серин (Ser или S), треонин (Thr или T), триптофан (Trp или W), тирозин (Tyr или Y) и валин (Val или V).

Неприродные аминокислоты или не встречающиеся в природе аминокислоты включают без ограничения азетидинкарбоновую кислоту, 2-аминоадипиновую кислоту, 3-аминоадипиновую кислоту, бета-аланин, нафтилаланин ("naph"), аминопропионовую кислоту, 2-аминобутановую кислоту, 4-аминобутановую кислоту, 6-аминокапроновую кислоту, 2-аминогептановую кислоту, 2-аминоизобутановую кислоту, 3-аминоизобутановую кислоту, 2-аминопимелиновую кислоту, трет-бутилглицин ("tBuG"), 2,4-диаминоизобутановую кислоту, десмозин, 2,2'-диаминопимелиновую кислоту, 2,3-диаминопропионовую кислоту, N-этилглицин, N-этилаланин, гомопронин ("hPro" или "homoP"), гидроксипролин, алло-гидроксипролин, 3-гидроксипролин ("3Hyp"), 4-гидроксипролин ("4Hyp"), изодесмозин, алло-изолейцин, N-метилаланин ("MeAla" или "Nime"), N-алкилглицин ("NAG"), в том числе N-метилглицин, N-метилизолейцин, N-алкилпентилглицин ("NAPG"), в том числе N-метилпентилглицин, N-метилвалин, нафтилаланин, норвалин ("Norval"), норлейцин ("Norleu"), октилглицин ("OctG"), орнитин ("Orn"), пентилглицин ("pG" или "PGly"), пиперидиновую кислоту, тиопролин ("ThioP" или "tPro"), гомолизин ("hLys") и гомоаргинин ("hArg").

Термин "аналог аминокислоты" относится к природным или неприродным аминокислотам, в которых одна или несколько из C-концевой карбоксигруппы, N-концевой аминогруппы и функциональной группы боковой цепи были химически блокированы, обратимо или необратимо, или иным образом модифицированы до другой функциональной группы. Например, бета-метилловый сложный эфир аспарагиновой кислоты является аминокислотным аналогом аспарагиновой кислоты; N-этилглицин является аминокислотным аналогом глицина; или аланин карбоксамид является аминокислотным аналогом аланина. Другие аналоги аминокислот включают метионинсульфоксид, метионинсульфон, S-(карбоксиметил)-цистеин, S-(карбоксиметил)-цистеинсульфоксид и S-(карбоксиметил)-цистеинсульфон.

Используемый в настоящем документе термин "пептид" относится к короткому полимеру аминокислот, связанных вместе пептидными связями. В отличие от других аминокислотных полимеров (например, белков, полипептидов и т.д.) пептиды состоят из приблизительно 75 аминокислот или меньше в длину. Пептид может содержать природные аминокислоты, не встречающиеся в природе аминокислоты, аналоги аминокислот и/или модифицированные аминокислоты. Пептид может быть подпоследовательностью встречающегося в природе белка или не встречающейся в природе (синтетической) последовательностью.

Используемый в настоящем документе термин "мутантный пептид" относится к варианту пептида, имеющему аминокислотную последовательность, отличную от наиболее часто встречающегося в природе варианта, называемого последовательностью "дикого типа". Мутантный пептид может содержать од-

ну или несколько аминокислотных замен, делеций или вставок по сравнению с последовательностью дикого типа. Мутантный пептид может представлять собой субпоследовательность мутантного белка или полипептида (например, субпоследовательность встречающегося в природе белка, который не является наиболее распространенной в природе последовательностью), или может представлять собой пептид, который не является субпоследовательностью встречающегося в природе белка или полипептида. Например, термин "мутантный пептид ароС-II" может представлять собой субпоследовательность мутантной версии ароС-II или может представлять собой отличную последовательность, не обнаруженную во встречающихся в природе белках ароС-II.

Используемый в настоящем документе термин "синтетический пептид" относится к пептиду, имеющему аминокислотную последовательность, отличную от таковой, обнаруженной в природных пептидах и/или белках. Синтетический белок не является субпоследовательностью встречающегося в природе белка, либо дикого типа (т. е. наиболее распространенного) или его мутантных версий. Например, термин "синтетический пептид ароС-II" не является субпоследовательностью встречающегося в природе ароС-II. Используемый в настоящем документе термин "синтетический пептид" может означать полученный или синтезированный любым подходящим способом (например, рекомбинантной экспрессией, химическим синтезом, ферментативным синтезом и т.д.).

Термины "пептидный миметик" или "пептидомиметик" относятся к подобной пептиду молекуле, которая имитирует последовательность, полученную из белка или пептида. Пептидный миметик или пептидомиметик может включать аминокислоты и/или неаминокислотные компоненты. Примеры пептидомиметиков включают химически модифицированные пептиды, пептоиды (боковые группы присоединены к атому азота пептидного скелета, а не к атомам α -углерода), β -пептиды (аминогруппа соединяется с атомом β -углерода, а не α -углерода) и т.д. Химическая модификация включает одну или несколько модификаций по аминокислотным боковым группам, атомам α -углерода, концевой аминогруппе или концевой карбоксигруппе. Химическая модификация может представлять собой добавление химических фрагментов, создание новых связей или удаление химических фрагментов. Модификации по аминокислотным боковым группам включают без ограничения ацилирование лизиновых ϵ -аминогрупп, N-алкилирование аргинина, гистидина или лизина, алкилирование групп глутаминовой или аспарагиновой карбоновых кислот, образование лактама путем циклизации лизиновых ϵ -аминогрупп с карбоксильными группами боковых групп глутаминовой или аспарагиновой кислот, углеводородное "сшивание" (например, для стабилизации конформаций альфа-спирали) и деамидирование глутамин или аспарагин. Модификации концевой аминогруппы включают без ограничения модификации дезамино, N-нижнего алкила, N-ди-нижнего алкила, ограниченных алкилов (например, разветвленных, циклических, слитых, адамантила) и N-ацила. Модификации концевой карбоксигруппы включают без ограничения модификации амида, нижнего алкил-амида, ограниченных алкилов (например, разветвленных, циклических, слитых, адамантила), алкила, диалкиламида и сложного эфира нижнего алкила. Низшим алкилом является C_1 - C_4 -алкил. Кроме того, одна или несколько боковых групп или концевых групп могут быть защищены защитными группами, известными рядовым специалистам в области химии пептидов. Атом α -углерода аминокислоты может быть моно- или диметилирован.

Используемый в настоящем документе термин "консервативная" аминокислотная замена относится к замене аминокислоты в пептиде или полипептиде другой аминокислотой, обладающей подобными химическими свойствами, такими как размер или заряд. Для целей настоящего раскрытия каждая из следующих восьми групп содержит аминокислоты, которые представляют собой консервативные замены друг для друга:

- 1) аланин (A) и глицин (G);
- 2) аспарагиновая кислота (D) и глутаминовая кислота (E);
- 3) аспарагин (N) и глутамин (Q);
- 4) аргинин (R) и лизин (K);
- 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M) и валин (V);
- 6) фенилаланин (F), тирозин (Y) и триптофан (W);
- 7) серин (S) и треонин (T); и
- 8) цистеин (C) и метионин (M).

Встречающиеся в природе остатки могут быть разделены на классы на основании общих свойств боковых групп, например, полярные положительные (гистидин (H), лизин (K) и аргинин (R)); полярные отрицательные (аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E)); полярные нейтральные (серин (S), треонин (T), аспарагин (N), глутамин (Q)); неполярные алифатические (аланин (A), валин (V), лейцин (L), изолейцин (I), метионин (M)); неполярные ароматические (фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W)); пролин и глицин; а также цистеин. Используемый в настоящем документе термин "полуконсервативная" аминокислотная замена относится к замене аминокислоты в пептиде или полипептиде другой аминокислотой из того же класса.

Согласно некоторым вариантам осуществления, если не указано иное, консервативная или полу-консервативная аминокислотная замена также может охватывать не встречающиеся в природе аминокислоты.

кислотные остатки, которые обладают химическими свойствами, подобными природному остатку. Такие не встречающиеся в природе остатки, как правило, включаются с помощью химического синтеза пептидов, а не синтезом в биологических системах. Они включают без ограничения пептидомиметики и другие обратимые или инвертированные формы аминокислотных фрагментов. Варианты осуществления настоящего изобретения включают природные аминокислоты, не встречающиеся в природе аминокислоты и аналоги аминокислот. Например, норлейцин может быть использован для замены метионина.

Неконсервативные замены могут включать обмен представителя одного класса на представителя из другого класса.

Используемый в настоящем документе термин "идентичность последовательностей" относится к степени, с которой две полимерных последовательности (например, пептид, полипептид, нуклеиновая кислота и т.д.) обладают такой же последовательной композицией мономерных субъединиц. Термин "подобие последовательностей" относится к степени, с которой две полимерных последовательности (например, пептид, полипептид, нуклеиновая кислота и т.д.) отличаются только консервативными и/или полуконсервативными аминокислотными заменами. "Процентную идентичность последовательностей" (или "процентное подобие последовательностей") вычисляют путем: (1) сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения (например, длина более длинной последовательности, длина более короткой последовательности, заданное окно и т.д.), (2) определения числа положений, содержащих идентичные (или подобные) мономеры (например, одинаковые аминокислоты встречаются в обеих последовательностях, подобные аминокислоты встречаются в обеих последовательностях), с получением числа совпадающих положений, (3) деления числа совпадающих положений на суммарное число положений в окне сравнения (например, длина более длинной последовательности, длина более короткой последовательности, заданное окно) и (4) умножение результата на 100 с получением процентной идентичности последовательностей или процентного подобия последовательностей. Например, если пептиды А и В имеют в длину 20 аминокислот и имеют идентичные аминокислоты во всех положениях, кроме 1, то пептид А и пептид В характеризуются 95% идентичностью последовательностей. Если бы аминокислоты в неидентичном положении обладали одинаковыми биофизическими характеристиками (например, обе были бы кислотными), то пептид А и пептид В характеризовались бы 100% подобием последовательностей. В качестве другого примера, если пептид С имеет в длину 20 аминокислот, а пептид D имеет в длину 15 аминокислот, и 14 из 15 аминокислот в пептиде D идентичны таковым части пептида С, то пептиды С и D характеризуются 70% идентичностью последовательностей, но пептид D характеризуется 93,3% идентичностью последовательностей с оптимальным окном сравнения пептида С. С целью вычисления "процентной идентичности последовательностей" (или "процентного подобия последовательностей") в настоящем документе любые пропуски в выравниваемых последовательностях рассматриваются как не совпадающие в этом положении.

Используемый в настоящем документе термин "сгруппированные остатки" относится к набору аминокислот в пептиде, полипептиде или белке, которые физически располагаются вместе в трехмерном пространстве. Сгруппированные остатки могут быть или не быть последовательными в первичной последовательности пептида, полипептида или белка. Остатки могут быть сгруппированы в глобулярный домен, могут присутствовать на одной и той же поверхности или могут быть представлены на одних и тех же конце или стороне вторичной структуры (например, альфа-спирали) или третичной структуры в пептиде, полипептиде или белке. Согласно некоторым вариантам осуществления в дополнение к физическому расположению вместе сгруппированные остатки также демонстрируют некоторую степень подобия в характеристиках остатков (например, размер, заряд, полярности и т.д.).

Используемые в настоящем документе термин "гидрофобный момент (μ_H)" относится к мере амфипатичности спирали. Степень амфипатичности (т. е. степень асимметрии гидрофобности) в многодоменных пептидах или пептидных аналогах могут быть определены количественно путем вычисления гидрофобного момента (μ_H) каждого из амфипатических α -спиральных доменов. Способы вычисления μ_H для конкретной пептидной последовательности хорошо известны в уровне техники и описываются, например, в Eisenberg et al, Faraday Symp. Chem. Soc., 17: 109-120, 1982; Eisenberg et al, PNAS 81:140-144, 1984; и Eisenberg et al., J. Mol. Biol. 179:125-142, 1984. Фактический μ_H , полученный для конкретной пептидной последовательности будет зависеть от суммарного числа аминокислотных остатков, составляющих пептид. Амфипатичность пептидов различной длины можно непосредственно сравнивать с помощью среднего гидрофобного момента. Средний гидрофобный момент на остаток может быть получен путем деления μ_H на число остатков в пептиде.

Если не указано иное, термин "ароС-II" (синонимично "ароС2") относится к человеческому аполипопротеину С-II. Остатки нумеруют в настоящем документе по их положению в зрелой форме человеческого белка ароС-II из 79 аминокислот после расщепления сигнальной последовательности. Зрелый белок аполипопротеина С-II представляет собой белок из 79 аминокислот, который включает три спирали: спираль 1, остатки 17-38; спираль 2, остатки 45-57, и спираль 3, остатки 65-74/75 (Zdunek et al., Biochemistry 42: 1872-1889, 2003). Активирующая липазу область в ароС-II ранее была расположена в С-концевом домене последовательности от приблизительно остатка 56, тогда как N-концевой домен (остат-

ки 1-50) последовательности вовлекается в связывание липидов. Последовательности нуклеиновой кислоты и белка для ортологов ароС-II из ряда видов являются общедоступными. Учетным номером в GenBank NCBI для предшественника человеческого ароС-II является NP000474. Аминокислотные последовательности зрелого человеческого ароС-II, аминокислотные остатки 40-79 человеческого ароС-II и нативные спирали 1-3 человеческого ароС-II показаны в приведенной ниже табл. 1.

Таблица 1		
Название	Последовательность	SEQ ID NO
Нативный ароС-II (полноразмерный)	TQQPQQDEMPSTFLTQVKESLSSYWESAKTAAQ NLYEKTYLPAVDEKLRDLYSKSTAAMSTYTGIFT DQVLSVLKGEE	SEQ ID NO: 1
Нативный ароС-II (а.а. 40 – а.а. 79)	TYLPAVDEKLRDLYSKSTAAMSTYTGIFTDQVLS VLKGEE	SEQ ID NO: 2
Нативный ароС-II (спираль 1)	QVKESLSSYWESAKTAAQNLYE	SEQ ID NO: 3
Нативный ароС-II (спираль 2)	VDEKLRDLYSKST	SEQ ID NO: 4
Нативный ароС-II (спираль 3)	GIFTDQVLSVL	SEQ ID NO: 5

Если не указано иное, термин "LPL" относится к липопроteinлипазе. Учетным номером в GenBank NCBI для человеческого белка LPL является NP000228.

Используемый в настоящем документе термин "субъект" в широком смысле относится к любому животному, в том числе без ограничения к людям и отличным от человека животным (например, собакам, кошкам, коровам, лошадям, овцам, свиньям, домашней птице, рыбе, ракообразным и т.д.). Используемый в настоящем документе термин "больной", как правило, относится к субъекту, который получает лечение от заболевания или состояния.

Используемый в настоящем документе термин "эффективное количество" относится к количеству композиции (например, синтетического пептида), достаточному для достижения полезных или желаемых результатов. Эффективное количество может быть введено за одно или несколько введений, применений или дозировок и не предназначено для ограничения конкретным составом или путем введения.

Используемый в настоящем документе термины "введение" и "процесс введения" относятся к действию обеспечения лекарственного средства, пролекарства или другого средства или терапевтического лечения (например, синтетического пептида) субъекту или *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo* клеткам, тканям и органам. Типичные пути введения в организм человека могут осуществляться через пространство под арахноидальной мембраной головного или спинного мозга (интратекальный), глаза (офтальмологический), рот (оральный), кожу (местный или чрескожный), нос (назальный), легкие (ингаляционный), слизистую оболочку полости рта (буккальный или подъязычный), ухо, ректально, вагинально, с помощью инъекции (например, внутривенно, подкожно, внутрь опухоли, внутривентрикулярно и т.д.) и т.п. Используемые в настоящем документе термины "совместное введение" и "процесс совместного введения" относятся к введению по меньшей мере двух средств (например, нескольких синтетических пептидов или синтетического пептида и другого терапевтического средства) или терапевтических средств субъекту. Согласно некоторым вариантам осуществления совместное введение двух или нескольких средств или терапевтических средств является одновременным. Согласно другим вариантам осуществления первое средство/терапевтическое средство вводят до второго средства/терапевтического средства. Специалистам в данной области понятно, что составы и/или пути введения различных используемых средств или терапевтических средств могут варьировать. Соответствующая дозировка для совместного введения может быть без труда определена специалистом в данной области. Согласно некоторым вариантам осуществления при совместном введении средств или терапевтических средств соответствующие средства или терапевтические средства вводят при более низких дозировках, чем соответствующие для их введения отдельно. Таким образом, совместное введение является особенно желательным в вариантах осуществления, при которых совместное введение средств или терапевтических средств снижает необходимую дозировку потенциально вредного (например, токсичного) средства(средств) и/или при которых совместное введение двух или более средств приводит к сенсибилизации субъекта к полезным эффектам одного из средств путем совместного введения другого средства.

Используемый в настоящем документе термин "лечение" означает подход к получению пользы или предполагаемого клинического результата. Польза или предполагаемый клинический результат могут включать облегчение симптомов, снижение тяжести заболевания, подавление основной причины заболевания или состояния, стабилизацию заболевания в непрогрессирующем состоянии, замедление развития заболевания и/или улучшение или облегчение состояний заболевания.

Используемый в настоящем документе термин "фармацевтическая композиция" относится к комбинации активного средства (например, миметического пептида ароС-II) с носителем, инертным или активным, что делает композицию особенно подходящей для терапевтического или диагностического применения *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*.

Используемые в настоящем документе термины "фармацевтически приемлемый" или "фармакологически приемлемый" относятся к композициям, которые, по сути, не дают побочных реакций, например, токсических, аллергических или иммунологических реакций, при введении субъекту.

Используемый в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к любому из стандартных фармацевтических носителей, включающих без ограничения забуференный фосфатом солевой раствор, воду, эмульсии (например, такие как эмульсии масло/вода или вода/масло), глицерин, жидкие полиэтиленгликоли, апротонные растворители, такие как диметилсульфоксид, N-метилпирролидон и их смеси, а также различные типы увлажняющих средств, солюбилизующие средства, антиоксиданты, объемообразующие средства, белковые носители, такие как альбумины, любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, лаурилсульфат натрия, изотонические и замедляющие абсорбцию средства, разрыхлители (например, картофельный крахмал или натрия крахмалгликолят) и т.п. Композиции также могут включать стабилизаторы и консерванты. Примеры носителей, стабилизаторов и вспомогательных веществ см., например, в Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 21th Ed., Mack Publ. Co., Easton, Pa. (2005), включенной в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

1.1. Миметический пептид ароС-II.

Согласно первому аспекту в настоящем документе раскрывается выделенный миметический пептид ароС-II.

Согласно некоторым вариантам осуществления выделенный миметический пептид ароС-II представляет собой многоспиральный пептид, содержащий множество спиральных доменов. Согласно некоторым многоспиральным вариантам осуществления один или несколько спиральных доменов являются амфипатическими и могут связываться с липидами и/или с поверхностью липопротеинов. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенный миметический пептид ароС-II представляет собой двухспиральный пептид, содержащий два спиральных домена. Согласно некоторым двухспиральным вариантам осуществления по меньшей мере один спиральный домен является амфипатическим. Согласно некоторым двухспиральным вариантам осуществления один спиральный домен является амфипатическим, а другой спиральный домен является спиралью типа G, находящейся в глобулярных белках. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенный миметический пептид ароС-II является односпиральным пептидом. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления спиральный домен является амфипатическим. Согласно некоторым другим из таких вариантов осуществления спиральный домен является спиралью типа G.

Согласно различным вариантам осуществления выделенный миметический пептид ароС-II составляет не более чем 75 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенный миметический пептид ароС-II составляет не более чем 70 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенный миметический пептид ароС-II составляет не более чем 60 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенный миметический пептид ароС-II составляет не более чем 50 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенный миметический пептид ароС-II составляет не более чем 40 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенный миметический пептид ароС-II составляет не более чем 30 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенный миметический пептид ароС-II составляет не более чем 20 аминокислот.

Согласно типичным вариантам осуществления выделенный миметический пептид ароС-II включает первый спиральный домен, шарнирную область и второй спиральный домен.

Согласно некоторым вариантам осуществления выделенный миметический пептид ароС-II включает первый спиральный домен, шарнирную область и второй спиральный домен в порядке от N-конца до C-конца. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления первый спиральный домен является амфипатическим. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления второй спиральный домен образует глобулярную спираль. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления первый спиральный домен является амфипатическим, а второй спиральный домен образует глобулярную спираль.

Согласно некоторым вариантам осуществления первый домен обладает аффинностью связывания с липопротеинами. Согласно некоторым вариантам осуществления второй домен способен активировать липопротеинлипазу (LPL). Согласно некоторым вариантам осуществления первый домен обладает аффинностью связывания с липопротеинами, а второй домен способен активировать липопротеинлипазу (LPL). Согласно некоторым вариантам осуществления выделенный миметический пептид ароС-II способен активировать липолиз с помощью LPL. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенный миметический пептид ароС-II способен заменять ароС-III в липопротеинах.

Согласно различным вариантам осуществления выделенный миметический пептид ароС-II способен снижать содержание триглицерида (TG) in vivo. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления пептид способен снижать повышенное содержание TG, вызванное дефицитом LPL. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления пептид способен снижать повышенное содержание TG, вызванное повышенным содержанием ароС-III. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления пептид способен снижать повышенное содержание TG, вызванное дефицитом ароС-II. Согласно сле-

дующим из таких вариантов осуществления пептид способен снижать постпрандиальное повышенное содержание TG.

Согласно различным вариантам осуществления выделенный миметический пептид ароС-II имеет аминокислотную последовательность, указанную под любым SEQ ID NO: 6-52 (табл. 2). Согласно некоторым вариантам осуществления выделенный миметический пептид ароС-II характеризуется 90% подобием последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности, указанной под любым SEQ ID NO: 6-52. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенный миметический пептид ароС-II характеризуется 91, 92, 93, 94 или 95% подобием последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности, указанной под любым SEQ ID NO: 6-52. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенный миметический пептид ароС-II характеризуется 96, 97, 98 или 99% подобием последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности, указанной под любым SEQ ID NO: 6-52.

1.1.1. Первый спиральный домен.

Согласно различным вариантам осуществления первый спиральный домен обладает аффинностью связывания с липопротеинами. Согласно некоторым вариантам осуществления первый спиральный домен является амфипатическим. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления спиральный домен характеризуется баллом гидрофобного момента от приблизительно 6 до приблизительно 15, например, от приблизительно 7 до приблизительно 15, от приблизительно 8 до приблизительно 15, от приблизительно 9 до приблизительно 15, от приблизительно 10 до приблизительно 15, от приблизительно 11 до приблизительно 15, от приблизительно 12 до приблизительно 15, от приблизительно 13 до приблизительно 15, от приблизительно 14 до приблизительно 15, от приблизительно 8 до приблизительно 14, от приблизительно 9 до приблизительно 14, от приблизительно 10 до приблизительно 14, от приблизительно 11 до приблизительно 14, от приблизительно 12 до приблизительно 14, от приблизительно 13 до приблизительно 14, от приблизительно 8 до приблизительно 13, от приблизительно 9 до приблизительно 13, от приблизительно 10 до приблизительно 13, от приблизительно 11 до приблизительно 13, от приблизительно 12 до приблизительно 13, от приблизительно 8 до приблизительно 12, приблизительно 9 до приблизительно 12, от приблизительно 10 до приблизительно 12, от приблизительно 11 до приблизительно 12, от приблизительно 8 до приблизительно 11, от приблизительно 9 до приблизительно 11, от приблизительно 10 до приблизительно 11, от приблизительно 8 до приблизительно 10, от приблизительно 9 до приблизительно 10 или от приблизительно 8 до приблизительно 9. Гидрофобный момент пептида можно вычислять с помощью онлайн инструментов, таких как на r2lab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi.

Согласно некоторым вариантам осуществления первый спиральный домен выделенного миметического пептида ароС-II представляет собой нативную спираль 1 белка ароС-II. Спираль 1 белка ароС-II включает аминокислотные остатки 17-38 (SEQ ID NO: 3), пронумерованные согласно их положению в зрелом белке ароС-II из 79 аминокислот. Согласно некоторым другим вариантам осуществления первый спиральный домен выделенного миметического пептида ароС-II представляет собой вариант спирали 1 белка ароС-II.

Согласно некоторым вариантам осуществления первый спиральный домен выделенного миметического пептида ароС-II представляет собой нативную спираль 2 белка ароС-II. Спираль 2 белка ароС-II включает аминокислотные остатки 45-57 (SEQ ID NO: 4), пронумерованные согласно их положению в зрелом белке ароС-II из 79 аминокислот. Согласно некоторым другим вариантам осуществления первый спиральный домен выделенного миметического пептида ароС-II представляет собой вариант спирали 2 белка ароС-II. Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 2 белка ароС-II включает по меньшей мере одну модификацию нативной спирали 2 белка ароС-II. Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 2 белка ароС-II включает множество модификаций нативной спирали 2 белка ароС-II. Согласно различным вариантам осуществления каждая модификация независимо выбрана из удлинений, усечений, мутаций и/или химических модификаций.

Согласно некоторым другим вариантам осуществления первый спиральный домен выделенного миметического пептида ароС-II представляет собой вариант амфипатической спирали, обнаруженной в аполипептеинах, отличных от ароС-II или от других белков, которые могут связывать липиды.

1.1.1.1. Удлинение спирали 2 ароС-II.

Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 2 ароС-II включает удлинение спирали 2 ароС-II. Согласно различным вариантам осуществления удлинение усиливает амфипатичность варианта спирали 2 ароС-II по сравнению с нативной спиралью 2 ароС-II. Согласно некоторым вариантам осуществления удлинение усиливает аффинность варианта спирали 2 ароС-II в отношении связывания с липопротеинами.

Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 2 ароС-II удлиняется на N-конце. Согласно различным вариантам осуществления спираль 2 ароС-II удлиняется на 1-20 аминокислот на N-конце. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления спираль 2 ароС-II удлиняется на 1-10 аминокислот на N-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 2 ароС-II удлиняется на 1 аминокислоту на N-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 2 ароС-II удлиняется на 2 аминокислоты на N-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 2 ароС-II удлиняется

Согласно типичным вариантам осуществления спираль 2 ароС-II удлиняется на 5 аминокислот на N-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 2 ароС-II удлиняется на нативную 3'-5'-дирекционного типа аминокислотную последовательность человеческого ароС-II. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 2 ароС-II удлиняется на мутант нативной 3'-5'-дирекционного типа аминокислотной последовательности человеческого ароС-II. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислоты находятся в положениях 40-44, нумерованных согласно их положению в зрелом человеческом белке ароС-II из 79 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 2 ароС-II включает аспарагиновую кислоту в положении 40. Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 2 ароС-II включает тирозин или триптофан в положении 41. Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 2 ароС-II включает лейцин в положении 42. Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 2 ароС-II включает лизин или аргинин в положении 43. Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 2 ароС-II включает аланин или глутаминовую кислоту в положении 44.

Согласно конкретным вариантам осуществления, если спираль 2 аroC-II удлиняется на 5 аминокислот на N-конце, то вариант спирали 2 аroC-II включает аспарагиновую кислоту в положении 40, тирозин в положении 41, лейцин в положении 42, лизин в положении 43 и аланин в положении 44.

Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 2 ароС-II усекается на N-конце. Согласно различным вариантам осуществления спираль 2 ароС-II усекается на 1-12 аминокислот на N-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 2 ароС-II усекается на 1 аминокислоту на N-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 2 ароС-II усекается на 2 аминокислоты на N-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 2 ароС-II усекается на 3 аминокислоты на N-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 2 ароС-II усекается на 4 аминокислоты на N-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 2 ароС-II усекается на 5 аминокислот на N-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 2 ароС-II усекается на 6 аминокислот на N-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 2 ароС-II усекается на 7 аминокислот на N-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 2 ароС-II усекается на 8 аминокислот на N-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 2 ароС-II усекается на 9 аминокислот на N-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 2 ароС-II усекается на 10 аминокислот на N-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 2 ароС-II усекается на 11 аминокислот на N-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 2 ароС-II усекается на 12 аминокислот на N-конце.

Согласно конкретным вариантам осуществления, если спираль 2 ароС-II усекается на 9 аминокис-

лот на N-конце, то аминокислотные остатки 45-53 нативной спирали 2 ароС-II делетированы.

1.1.1.3. Мутация спирали 2 ароС-II.

Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 2 ароС-II включает по меньшей мере одну мутацию спирали 2 ароС-II. Согласно различным вариантам осуществления мутация усиливает амфипатичность варианта спирали 2 ароС-II по сравнению с нативной спиралью 2 ароС-II. Согласно некоторым вариантам осуществления мутация усиливает аффинность варианта спирали 2 ароС-II в отношении связывания с липопротеинами.

Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 2 ароС-II включает одну мутацию спирали 2 ароС-II. Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 2 ароС-II включает две мутации спирали 2 ароС-II. Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 2 ароС-II включает три мутации спирали 2 ароС-II. Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 2 ароС-II включает четыре мутации спирали 2 ароС-II. Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 2 ароС-II включает пять мутаций спирали 2 ароС-II. Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 2 ароС-II включает более пяти мутаций спирали 2 ароС-II.

Согласно некоторым вариантам осуществления мутация представляет собой аминокислотную замену. Согласно некоторым вариантам осуществления мутация представляет собой вставку аминокислоты. Согласно некоторым вариантам осуществления мутация представляет собой делецию аминокислоты.

Согласно некоторым вариантам осуществления оригинальная аминокислота спирали 2 ароС-II заменяется природной аминокислотой. Согласно некоторым вариантам осуществления оригинальная аминокислота спирали 2 ароС-II заменяется неприродной аминокислотой. Согласно некоторым вариантам осуществления оригинальная аминокислота спирали 2 ароС-II заменяется аналогом аминокислоты. Согласно некоторым вариантам осуществления оригинальная аминокислота спирали 2 ароС-II заменяется химически модифицированной аминокислотой.

Согласно различным вариантам осуществления аминокислотная замена представляет собой консервативную или полуконсервативную замену. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная замена оказывает минимальное влияние на активность и/или структуру полученного в результате пептида. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная замена поддерживает структуру пептидного скелета на участке замены, например, в виде спиральной конформации. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная замена поддерживает заряд или гидрофобность молекулы на целевом сайте. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная замена поддерживает объем боковой группы аминокислоты.

Согласно различным вариантам осуществления аминокислотная замена представляет собой неконсервативную замену. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная замена обеспечивает существенные изменения свойства пептида. Согласно некоторым вариантам осуществления гидрофильный остаток заменяется гидрофобным остатком. Согласно некоторым другим вариантам осуществления гидрофобный остаток заменяется гидрофильным остатком. Согласно некоторым вариантам осуществления цистеин или пролин заменяется другим остатком. Согласно некоторым другим вариантам осуществления нецистеин или непролин заменяется цистеином или пролином. Согласно некоторым вариантам осуществления остаток, имеющий электроположительную боковую группу, заменяется электроотрицательным остатком. Согласно некоторым другим вариантам осуществления остаток, имеющий электроотрицательную боковую группу, заменяется электроположительным остатком. Согласно некоторым вариантам осуществления остаток, имеющий объемную боковую группу, заменяется остатком, не имеющим боковую группу. Согласно некоторым другим вариантам осуществления остаток, не имеющий боковую группу, заменяется остатком, имеющим объемную боковую группу. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная замена осуществляется в положении 45. Согласно некоторым вариантам осуществления валин в положении 45 заменяется фенилаланином.

Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная замена осуществляется в положении 46. Согласно некоторым вариантам осуществления аспарагиновая кислота в положении 46 заменяется фенилаланином. Согласно некоторым вариантам осуществления аспарагиновая кислота в положении 46 заменяется лизином. Согласно некоторым вариантам осуществления аспарагиновая кислота в положении 46 заменяется аминоизобутановой кислотой.

Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная замена осуществляется в положении 47.

Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная замена осуществляется в положении 48. Согласно некоторым вариантам осуществления лизин в положении 48 заменяется аргинином.

Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная замена осуществляется в положении 49. Согласно некоторым вариантам осуществления лейцин в положении 49 заменяется лизином. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления лизин модифицируется жирной кислотой.

Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная замена осуществляется в положении 50. Согласно некоторым вариантам осуществления аргинин в положении 50 заменяется лизином.

Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная замена осуществляется в положении 51.

Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная замена осуществляется в положении 52.

Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная замена осуществляется в положении 53. Согласно некоторым вариантам осуществления тирозин в положении 53 заменяется лейцином.

Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная замена осуществляется в положении 54. Согласно некоторым вариантам осуществления серин в положении 54 заменяется глутаминовой кислотой. Согласно некоторым вариантам осуществления серин в положении 54 заменяется лизином. Согласно некоторым вариантам осуществления серин в положении 54 заменяется аспарагиновой кислотой. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная замена осуществляется в положении 55. Согласно некоторым вариантам осуществления лизин в положении 55 заменяется аргинином.

Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная замена осуществляется в положении 56. Согласно некоторым вариантам осуществления серин в положении 56 заменяется фенилаланином. Согласно некоторым вариантам осуществления серин в положении 56 заменяется лизином. Согласно некоторым вариантам осуществления серин в положении 56 заменяется аланином. Согласно некоторым вариантам осуществления серин в положении 56 заменяется аминокислотой.

Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная замена осуществляется в положении 57. Согласно некоторым вариантам осуществления треонин в положении 57 заменяется фенилаланином.

Согласно конкретным вариантам осуществления вариант спирали 2 ароС-II включает две аминокислотных замены, и аминокислотные замены осуществляются в положении 46 и положении 56. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления аспарагиновая кислота в положении 46 заменяется фенилаланином, а серин в положении 56 заменяется фенилаланином.

Согласно конкретным вариантам осуществления вариант спирали 2 ароС-II включает три аминокислотных замены, и аминокислотные замены осуществляются в положении 46, положении 54 и положении 56. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления аспарагиновая кислота в положении 46 заменяется фенилаланином, серин в положении 54 заменяется глутаминовой кислотой, а серин в положении 56 заменяется фенилаланином.

1.1.1.4. Химическая модификация варианта спирали 2 ароС-II.

Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 2 ароС-II включает по меньшей мере одну химическую модификацию. Согласно различным вариантам осуществления химическая модификация усиливает амфипатичность варианта спирали 2 ароС-II по сравнению с нативной спиралью 2 ароС-II. Согласно некоторым вариантам осуществления химическая модификация усиливает аффинность варианта спирали 2 ароС-II в отношении связывания с липопротеинами.

Согласно некоторым вариантам осуществления химическая модификация осуществляется на N-конце первого домена. Согласно различным вариантам осуществления аминоконец N-конца может быть модифицирован путем конъюгации с различными функциональными группами. Показали, что нейтрализация концевой заряда синтетического пептида, имитирующего аполипопротеины, усиливает его аффинность в отношении липидов (Yancey et al, Biochem. 34:7955-7965, 1995; Venkatachalapathi et al., Protein: Structure, Function and Genetics 15:349-359, 1993). Например, ацетилирование аминоконца амфипатических пептидов усиливает аффинность пептида в отношении липидов (Mishra et al., J. Biol. Chem. 269:7185-7191, 1994). Другие возможные модификации концов описываются, например, в Brouillette et al., Biochem. Biophys. Acta 1256: 103-129, 1995; Mishra et al., J. Biol. Chem. 269:7185-7191, 1994; и Mishra et al., J. Biol. Chem. 270:1602-1611, 1995.

Согласно некоторым вариантам осуществления химическая модификация осуществляется в боковой группе аминокислоты первого домена. Модификации в боковых группах аминокислот включают без ограничения ацилирование ϵ -аминогрупп лизина, N-алкилирование аргинина, гистидина или лизина, алкилирование карбоксильных групп глутаминовой или аспарагиновой кислот, образование лактама путем циклизации ϵ -аминогрупп лизина с карбоксильными группами боковых групп глутаминовой или аспарагиновой кислоты, углеводородное "сшивание" (например, для стабилизации конформаций альфа-спирали) и деамидирование глутамина или аспарагина. Согласно некоторым вариантам осуществления первый домен модифицируется путем замещения одной или нескольких боковых групп другими боковыми группами, такими как алкил, низший алкил, циклический 4-, 5-, 6-, 7-членный алкил, амид, амид-низший алкил, амид-ди(низший алкил), низший алкокси, гидроксильный, карбоксильный и их низшие сложноэфирные производные, а также 4-, 5-, 6-, 7-членными гетероциклами. Например, могут быть получены пролиновые аналоги, в которых размер кольца пролинового остатка изменяется от 5-членного кольца до 4-, 6- или 7-членного кольца. Циклические группы могут быть насыщенными или ненасыщенными, и если ненасыщенные, то могут быть ароматическими или неароматическими. Гетероциклические группы могут включать один или несколько гетероатомов азота, кислорода и/или серы. Примеры таких групп включают фуразанильную, фурильную, имидазольную, имидазолильную, имидазолильную, изотиазолильную, изоксазолильную, морфолильную (например, морфолино), оксазолильную, пиперазинильную (например, 1-пиперазинильную), пиперидильную (например, 1-пиперидильную, пиперидино), пира-

нильную, пиазинильную, пиазолидинильную, пиазолинильную, пиазолильную, пиадазинильную, пиаидильную, пиаимидинильную, пиаролидинильную (например, 1-пиаролидинильную), пиаролинильную, пиадиолильную, тиадиолильную, тиазолильную, тиенильную, тиоморфолинильную (например, тиоморфолино) и тиазолильную группы. Эти гетероциклические группы могут быть замещенными или незамещенными. Если группа заменяется, то заместителем может быть алкил, алкокси, галоген, кислород или замещенный или незамещенный фенил. Пептиды, а также пептидные аналоги и миметики, также могут быть ковалентно связаны с одним или несколькими из ряда небелковых полимеров, например, полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль или полиоксикалены, как описывается в патентах США №№ 4640835, 4496689, 4301144, 4670417, 4791192 и 4179337.

Согласно некоторым вариантам осуществления химическая модификация представляет собой нековалентную модификацию. Согласно некоторым другим вариантам осуществления химическая модификация ковалентно связана с модифицированной аминокислотой. Согласно различным вариантам осуществления химическая модификация может представлять собой фосфорилирование, гликозилирование или липидирование.

Согласно некоторым вариантам осуществления химическая модификация представляет собой ковалентную связь жирной кислоты. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота является насыщенной. Согласно некоторым другим вариантам осуществления жирная кислота является ненасыщенной.

Согласно различным вариантам осуществления жирная кислота включает 2-30 атомов углерода, например, 4-26 атомов углерода, 6-24 атома углерода, 10-20 атомов углерода, 12-18 атомов углерода и 14-16 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 6 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 7 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 8 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 9 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 10 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 11 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 12 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 13 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 14 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 15 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 16 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 17 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 18 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 19 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 20 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 21 атом углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 22 атома углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 23 атома углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 24 атома углерода.

Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота имеет 1, 2, 3, 4, 5 или 6 двойных связей. Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота представляет собой арахидоновую кислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота представляет собой линолевую кислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота представляет собой олеиновую кислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота представляет собой пальмитолеиновую кислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота представляет собой линоленовую кислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота представляет собой эйкозапентаеновую кислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота представляет собой докозагексаеновую кислоту.

Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота представляет собой пальмитиновую кислоту. Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота представляет собой стеариновую кислоту.

Согласно некоторым вариантам осуществления выделенный миметический пептид ароС-II включает стеариновую кислоту, ковалентно связанную с N-концевой аминокислотой. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления N-концевая аминокислота представляет собой аспарагиновую кислоту.

Согласно некоторым вариантам осуществления выделенный миметический пептид ароС-II включает стеариновую кислоту, ковалентно связанную с боковой группой лизинового остатка. Согласно конкретным вариантам осуществления, если выделенный миметический пептид ароС-II включает лизин в положении 46, то стеариновая кислота ковалентно связана с лизиновым остатком в положении 46. Согласно конкретным вариантам осуществления, если выделенный миметический пептид ароС-II включает лизин в положении 49, то стеариновая кислота ковалентно связана с лизиновым остатком в положении 49. Согласно конкретным вариантам осуществления, если выделенный миметический пептид ароС-II включает лизин в положении 56, то стеариновая кислота ковалентно связана с лизиновым остатком в

положении 56.

1.1.2. Шарнирная область.

Согласно некоторым вариантам осуществления выделенный миметический пептид ароС-II включает шарнирную область, соединяющую первый спиральный домен и второй спиральный домен. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область функционально разделяет первый спиральный домен и второй спиральный домен. Согласно различным вариантам осуществления шарнирная область помогает второму домену, который обладает активностью активации LPL, присоединиться к поверхности мицелл липопротеина. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область помогает первому спиральному домену и второму спиральному домену сохранять почти прямую конформацию, при этом второй домен отклоняется от первого домена на угол не более чем приблизительно 20° , например, не более чем приблизительно 15° , не более чем приблизительно 10° или не более чем приблизительно 5° .

1.1.2.1. Аминокислотная композиция шарнирной области.

Согласно различным вариантам осуществления шарнирная область включает 3-15 аминокислот, например, 4-12 аминокислот, 5-10 аминокислот, 6-9 аминокислот, или 7-8 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область включает 3 аминокислоты. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область включает 4 аминокислоты. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область включает 5 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область включает 6 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область включает 7 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область включает 8 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область включает 9 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область включает 10 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область включает 11 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область включает 12 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область включает 13 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область включает 14 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область включает 15 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область включает природную аминокислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область включает неприродную аминокислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область включает аналог аминокислоты.

Согласно различным вариантам осуществления шарнирная область включает пролин. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область включает гидроксипролин. Также могут быть использованы другие подходящие аминокислоты (такие как глицин, серин, треонин и аланин), которые функционально разделяют два спиральных домена.

Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область включает пролин. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления шарнирная область включает пролин в положении 58. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область включает аланин. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления шарнирная область включает аланин в положении 58. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления шарнирная область включает аланин в положении 59. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область включает норлейцин. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления шарнирная область включает норлейцин в положении 60. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область включает лизин. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления шарнирная область включает лизин в положении 60. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область включает метионин. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления шарнирная область включает метионин в положении 60. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область включает серин. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления шарнирная область включает серин в положении 61. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область включает треонин. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления шарнирная область включает треонин в положении 62. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления шарнирная область включает треонин в положении 64. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область включает тирозин. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления шарнирная область включает тирозин в положении 63.

1.1.2.2. Химическая модификация шарнирной области.

Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область включает по меньшей мере одну химическую модификацию.

Согласно некоторым вариантам осуществления химическая модификация осуществляется в боковой группе аминокислоты шарнирной области. Модификации в боковых группах аминокислот включают без ограничения ацилирование ϵ -аминогрупп лизина, N-алкилирование аргинина, гистидина или лизина, алкилирование карбоксильных групп глутаминовой или аспарагиновой кислоты, образование лактама путем циклизации ϵ -аминогрупп лизина с карбоксильными группами боковых групп глутаминовой или аспарагиновой кислоты, углеводородное "сшивание" (например, для стабилизации конформаций альфа-

спирали) и деамидирование глутамина или аспарагина. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная область модифицируется путем замещения одной или нескольких боковых групп другими боковыми группами, такими как алкил, низший алкил, циклический 4-, 5-, 6-, 7-членный алкил, амид, амид-низший алкил, амид-ди(низший алкил), низший алкокси, гидроксид, карбоксид и их низшие сложноэфирные производные, а также 4-, 5-, 6-, 7-членными гетероциклами. Например, могут быть получены пролиновые аналоги, в которых размер кольца пролинового остатка изменяется от 5-членного кольца до 4-, 6- или 7-членного кольца. Циклические группы могут быть насыщенными или ненасыщенными, и если ненасыщенные, то могут быть ароматическими или неароматическими. Гетероциклические группы могут включать один или несколько гетероатомов азота, кислорода и/или серы. Примеры таких групп включают фуразанильную, фурильную, имидазолидинильную, имидазолильную, имидазолинильную, изотиазолильную, изоксазолильную, морфолинильную (например, морфолино), оксазолильную, пиперазинильную (например, 1-пиперазинильную), пиперидильную (например, 1-пиперидильную, пиперидино), пиранильную, пиразинильную, пиразолидинильную, пиразолинильную, пиразолильную, пиридазинильную, пиридинильную, пиримидинильную, пирролидинильную (например, 1-пирролидинильную), пирролинильную, пиррольную, тиадиазолильную, тиазолильную, тиенильную, тиоморфолинильную (например, тиоморфолино) и тиазолильную группы. Эти гетероциклические группы могут быть замещенными или незамещенными. Если группа заменяется, то заместителем может быть алкил, алкоксид, галоген, кислород или замещенный или незамещенный фенил. Пептиды, а также пептидные аналоги и миметики, также могут быть ковалентно связаны с одним или несколькими из ряда небелковых полимеров, например, полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль или полиоксиды алкенов, как описывается в патентах США №№ 4640835, 4496689, 4301144, 4670417, 4791192 и 4179337.

Согласно некоторым вариантам осуществления химическая модификация представляет собой нековалентную модификацию. Согласно некоторым другим вариантам осуществления химическая модификация ковалентно связана. Согласно различным вариантам осуществления химическая модификация может представлять собой фосфорилирование, гликозилирование или липидирование.

Согласно некоторым вариантам осуществления химическая модификация представляет собой ковалентную связь жирной кислоты. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота является насыщенной. Согласно некоторым другим вариантам осуществления жирная кислота является ненасыщенной.

Согласно различным вариантам осуществления жирная кислота включает 2-30 атомов углерода, например, 4-26 атомов углерода, 6-24 атома углерода, 10-20 атомов углерода, 12-18 атомов углерода и 14-16 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 6 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 7 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 8 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 9 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 10 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 11 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 12 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 13 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 14 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 15 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 16 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 17 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 18 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 19 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 20 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 21 атом углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 22 атома углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 23 атома углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 24 атома углерода.

Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота имеет 1, 2, 3, 4, 5 или 6 двойных связей. Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота представляет собой арахидоновую кислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота представляет собой линолевую кислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота представляет собой олеиновую кислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота представляет собой пальмитолеиновую кислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота представляет собой линоленовую кислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота представляет собой эйкозапентаеновую кислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота представляет собой докозогексаеновую кислоту.

Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота представляет собой пальмитиновую кислоту. Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота представляет собой стеариновую кислоту.

Согласно некоторым вариантам осуществления выделенный миметический пептид ароС-II включает пальмитиновую кислоту, ковалентно связанную с боковой группой лизинового остатка. Согласно конкретным вариантам осуществления, если выделенный миметический пептид ароС-II включает лизин в положении 60, то пальмитиновая кислота ковалентно связана с лизиновым остатком в положении 60.

1.1.3. Второй спиральный домен.

Согласно некоторым вариантам осуществления второй спиральный домен выделенного миметического пептида ароС-II представляет собой нативную спираль 3 белка ароС-II. Спираль 3 белка ароС-II включает аминокислотные остатки 65-74/75 (SEQ ID NO: 5), пронумерованные согласно их положению в зрелом белке ароС-II из 79 аминокислот. Согласно некоторым другим вариантам осуществления второй спиральный домен выделенного миметического пептида ароС-II представляет собой вариант спирали 3 белка ароС-II.

Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 3 белка ароС-II включает модификации нативной спирали 3 белка ароС-II. Согласно различным вариантам осуществления модификации включают удлинения, усечения, мутации и химические модификации.

1.1.3.1. Удлинение спирали 3 ароС-II.

Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 3 ароС-II включает удлинение спирали 3 ароС-II. Согласно некоторым вариантам осуществления удлинение усиливает способность варианта спирали 3 ароС-II активировать липолиз с помощью LPL.

Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 3 ароС-II удлиняется на С-конце. Согласно различным вариантам осуществления спираль 3 ароС-II удлиняется на 1-20 аминокислот на С-конце. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления спираль 3 ароС-II удлиняется на 1-10 аминокислот на С-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 3 ароС-II удлиняется на 1 аминокислоту на С-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 3 ароС-II удлиняется на 2 аминокислоты на С-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 3 ароС-II удлиняется на 3 аминокислоты на С-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 3 ароС-II удлиняется на 4 аминокислоты на С-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 3 ароС-II удлиняется на 5 аминокислот на С-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 3 ароС-II удлиняется на 6 аминокислот на С-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 3 ароС-II удлиняется на 7 аминокислот на С-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 3 ароС-II удлиняется на 8 аминокислот на С-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 3 ароС-II удлиняется на 9 аминокислот на С-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 3 ароС-II удлиняется на 10 аминокислот на С-конце.

Согласно конкретным вариантам осуществления, если спираль 3 ароС-II удлиняется на 4 аминокислоты на С-конце, то аминокислотами являются лизин, глицин, глутаминовая кислота и глутаминовая кислота от N-конца до С-конца. Согласно конкретным вариантам осуществления, если спираль 3 ароС-II удлиняется на 4 аминокислоты на С-конце, то аминокислотами являются аргинин, глицин, глутаминовая кислота и глутаминовая кислота от N-конца до С-конца.

1.1.3.2. Мутация спирали 3 ароС-II.

Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 3 ароС-II включает по меньшей мере одну мутацию спирали 3 ароС-II. Согласно некоторым вариантам осуществления мутация усиливает способность варианта спирали 3 ароС-II активировать липолиз с помощью LPL.

Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 3 ароС-II включает одну мутацию спирали 3 ароС-II. Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 3 ароС-II включает две мутации спирали 3 ароС-II. Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 3 ароС-II включает три мутации спирали 3 ароС-II. Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 3 ароС-II включает четыре мутации спирали 3 ароС-II. Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 3 ароС-II включает пять мутаций спирали 3 ароС-II. Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 3 ароС-II включает более пяти мутаций спирали 3 ароС-II.

Согласно некоторым вариантам осуществления мутация представляет собой аминокислотную замену. Согласно некоторым вариантам осуществления мутация представляет собой вставку аминокислоты. Согласно некоторым вариантам осуществления мутация представляет собой делецию аминокислоты.

Согласно некоторым вариантам осуществления оригинальная аминокислота спирали 3 ароС-II заменяется природной аминокислотой. Согласно некоторым вариантам осуществления оригинальная аминокислота спирали 3 ароС-II заменяется неприродной аминокислотой. Согласно некоторым вариантам осуществления оригинальная аминокислота спирали 3 ароС-II заменяется аналогом аминокислоты. Согласно различным вариантам осуществления аминокислотная замена представляет собой консервативную или полуконсервативную замену. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная замена оказывает минимальное влияние на активность и/или структуру полученного в результате пептида. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная замена поддерживает структуру пептидного скелета на участке замены, например, в виде спиральной конформации. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная замена поддерживает заряд или гидрофобность молекулы на целевом сайте. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная замена поддерживает

объем боковой группы аминокислоты.

Согласно различным вариантам осуществления аминокислотная замена представляет собой неконсервативную замену. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная замена обеспечивает существенные изменения свойства пептида. Согласно некоторым вариантам осуществления гидрофильный остаток заменяется гидрофобным остатком. Согласно некоторым другим вариантам осуществления гидрофобный остаток заменяется гидрофильным остатком. Согласно некоторым вариантам осуществления цистеин или пролин заменяется другим остатком. Согласно некоторым другим вариантам осуществления нецистеин или непролин заменяется цистеином или пролином. Согласно некоторым вариантам осуществления остаток, имеющий электроположительную боковую группу, заменяется электроотрицательным остатком. Согласно некоторым другим вариантам осуществления остаток, имеющий электроотрицательную боковую группу, заменяется электроположительным остатком. Согласно некоторым вариантам осуществления остаток, имеющий объемную боковую группу, заменяется остатком, не имеющим боковую группу. Согласно некоторым другим вариантам осуществления остаток, не имеющий боковую группу, заменяется остатком, имеющим объемную боковую группу.

Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная замена осуществляется в положении 70. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления глутамин в положении 70 заменяется аргинином. Согласно некоторым другим из таких вариантов осуществления глутамин в положении 70 заменяется лизином.

1.1.3.3. Химическая модификация варианта спирали 3 аroC-II.

Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 3 аroC-II включает по меньшей мере одну химическую модификацию. Согласно некоторым вариантам осуществления химическую модификацию усиливает способность варианта спирали 3 активировать липолиз с помощью LPL.

Согласно некоторым вариантам осуществления химическая модификация осуществляется на С-конце второго домена. Согласно различным вариантам осуществления карбоксильный конец С-конца может быть модифицирован путем конъюгации с различными функциональными группами. Показали, что нейтрализация концевой заряда синтетического пептида, имитирующего апополипротеины, усиливает его аффинность в отношении липидов (Yancey et al, *Biochem.* 34:7955-7965, 1995; Venkatachalapathi et al., *Protein: Structure, Function and Genetics* 15:349-359, 1993). Например, ацетилирование amino-конца амфипатических пептидов усиливает аффинность пептида в отношении липидов (Mishra et al., *J. Biol. Chem.* 269:7185-7191, 1994). Другие возможные модификации концов описываются, например, в Brouillette et al., *Biochem. Biophys. Acta* 1256: 103-129, 1995; Mishra et al., *J. Biol. Chem.* 269:7185-7191, 1994; и Mishra et al., *J. Biol. Chem.* 270:1602-1611, 1995.

Согласно некоторым вариантам осуществления химическая модификация осуществляется в боковой группе аминокислоты во втором домене. Модификации в боковых группах аминокислот включают без ограничения ацилирование ϵ -аминогрупп лизина, N-алкилирование аргинина, гистидина или лизина, алкилирование карбоксильных групп глутаминовой или аспарагиновой кислот, образование лактама путем циклизации ϵ -аминогрупп лизина с карбоксильными группами боковых групп глутаминовой или аспарагиновой кислоты, углеводородное "сшивание" (например, для стабилизации конформаций альфа-спирали) и деамидирование глутамина или аспарагина. Согласно некоторым вариантам осуществления второй домен модифицируется путем замещения одной или нескольких боковых групп другими боковыми группами, такими как алкил, низший алкил, циклический 4-, 5-, 6-, 7-членный алкил, амид, амид-низший алкил, амид-ди(низший алкил), низший алкокси, гидроксильный, карбоксильный и их низшие сложноэфирные производные, а также 4-, 5-, 6-, 7-членными гетероциклами. Например, могут быть получены пролиновые аналоги, в которых размер кольца пролинового остатка изменяется от 5-членного кольца до 4-, 6- или 7-членного кольца. Циклические группы могут быть насыщенными или ненасыщенными, и если ненасыщенные, то могут быть ароматическими или неароматическими. Гетероциклические группы могут включать один или несколько гетероатомов азота, кислорода и/или серы. Примеры таких групп включают фуразанильную, фурильную, имидазолидинильную, имидазолильную, имидазолинильную, изотиазолильную, изоксазолильную, морфолинильную (например, морфолино), оксазолильную, пиперазинильную (например, 1-пиперазинильную), пиперидильную (например, 1-пиперидильную, пиперидино), пиранильную, пиразинильную, пиразолидинильную, пиразолинильную, пиразолильную, пиридазинильную, пиридинильную, пиримидинильную, пирролидинильную (например, 1-пирролидинильную), пирролинильную, пирролильную, тиадиазолильную, тиазолильную, тиенильную, тиоморфолинильную (например, тиоморфолино) и тиазолильную группы. Эти гетероциклические группы могут быть замещенными или незамещенными. Если группа заменяется, то заместителем может быть алкил, алкокси, галоген, кислород или замещенный или незамещенный фенил. Пептиды, а также пептидные аналоги и миметики, также могут быть ковалентно связаны с одним или несколькими из ряда небелковых полимеров, например, полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль или полиоксикалкены, как описывается в патентах США №№ 4640835, 4496689, 4301144, 4670417, 4791192 и 4179337.

Согласно некоторым вариантам осуществления химическая модификация представляет собой нековалентную модификацию. Согласно некоторым другим вариантам осуществления химическая модифи-

кация ковалентно связана. Согласно различным вариантам осуществления химическая модификация может представлять собой фосфорилирование, гликозилирование или липидирование.

Согласно некоторым вариантам осуществления химическая модификация представляет собой ковалентную связь жирной кислоты. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота является насыщенной. Согласно некоторым другим вариантам осуществления жирная кислота является ненасыщенной.

Согласно различным вариантам осуществления жирная кислота включает 2-30 атомов углерода, например, 4-26 атомов углерода, 6-24 атома углерода, 10-20 атомов углерода, 12-18 атомов углерода и 14-16 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 6 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 7 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 8 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 9 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 10 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 11 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 12 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 13 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 14 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 15 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 16 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 17 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 18 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 19 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 20 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 21 атом углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 22 атома углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 23 атома углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 24 атома углерода.

Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота имеет 1, 2, 3, 4, 5 или 6 двойных связей. Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота представляет собой арахидоновую кислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота представляет собой линолевую кислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота представляет собой олеиновую кислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота представляет собой пальмитолеиновую кислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота представляет собой линоленовую кислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота представляет собой эйкозапентаеновую кислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота представляет собой докозогексаеновую кислоту.

Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота представляет собой пальмитиновую кислоту. Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота представляет собой стеариновую кислоту.

Согласно некоторым вариантам осуществления С-концевая аминокислота модифицируется С-концевым амидом. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления С-концевая аминокислота представляет собой глутаминовую кислоту.

1.1.4. Однодоменный миметический пептид ароС-II.

Согласно некоторым вариантам осуществления миметический пептид ароС-II состоит из одного спирального домена. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления спиральный домен является амфипатическим. Согласно некоторым другим из таких вариантов осуществления спиральный домен представляет собой глобулярную спираль. Согласно некоторым вариантам осуществления миметический пептид ароС-II представляет собой нативную спираль 3 белка ароС-II. Спираль 3 белка ароС-II включает аминокислотные остатки 65-74/75 (SEQ ID NO: 5), пронумерованные согласно их положению в зрелом белке ароС-II из 79 аминокислот. Согласно некоторым другим вариантам осуществления миметический пептид ароС-II представляет собой вариант спирали 3 ароС-II.

Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 3 ароС-II составляет не более чем 40 аминокислот, например, не более чем 30 аминокислот или не более чем 20 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 3 ароС-II включает модификации нативной спирали 3 ароС-II. Согласно различным вариантам осуществления модификации включают удлинения, усеечения, мутации и химические модификации.

1.1.4.1. Удлинение спирали 3 ароС-II.

Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 3 ароС-II включает удлинение спирали 3 ароС-II. Согласно некоторым вариантам осуществления удлинение усиливает аффинность варианта спирали 3 в отношении связывания с липопротеинами. Согласно некоторым вариантам осуществления удлинение усиливает способность варианта спирали 3 ароС-II активировать липолиз с помощью LPL. Согласно некоторым вариантам осуществления спираль 3 ароС-II удлиняется на N-конце. Согласно

вариантам осуществления аминокислотная замена поддерживает заряд или гидрофобность молекулы на целевом сайте. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная замена поддерживает объем боковой группы аминокислоты.

Согласно различным вариантам осуществления аминокислотная замена представляет собой неконсервативную замену. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная замена обеспечивает существенные изменения свойства пептида. Согласно некоторым вариантам осуществления гидрофильный остаток заменяется гидрофобным остатком. Согласно некоторым другим вариантам осуществления гидрофобный остаток заменяется гидрофильным остатком. Согласно некоторым вариантам осуществления цистеин или пролин заменяется другим остатком. Согласно некоторым другим вариантам осуществления нецистеин или непролин заменяется цистеином или пролином. Согласно некоторым вариантам осуществления остаток, имеющий электроположительную боковую группу, заменяется электроотрицательным остатком. Согласно некоторым другим вариантам осуществления остаток, имеющий электроотрицательную боковую группу, заменяется электроположительным остатком. Согласно некоторым вариантам осуществления остаток, имеющий объемную боковую группу, заменяется остатком, не имеющим боковую группу. Согласно некоторым другим вариантам осуществления остаток, не имеющий боковую группу, заменяется остатком, имеющим объемную боковую группу.

1.1.4.3. Химическая модификация варианта спирали 3 аroC-II.

Согласно некоторым вариантам осуществления вариант спирали 3 аroC-II включает по меньшей мере одну химическую модификацию. Согласно некоторым вариантам осуществления химическая модификация усиливает аффинность варианта спирали 3 в отношении связывания с липопротеинами. Согласно некоторым вариантам осуществления химическая модификация усиливает способность варианта спирали 3 активировать липолиз с помощью LPL.

Согласно некоторым вариантам осуществления химическая модификация осуществляется на N-конце варианта спирали 3 аroC-II. Согласно некоторым вариантам осуществления химическая модификация осуществляется на C-конце варианта спирали 3 аroC-II. Согласно различным вариантам осуществления аминоконцев N-конца и/или карбоксильный конец C-конца могут быть модифицированы путем конъюгации с различными функциональными группами. Показали, что нейтрализация концевых зарядов синтетического пептида, имитирующего аполипипотеины, усиливает его аффинность в отношении липидов (Yancey et al, *Biochem. 34:7955-7965*, 1995; Venkatachalapathi et al., *Protein: Structure, Function and Genetics 15:349-359*, 1993). Например, ацетилирование аминоконца амфипатических пептидов усиливает аффинность пептида в отношении липидов (Mishra et al., *J. Biol. Chem. 269:7185-7191*, 1994). Другие возможные модификации концов описываются, например, в Brouillette et al., *Biochem. Biophys. Acta 1256:103-129*, 1995; Mishra et al., *J. Biol. Chem. 269:7185-7191*, 1994; и Mishra et al., *J. Biol. Chem. 270:1602-1611*, 1995.

Согласно некоторым вариантам осуществления химическая модификация осуществляется в боковой группе аминокислоты варианта спирали 3 аroC-II. Модификации в боковых группах аминокислот включают без ограничения ацилирование ϵ -аминогрупп лизина, N-алкилирование аргинина, гистидина или лизина, алкилирование карбоксильных групп глутаминовой или аспарагиновой кислот, образование лактама путем циклизации ϵ -аминогрупп лизина с карбоксильными группами боковых групп глутаминовой или аспарагиновой кислоты, углеводородное "сшивание" (например, для стабилизации конформаций альфа-спирали) и деамидирование глутамин или аспарагин. Согласно некоторым вариантам осуществления первый домен модифицируется путем замещения одной или нескольких боковых групп другими боковыми группами, такими как алкил, низший алкил, циклический 4-, 5-, 6-, 7-членный алкил, амид, амид-низший алкил, амид-ди(низший алкил), низший алкокси, гидроксильный, карбоксильный и их низшие сложноэфирные производные, а также 4-, 5-, 6-, 7-членными гетероциклами. Например, могут быть получены пролиновые аналоги, в которых размер кольца пролинового остатка изменяется от 5-членного кольца до 4-, 6- или 7-членного кольца. Циклические группы могут быть насыщенными или ненасыщенными, и если ненасыщенные, то могут быть ароматическими или неароматическими. Гетероциклические группы могут включать один или несколько гетероатомов азота, кислорода и/или серы. Примеры таких групп включают фуразанильную, фурильную, имидазолидинильную, имидазолильную, имидазолинильную, изотиазолильную, изоксазолильную, морфолинильную (например, морфолино), оксазолильную, пиперазинильную (например, 1-пиперазинильную), пиперидильную (например, 1-пиперидильную, пиперидино), пиранильную, пиранильную, пирозолидинильную, пирозолинильную, пирозолильную, пиридазинильную, пиридинильную, пиримидинильную, пирролидинильную (например, 1-пирролидинильную), пирролинильную, пирролильную, тиадиазолильную, тиазолильную, тиенильную, тиоморфолинильную (например, тиоморфолино) и тиазолильную группы. Эти гетероциклические группы могут быть замещенными или незамещенными. Если группа заменяется, то заместителем может быть алкил, алкокси, галоген, кислород или замещенный или незамещенный фенил. Пептиды, а также пептидные аналоги и миметики, также могут быть ковалентно связаны с одним или несколькими из ряда небелковых полимеров, например, полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль или полиоксикалкены, как описывается в патентах США №№ 4640835, 4496689, 4301144, 4670417, 4791192 и 4179337.

Согласно некоторым вариантам осуществления химическая модификация представляет собой нековалентную модификацию. Согласно некоторым другим вариантам осуществления химическая модификация представляет собой ковалентную связь. Согласно различным вариантам осуществления химическая модификация может представлять собой фосфорилирование, гликозилирование или липидирование. Согласно некоторым вариантам осуществления химическая модификация представляет собой ковалентную связь жирной кислоты. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота является насыщенной. Согласно некоторым другим вариантам осуществления жирная кислота является ненасыщенной.

Согласно различным вариантам осуществления жирная кислота включает 2-30 атомов углерода, например, 4-26 атомов углерода, 6-24 атома углерода, 10-20 атомов углерода, 12-18 атомов углерода и 14-16 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 6 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 7 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 8 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 9 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 10 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 11 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 12 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 13 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 14 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 15 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 16 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 17 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 18 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 19 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 20 атомов углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 21 атом углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 22 атома углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 23 атома углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления жирная кислота включает 24 атома углерода.

Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота имеет 1, 2, 3, 4, 5 или 6 двойных связей. Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота представляет собой арахидоновую кислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота представляет собой линолевую кислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота представляет собой олеиновую кислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота представляет собой пальмитолеиновую кислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота представляет собой линоленовую кислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота представляет собой эйкозапентаеновую кислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления ненасыщенная жирная кислота представляет собой докозогексаеновую кислоту.

Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота представляет собой пальмитиновую кислоту. Согласно конкретным вариантам осуществления жирная кислота представляет собой стеариновую кислоту.

Согласно некоторым вариантам осуществления выделенный миметический пептид ароС-II включает стеариновую кислоту, ковалентно связанную с N-концевой аминокислотой. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления N-концевая аминокислота представляет собой аланин.

Согласно некоторым вариантам осуществления выделенный миметический пептид ароС-II включает стеариновую кислоту, ковалентно связанную с боковой группой лизинового остатка. Согласно конкретным вариантам осуществления, если выделенный миметический пептид ароС-II включает лизин в положении 60, то стеариновая кислота ковалентно связана с лизиновым остатком. Согласно конкретным вариантам осуществления, если выделенный миметический пептид ароС-II включает лизин в положении 76, то стеариновая кислота ковалентно связана с лизиновым остатком.

1.1.5. Получение миметического пептида ароС-II.

Также в настоящем документе раскрываются способы получения выделенного миметического пептида ароС-II.

1.1.5.1. Рекомбинантный синтез.

Согласно некоторым вариантам осуществления выделенный миметический пептид ароС-II получают рекомбинантным путем, например, с использованием бактериальных, дрожжевых или эукариотических систем экспрессии. Для рекомбинантного получения полинуклеотидную последовательность, кодирующую одно- или многодоменный пептид, вставляют в соответствующий носитель экспрессии, то есть вектор, который содержит необходимые элементы для транскрипции и трансляции вставленной кодирующей последовательности или, в случае вектора РНК-вируса, необходимые элементы для репликации и трансляции. Носитель экспрессии затем трансфицируют в подходящую целевую клетку, которая будет экспрессировать одно- или многодоменный пептид. В зависимости от используемой системы экспрессии

экспрессируемый пептид затем выделяют с помощью процедур, хорошо известных в уровне техники. Способы получения рекомбинантных белка и пептид хорошо известны в уровне техники.

Для повышения эффективности получения полинуклеотид может быть разработан с кодированием нескольких звеньев одно- или многодоменного пептида, разделенных сайтами ферментативного расщепления. Полученный в результате полипептид может быть расщеплен (например, с помощью обработки соответствующим ферментом) для восстановления пептидных звеньев. Это может увеличить выход пептидов, управляемых одним промотором. Согласно некоторым вариантам осуществления может быть разработан полицистронный полинуклеотид так, что транскрибируется одна иРНК, которая кодирует несколько пептидов, при этом каждая кодирующая область функционально связана с кэп-независимой последовательностью трансляции, например, сайтом внутренней посадки рибосомы (IRES). При использовании в соответствующих вирусных системах экспрессии трансляция каждого пептида, кодируемого иРНК, управляется внутренними регуляторными последовательностями транскрипта, например, IRES. Таким образом, полицистронная конструкция управляет транскрипцией одной большой полицистронной иРНК, которая, в свою очередь, управляет трансляцией множества отдельных пептидов. Этот подход исключает получение и ферментативный процессинг полипептидов и может значительно увеличить выход пептида, управляемого одним промотором.

Ряд систем хозяин-вектор экспрессии может быть использован для экспрессии пептидов, описываемых в настоящем документе. Они включают без ограничения микроорганизмы, такие как бактерии, трансформированные векторами экспрессии рекомбинантной бактериофаговой ДНК или плазмидной ДНК, содержащими соответствующую кодирующую последовательность; дрожжи или мицелиальные грибы, трансформированные рекомбинантными дрожжевыми или грибковыми векторами экспрессии, содержащими соответствующую кодирующую последовательность; системы клеток насекомых, инфицированных рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, бакуловирус), содержащими соответствующую кодирующую последовательность; системы растительных клеток, инфицированных рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, вируса мозаики цветной капусты (CaMV) или вируса мозаики табака (TMV)), или трансформированные рекомбинантными плазмидными векторами экспрессии (например, плазида Ti), содержащими соответствующую кодирующую последовательность; или системы животных клеток. Элементы экспрессии систем экспрессии варьируют по их силе и специфичностям. В зависимости от используемой системы хозяин/вектор любое число подходящих элементов транскрипции и трансляции, в том числе конститутивные и индуцибельные промоторы, могут быть использованы в векторе экспрессии. Например, при клонировании в бактериальных системах могут быть использованы индуцибельные промоторы, такие как pL бактериофага λ , plac, ptrp, ptac (гибридный промотор ptrp-lac) и подобные. При клонировании в системы клеток насекомых могут быть использованы такие промоторы как бакуловирусный полиэдронный промотор. При клонировании в системы клеток растений могут быть использованы промоторы, полученные из генома растительных клеток (например, промоторы белков теплового шока; промотор малой субъединицы RUBISCO; промотор a/b-связывающего белка хлорофилла) или из вирусов растений (например, промотор 35S-РНК вируса CaMV; промотор белка оболочки TMV).

При клонировании в системы клеток млекопитающих могут быть использованы промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотионеина) или из вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса; промотор вируса коровьей оспы в 7,5 т.н.).

1.1.5.2. Химический синтез.

Согласно некоторым другим вариантам осуществления выделенный миметический пептид ароС-II получают с помощью химического синтеза. Согласно некоторым вариантам осуществления пептид получают с использованием методик синтеза пептида в жидкой фазе. Согласно некоторым вариантам осуществления пептид получают с использованием методик синтеза пептида в твердой фазе. Пептиды, имеющие либо D-, либо L-конфигурацию, могут быть синтезированы с помощью автоматизированных процедур в твердой фазе, хорошо известных в уровне техники. Подходящие синтезы могут быть выполнены с использованием процедур "Boc" или "Fmoc". Методики и процедуры для твердофазного синтеза хорошо известны в уровне техники. Одно- и многодоменные пептиды также могут быть получены путем сегментной конденсации, как описано, например, в Liu et al., *Tetrahedron Lett.* 37:933-936, 1996; Baca et al., *J. Am. Chem. Soc.* 117: 1881-1887, 1995; Tam et al., *Int. J. Peptide Protein Res.* 45:209-216, 1995; Schnolzer and Kent, *Science* 256:221-225, 1992; Liu and Tam, *J. Am. Chem. Soc.* 116:4149-4153, 1994; Liu and Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:6584-6588, 1994; и Yamashiro and Li, *Int. J. Peptide Protein Res.* 31:322-334, 1988). Это целесообразно, в частности, в случае пептидов, содержащих глицин. Другие способы, применимые для синтеза одно- и многодоменных пептидов в соответствии с настоящим раскрытием, описываются в Nakagawa et al., *J. Am. Chem. Soc.* 107:7087-7092, 1985. Дополнительные типичные методики, известные рядовым специалистам в области синтеза пептидов и пептидных аналогов, изложены в Bodanszky, M. and Bodanszky, A., *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, New York, 1994; и by Jones, J., *Amino Acid and Peptide Synthesis*, 2nd ed., Oxford University Press, 2002. В ссылках Bodanszky и Jones подробно описаны параметры и методики для активации и соединения аминокислот и производных аминокислот. Более того, в ссылках изложено, как отбирать, использовать и удалять различные применимые функцио-

нальные и защитные группы. Пептиды, имеющие либо D-, либо L-конфигурацию, также могут быть приобретены у коммерческих поставщиков синтетических пептидов. Такие поставщики включают в себя, например, Advanced ChemTech (Louisville, KY), Applied Biosystems (Foster City, CA), Bachem (Torrance, CA), Anaspec (San Jose, CA) и Cell Essentials (Boston, MA).

1.1.6. Очистка миметического пептида ароС-II.

Пептиды или пептидные аналоги в соответствии с настоящим раскрытием могут быть очищены с использованием многочисленных хорошо известных в уровне техники методик, таких как хроматография с обращенной фазой, высокоэффективная жидкостная хроматография, ионообменная хроматография, эксклюзионная хроматография размеров, аффинная хроматография, гель-электрофорез и т.п. Конкретные условия, используемые для очистки конкретного одно- или многодоменного пептида или пептидного аналога, будут отчасти зависеть от стратегии синтеза и таких факторов как суммарный заряд, гидрофобность, гидрофильность и т.п., а также будут очевидны для специалистов в данной области.

Согласно различным вариантам осуществления выделенный миметический пептид ароС-II дополнительно включает метку очистки. Согласно некоторым вариантам осуществления метка очистки представляет собой полигистидиновую метку, тус-метку или НА-метку.

1.2. Фармацевтическая композиция.

Также в настоящем документе представлены фармацевтические композиции, содержащие один или несколько выделенных миметических пептидов ароС-II, описываемых в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Любой носитель, который может доставлять активный пептид (например, без разрушения или повреждения пептида в носителе), является подходящим носителем, и такие носители хорошо известны в уровне техники. Миметический пептид ароС-II может быть составлен, например, с использованием любого состава, используемого в настоящее время для составления других терапевтических пептидов, таких как инсулины, агонисты GLP-1 и все одобренные пептиды, раскрываемые в базе данных ThPdb одобренных FDA терапевтических пептидов и белков (crdd.osdd.net/raghava/thpdb/).

Фармацевтическая композиция на основе миметического пептида ароС-II может иметь форму твердой, полутвердой или жидкой дозированной формы, такой как порошок, раствор, эликсир, сироп, суспензия, крем, капли, паста и аэрозоль. Как известно специалистам в данной области, форму композиции определяют в зависимости от выбора пути введения.

Согласно некоторым вариантам осуществления композиции составляют для введения любым подходящим путем, в том числе без ограничения перорально (например так, как в форме таблеток, капсул, гранул или порошков), подязычно, буккально, парентерально (например, подкожной, внутривенной, внутримышечной, внутрикожной или внутригрудной инъекцией или инфузией (например, в виде стерильных инъекционных водных или неводных растворов или суспензий и т.д.)), назально (в том числе введение в назальные мембраны, такое как с помощью ингаляционного аэрозоля), местно (например, в форме крема или мази), чрескожно (например, с помощью чрескожного пластыря), ректально (например, в форме суппозитория) или с помощью хирургической трансплантации в конкретный участок и т.д.

Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтические композиции составляют подходящими для подкожной инъекции.

1.3. Способы лечения.

Также в настоящем документе представлены способы лечения дислипидемических и сосудистых нарушений, в том числе без ограничения гиперлипидемии, гиперлипопротеинемии, гиперхолестеринемии, гипертриглицеридемии, дефицита HDL, заболевания артерий сердца, атеросклероза, тромботического инсульта, заболевания периферических сосудов, рестеноза, острого коронарного синдрома и реперфузионного повреждения миокарда.

Согласно некоторым вариантам осуществления способы предусматривают введение пептида или фармацевтической композиции, описываемых в настоящем документе, больному гипертриглицеридемией.

Согласно некоторым вариантам осуществления больной подвержен риску развития гипертриглицеридемии.

Согласно различным вариантам осуществления больной имеет гипертриглицеридемию, определяемую на основании концентрации TG в плазме или сыворотке крови натошак выше определенного уровня. Согласно некоторым вариантам осуществления больной имеет легкую гипертриглицеридемию, определяемую как концентрация триглицерида (TG) в сыворотке крови до лечения от 150 до 199 мг/дл. Согласно некоторым вариантам осуществления больной имеет умеренную гипертриглицеридемию, определяемую как концентрация триглицерида (TG) в сыворотке крови до лечения от 200 до 999 мг/дл, например, от 200 до 499 мг/дл и от 500 до 999 мг/дл. Согласно некоторым вариантам осуществления больной имеет тяжелую гипертриглицеридемию, определяемую как концентрация триглицерида (TG) в сыворотке крови до лечения от 1000 до 1999 мг/дл. Согласно некоторым вариантам осуществления больной имеет очень тяжелую гипертриглицеридемию, определяемую как концентрация триглицерида (TG) в сыворотке крови до лечения, равная или превышающая 2000 мг/дл.

Согласно некоторым вариантам осуществления больной имеет превышающее нормальное содержа-

ние LDL-с. Согласно некоторым другим вариантам осуществления больной имеет содержание HDL-с ниже нормального.

Согласно некоторым вариантам осуществления гипертриглицеридемия вызвана дефицитом LPL. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления гипертриглицеридемия у больного является наследственным дефицитом липопротеинлипазы.

Согласно некоторым вариантам осуществления дефицит LPL вызван мутацией гена. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления мутацию гена выявляют с помощью анализа последовательности ДНК. Согласно различным вариантам осуществления дефицит LPL вызван мутацией в гене LPL, APOC2, APOA5, GPIIIBP1 или LMF1.

Согласно некоторым вариантам осуществления дефицит LPL вызван мутацией в гене LPL. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления мутация ведет к пониженной ферментативной активности LPL. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления мутация ведет к отсутствию ферментативной активности LPL.

Согласно некоторым вариантам осуществления гипертриглицеридемия у больного является моногенной. Согласно некоторым другим вариантам осуществления гипертриглицеридемия у больного является полигенной. Согласно некоторым вариантам осуществления мутации присутствуют в гомозиготном состоянии. Согласно некоторым вариантам осуществления мутации присутствуют в гетерозиготном состоянии.

Согласно некоторым вариантам осуществления дефицит LPL диагностируют по отсутствию активности LPL в сыворотке крови больного.

Согласно некоторым вариантам осуществления гипертриглицеридемия вызвана дефицитом apoC-II. Согласно некоторым вариантам осуществления гипертриглицеридемия вызвана повышенным содержанием apoC-III.

Согласно некоторым вариантам осуществления больной имеет сахарный диабет. Согласно некоторым вариантам осуществления больной имеет метаболический синдром. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления метаболический синдром представляет собой ожирение. Согласно некоторым вариантам осуществления больной имеет панкреатит. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления больной имеет острый панкреатит. Согласно некоторым вариантам осуществления больной имеет стеатоз или стеатогепатит. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления стеатоз или стеатогепатит связаны с приемом спирта. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления стеатоз или стеатогепатит не связаны с приемом спирта. Согласно некоторым вариантам осуществления больной имеет сердечно-сосудистое заболевание. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления больной имеет острое сердечно-сосудистое заболевание. Согласно некоторым вариантам осуществления больной имеет атеросклероз. Согласно некоторым вариантам осуществления больной принимал медикамент, который может приводить к гипертриглицеридемии.

Согласно некоторым вариантам осуществления больной является взрослым. Согласно некоторым другим вариантам осуществления больной является ребенком. Согласно различным вариантам осуществления пептид или фармацевтическую композицию вводят в количестве, по схеме и с продолжительностью, которые достаточны для снижения содержания триглицерида в крови больного. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид вводят в количестве, по схеме и с продолжительностью, которые достаточны для снижения содержания триглицеридов по меньшей мере на 5, 10, 15, 20, 25% или больше по сравнению с содержанием до начала лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид вводят в количестве, по схеме и с продолжительностью, которые достаточны для снижения содержания триглицеридов по меньшей мере на 30, 35, 40, 45, 50% или больше. Согласно конкретным вариантам осуществления полипептид вводят в количестве, по схеме и с продолжительностью, которые достаточны для снижения содержания триглицеридов по меньшей мере на 55, 60, 65, 70% или больше. Лечение может предусматривать одну дозу или несколько доз на протяжении периода времени.

Примеры

Ниже представлены примеры определенных вариантов осуществления для воплощения настоящего изобретения. Примеры предлагаются исключительно в иллюстративных целях и никоим образом не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения. Были предприняты усилия для обеспечения точности по отношению к используемым числам (например, количествам, температурам и т.д.), но, конечно, должны быть допущены некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. При осуществлении настоящего изобретения будут использоваться, если не указано иное, общепринятые способы химии белка, биохимии, методики рекомбинантной ДНК и фармакологии, в пределах компетентности в данной области. Такие методики подробно описаны в литературе.

Способы.

Анализ LPL.

Приготовление LPL. Использовали замороженную исходную смесь 10 мкл 0,5 мг/мл бычьего LPL и разбавляли 1:100 (10 мкл + 990 мкл PBS).

Приготовление 20% интралипида. 2000 мг/дл TG интралипида использовали для получения 3 мг/дл TG интралипида путем разбавления 1,5 мкл исходной смеси с помощью 998,5 мкл PBS или сначала пу-

тем разбавления исходной смеси 1:10, а затем смешивания 15 мкл разбавленной исходной смеси с 985 мкл PBS. При использовании сыворотки крови человека с дефицитом apoC-II в качестве субстрата замороженную 10-мкл аликвоту 1711 мг/дл (TG) разбавляли путем добавления 990 мкл PBS (разбавление 1:100).

Подготовка анализа свободной жирной кислоты (NEFA). Реагенты NEFA приобретали у компании Wako Diagnostics, Wako Life Sciences, Inc. Реагент А получали путем смешивания окрашивающего реагента А с растворителем А (225 мкл на лунку). Реагент В получали путем смешивания окрашивающего реагента В с растворителем В (75 мкл на лунку). 5 нмоль стандарта олеиновой кислоты получали путем разбавления 20 мкл исходной смеси 1 мМ олеиновой кислоты (стандартного раствора WAKO NEFA) с помощью 180 мкл 0,2% BSA.

Анализ активности LPL. 10 мкл интралипида, образца плазмы человека или образца плазмы мыши добавляли в каждую лунку с использованием репипет-пипетки. Добавляли по 10 мкл (или 15 мкл в лунках с контролем без LPL) PBS и 10 мкл 1% BSA в каждую лунку с использованием репипет-пипетки. Добавляли 10 мкл пептидов в соответствующие лунки в трех вертикальных повторностях (самая низкая концентрация находится слева, самая высокая находится справа). Планшет открывали при 1000 об/мин в течение 10 с для смешивания и удаления растворов со стенки каждой лунки. Планшет помещали на лед и добавляли 5 мкл LPL с использованием репипет-пипетки. Планшет открывали при 1000 об/мин в течение 10 с.

Планшет накрывали и помещали обратно на лед для инкубации в течение 30 мин. Затем планшет переносили на 37°C и инкубировали в течение 1 ч.

Анализ свободных жирных кислот (NEFA). Добавляли по 45 мкл 5 нмоль стандарта и 0 нмоль контроля (0,2% BSA) в соответствующие лунки. Добавляли 225 мкл реагента А в каждую лунку с использованием карусели реагентов и 12-канальной пипетки. Планшет инкубировали в течение 10 мин перед добавлением 75 мкл реагента В в каждую лунку с использованием карусели реагентов и 12-канальной пипетки.

Планшет не накрывали из-за большого объема. Измеряли поглощение при 550 и 660 нм.

Исследование замещения apoC-III VLDL или хиломикроны, выделенные из плазмы человека, инкубировали с миметическим пептидом apoC-II в течение 1 ч при 37°C и промывали 3 раза с помощью PBS с использованием спинного фильтра с мембраной с пороговым значением 100 кДа. Надосадочные жидкости доводили до оригинального объема с помощью PBS и загружали в 4-12% гель Bis-TRIS SDS PAGE. Идентифицировали полосы apoC-I, apoC-II, apoC-III и apoE по их соответствующему размеру.

Исследование ингибирования apoC-III. Анализ LPL выполняли с использованием интралипида, плазмы человека с высоким содержанием TG (разбавление 1:50) или плазмы трансгенной по apoC-III мыши (разбавление 1:50). При использовании интралипида в качестве субстрата добавляли 25 или 50 мкМ рекомбинантного apoC-III в качестве ингибитора. При использовании плазмы человека с высоким содержанием TG в качестве субстрата добавляли 25 или 50 мкМ рекомбинантного apoC-III в качестве ингибитора с предварительной инкубацией при 37°C в течение 1 ч и без таковой. Добавляли миметический пептид apoC-II при разных концентрациях.

In vivo исследование.

Для *in vivo* исследования использовали мышей C57B1/6 (дикого типа), нокаутных по apoC-II мышей (apoC-II KO) и трансгенных по apoC-III мышей. Мышей C57B1/6 (дикого типа) приобретали у компании Taconic Biosciences Inc. Мышей apoC-II KO получали, как описано в Sakurai et al., *J Pharmacol Exp Ther* 356:341-353, 2016.

Трансгенных по apoC-III мышей создавали путем надэкспрессии человеческого apoC-III у мышей C57B1/6. См. Qu et al., *J. Lipid Res.* 48:1476-1487, 2007.

Мышей не кормили на протяжении ночи (приблизительно 12 ч) перед исследованием и на протяжении 6 чов исследования на следующий день. Миметические пептиды apoC-II получали синтетическим путем и без биологического загрязнения (не доступны как одобренные FDA соединения/лечение). Пептиды получали и использовали в стерильных условиях и фильтровали через фильтр 0,2 мкм перед инъекциями в однократной дозе 1-10 мкмоль/кг массы тела (B.W.), вводимой либо подкожной инъекцией (S.Q. или S.C.), внутривентральной инъекцией (I.P.), либо внутривенной инъекцией (IV.) (в стерильном растворе PBS фармацевтического качества в объеме ≤ 200 мкл), как описано в Sakurai et al., *J. Pharmacol Exp Ther* 356:341-353, 2016.

In vivo исследование интралипида.

В некоторых экспериментах каждое животное получало 20% интралипид (одобренный FDA, Fresenius Kabi, Uppsala, Sweden) в однократной дозе либо путем перорального кормления через желудочный зонд (с использованием специальных стерильных одноразовых нетоксических игл для кормления животных) дозой 10-20 мкл/грамм массы тела (B.W.) (Tuzcu et al. *Drug Chem Toxicol* 37: 261-267, 2014; Kusinski et al. *Nature Medicine* 18: 1539-1549, 2012), либо путем внутривентральной инъекции в однократном болюсе 0,1-1,0 мл (Mahadero et al. *American J Surgery* 164: 45-50, 1992), либо путем внутривенного введения диетического коммерчески доступного жидкого масла (растительное, кукурузное, соевое или оливковое масло пищевого качества) в однократной дозе 10-20 мкл/г массы тела. Эти масла

служили источником TG, при поглощении TG имеет тенденцию разрушаться в течение 3 ч (пиковое значение через 30 мин) (Kritchevsky Nutritional Biochemistry 6:172-178, 1995). Для измерений липидов получали образцы крови (20-30 мкл) из ретро-орбитальной пазухи в моменты времени -1 ч, 0 ч, 1 ч, 3 ч, 6 ч и 24 ч. Мышей возвращали в метаболические клетки в момент времени 6 ч, где опять обеспечивали пищу. После завершения исследования (через 24 ч после введения жира) мышей умерщвляли и собирали органы.

В некоторых случаях мышей возвращали в обычные клетки и содержали еще 2-3 недели для полного восстановления до исследования в другом эксперименте. Включали 1 контрольную группу, которая получала стерильный солевой раствор фармацевтического качества вместо пептида.

Схема исследования представлена на фиг. 55.

In vivo исследование с помощью Triton WR1339.

Оценивали способность миметических пептидов аполипопротеина нормализовать гипертриглицеридемию у мышей, обработанных ингибитором LPL тилоксаполом, в присутствии высокого содержания TG, обеспечиваемого 20% интралипидом.

Мышей не кормили на протяжении ночи (приблизительно 12 ч) перед исследованием и на протяжении 6 ч исследования на следующий день. Миметические пептиды аполипопротеина получали синтетическим путем и без биологического загрязнения (не доступны как одобренные FDA соединения/лечение). Пептиды получали и использовали в стерильных условиях и фильтровали через фильтр 0,2 мкм перед инъекциями в однократной дозе 1-5 мкмоль/кг B.W. или S.C., или I.P., или I.V. (в стерильном растворе PBS фармацевтического качества в объеме ≤ 200 мкл). Затем 10% тилоксапол (Triton WR-1339, T-0307, Sigma-Aldrich) вводили инъекцией I.V. в однократной дозе 5 мкл/грамм B.W., как описано ранее (Zhang Y.L. et al, J Biol Chem. 279: 19362-19374, 2004; Abe C. et al., J. Nutr. 137: 345-350, 2007). Тилоксапол представляет собой неионный детергент, который ингибирует LPL и тем самым выводит триглицериды из сыворотки крови (Rasouli M. et al., J Clin. Diagn. Research. 10: BF01-BF05, 2016). Наконец, каждое животное получало 20% интралипид (одобренный FDA, Fresenius Kabi, Uppsala, Sweden) в однократной дозе либо путем перорального кормления через желудочный зонд (с использованием специальных стерильных одноразовых нетоксических игл для кормления животных) дозой 10-20 мкл/грамм B.W. (Tuzcu K. et al., Drug Chem Toxicol., 37: 261-267, 2014, Kusminski C. et al., Nature Medicine. 18: 1539-1549, 2012), либо путем внутривентральной инъекции в однократном болюсе 0,1-1,0 мл (Mahadero G. et al., American J Surgery. 164: 45-50, 1992). Для измерений липидов получали образцы крови (20-30 мкл) из ретро-орбитальной пазухи в моменты времени -1 ч, 0 ч, 1 ч, 3 ч, 6 ч и 24 ч. Мышей возвращали в метаболические клетки в момент времени 6 ч, где опять обеспечивали пищу. После завершения исследования (через 24 ч после введения интралипида) мышей умерщвляли и собирали органы.

В некоторых случаях мышей возвращали в обычные клетки и содержали еще 2-3 недели для полного восстановления до исследования в другом эксперименте. Включали 2 контрольных группы, обе из которых получали стерильный солевой раствор фармацевтического качества вместо либо пептида, либо Triton WR1339. Схема исследования представлена на фиг. 56.

In vivo исследования на модели обезьяны с ожирением.

Отбирали обезьян с содержанием TG, превышающим 2 ммоль/л, подготавливали и распределяли на 3 группы (контроль, 1 мг/кг Delta6PV и 5 мг/кг Delta6PV). Желаемую дозу вводили инъекцией внутривенно животным в момент времени 0 ч. Обезьян осматривали на протяжении 72 ч и собирали образцы крови в разные моменты времени для анализа биомаркера.

Пример 1. Разработка пептида.

Аполипопротеин С-II (apoC-II) является физиологическим активатором липопротеинлипазы (LPL) и может обеспечивать гидролиз триглицерида в липопротеинах. Отсутствие функционального apoC-II ведет к тяжелой гипертриглицеридемии, подобной той, которая наблюдается при генном дефиците LPL (Breckenridge et al., N Engl J Med. 298: 1265-1273, 1978).

Зрелая форма человеческого apoC-II состоит из 79 аминокислотных остатков. Вторичную структуру apoC-II определили с помощью разных измерений, при этом остатки 17-38 обозначили как спираль 1, остатки 45-57 обозначили как спираль 2, а остатки 65-74/75 обозначили как спираль 3 (Zdunek et al, Biochemistry 42: 1872-1889, 2003). Одна треть с C-конца apoC-II, которая необходима для активации LPL, является более консервативной у различных видов, чем две трети с N-конца apoC-II, которые необходимы для связывания липида (Shen et al., Gene 254:189-198, 2000). Гомология аминокислотных остатков 40-58 зрелого человеческого белка apoC-II у разных видов показана на фиг. 1.

Для получения клинически применимого активирующего LPL пептида авторы настоящего изобретения разработали односпиральный и двухспиральный миметические пептиды apoC-II. Авторы настоящего изобретения ввели различные модификации, такие как удлинения, усечения, мутации и химические модификации в спирали нативного человеческого белка apoC-II.

Некоторые модификации, такие как аминокислотные замены, повышали гидрофобный момент нативной аминокислотной последовательности apoC-II. Например, как показано на фиг. 2A и фиг. 2B, замена T на D в положении 40, замена P на K в положении 43, замена D на F в положении 46 и замена S на F в положении 56 повышали гидрофобный момент аминокислотных остатков 40-57 от 6,04 до 9,62. Как

показано на фиг. 3А и фиг. 3В, замена Т на D в положении 40, замена Р на К в положении 43, замена А на Е в положении 44, замена D на F в положении 46 и замена S на F в положении 56 повышали гидрофобный момент аминокислотных остатков 40-57 от 6,04 до 11,08. На фиг. 4А и фиг. 4В показано, что замена Т на D в положении 40, замена Р на К в положении 43, замена А на Е в положении 44, замена D на F в положении 46, замена S на Е в положении 54 и замена S на F в положении 56 повышали гидрофобный момент аминокислотных остатков 40-57 от 6,04 до 12,48.

Химические модификации также вводили для усиления связи миметических пептидов ароС-II с липидными частицами и для усиления других терапевтических характеристик миметических пептидов ароС-II, таких как повышенная клеточная проницаемость и/или пролонгированный биологический период полувыведения. На фиг. 5 показаны примеры миметических пептидов ароС-II, модифицированных стеариновой кислотой.

Перечень миметических пептидов ароС-II и их последовательности показаны в приведенной ниже табл. 2, при этом "nL" означает норлейцин, а "Aib" означает аминоизобутановую кислоту.

Таблица 2		
Название	Последовательность	SEQ ID NO
Delta6	DYLKEVFEKLRDLYEKFTAAnLSTYTGIFTDQVLSV LKGEЕ	SEQ ID NO: 6
Delta6V	DYLKEVFEKLRDLYEKFTAAnVSTYTGIFTDQVLSV LKGEЕ	SEQ ID NO: 7
Delta6L	DYLKEVFEKLRDLYEKFTAAnLSTYTGIFTDQVLSV LKGEЕ	SEQ ID NO: 8
Delta6PV	DYLKEVFEKLRDLYEKFTPAnVSTYTGIFTDQVLSV LKGEЕ	SEQ ID NO: 9
Delta6PL	DYLKEVFEKLRDLYEKFTPAnLSTYTGIFTDQVLSV LKGEЕ	SEQ ID NO: 10
Delta6MP	DYLKEVFEKLRDLYEKFTPAnMSTYTGIFTDQVLSV LKGEЕ	SEQ ID NO: 11
Delta6MPK-4R	DYLREVFERLRDLYERKTPAnMSTYTGIFTDQVLSV RGEE	SEQ ID NO: 12
Delta6-NH	DYLKEVFEKLRDLYEKFTAAnLSTYTGIFTDQVLSV LKGEЕ _{NH2}	SEQ ID NO: 13
Delta6b-P	DYLKEVFEKLRDLYEKK _{C18} TPAnLSTYTGIFTDQVLS VLKGEЕ	SEQ ID NO: 14
Delta6b-A	DYLKEVFEKLRDLYEKK _{C18} TAAAnLSTYTGIFTDQVLS VLKGEЕ	SEQ ID NO: 15
Delta4	DYLKAVFEKLRDLYSKFTAAnLSTYTGIFTDQVLSV LKGEЕ	SEQ ID NO: 16

Delta4 S15E	DYLKAVFEKLRDLYEKFTAAnLSTYTGIFTDQVLSV LKGE	SEQ ID NO: 17
Delta4 T18F	DYLKAVFEKLRDLYSKFFAAAnLSTYTGIFTDQVLSV LKGE	SEQ ID NO: 18
Delta4 Y24S	DYLKAVFEKLRDLYSKFTAAnLSTSTGIFTDQVLSVL KGE	SEQ ID NO: 19
Delta4 Q31R	DYLKAVFEKLRDLYSKFTAAnLSTYTGIFTDRVLSV LKGE	SEQ ID NO: 20
Delta4 Q31K	DYLKAVFEKLRDLYSKFTAAnLSTYTGIFTDKVLSV LKGE	SEQ ID NO: 21
усеченный Delta4	KRDLYEKKFAAnLSTYTGIFTDQVLSVLKGE	SEQ ID NO: 22
моно-ацил- Delta4	^{C18} DYLKAVFEKLRDLYSKFTAAnLSTYTGIFTDQVLS VLKGE	SEQ ID NO: 23
би-ацил-Delta4	^{C18} DYLKAVFEKK ^{C18} RDLYSKFTAAnLSTYTGIFTDQV LSVLKGE	SEQ ID NO: 24
Delta4b	DYLKAVFEKLRDLYSKFTPAMSTYTGIFTDQVLSVL KGE	SEQ ID NO: 25
Delta4b S15E	DYLKAVFEKLRDLYEKFTPAMSTYTGIFTDQVLSVL KGE	SEQ ID NO: 26
Delta4b S15K	DYLKAVFEKLRDLYKKFTPAMSTYTGIFTDQVLSVL KGE	SEQ ID NO: 27
Delta4b R11K	DYLKAVFEKLRDLYSKFTPAMSTYTGIFTDQVLSVL KGE	SEQ ID NO: 28
Delta4b Y2W	DWLKAVFEKLRDLYSKFTPAMSTYTGIFTDQVLSVL KGE	SEQ ID NO: 29
Delta4b T18F	DYLKAVFEKLRDLYSKFFPAMSTYTGIFTDQVLSVL KGE	SEQ ID NO: 30
Delta4b V6F/F7Y/Y14L/ F17A/T18F	DYLKAFYEKLRDLSKAFPAMSTYTGIFTDQVLSVL KGE	SEQ ID NO: 31
Delta4b-1	DYLKAVK ^{C18} EKLRDLYSKFTPAMSTYTGIFTDQVLS VLKGE	SEQ ID NO: 32
Delta4b-2	DYLKAVFEKK ^{C18} RDLYSKFTPAMSTYTGIFTDQVLS VLKGE	SEQ ID NO: 33
Delta4b-3	DYLKAVFEKLRDLYSKK ^{C18} TPAMSTYTGIFTDQVLS VLKGE	SEQ ID NO: 34
Delta4c	DYLKAVFEKLRDLYSKFTA ^{AAK} _{C16} STYTGIFTDQVLS VLKGE	SEQ ID NO: 35

Delta4c trunc3	KAVFEKLRDLYSKFTAAC _{C16} STYTGIFTDQVLSVLK GEE	SEQ ID NO: 36
Delta4c trunc4	DVFEKLRDLYSKFTAAC _{C16} STYTGIFTDQVLSVLK GEE	SEQ ID NO: 37
Delta4c trunc7	EKLRDLYSKFTAAC _{C16} STYTGIFTDQVLSVLK GEE	SEQ ID NO: 38
Delta4c trunc10	RDLYSKFTAAC _{C16} STYTGIFTDQVLSVLK GEE	SEQ ID NO: 39
Delta4c trunc11	DLYSKFTAAC _{C16} STYTGIFTDQVLSVLK GEE	SEQ ID NO: 40
Delta4c trunc14	DKFTAAC _{C16} STYTGIFTDQVLSVLK GEE	SEQ ID NO: 41
Delta5	DYLKEVFEKLRDLYSKFTAAnLSTYTGIFTDQVLSV LK GEE	SEQ ID NO: 42
Delta5b Y2W	DWLKAVFEKLRDLYEKFFPAMSTYTGIFTDQVLSV LK GEE	SEQ ID NO: 43
Delta5b T18F	DYLKAVFEKLRDLYEKFFPAMSTYTGIFTDQVLSV LK GEE	SEQ ID NO: 44
Delta5b Y2W/T18F	DWLKAVFEKLRDLYEKFFPAMSTYTGIFTDQVLSV LK GEE	SEQ ID NO: 45
Delta5b Y2W M21NL	DWLKAVFEKLRDLYEKFTPAnLSTYTGIFTDQVLSV LK GEE	SEQ ID NO: 46
Delta5b T18F M21NL	DYLKAVFEKLRDLYEKFFPAnLSTYTGIFTDQVLSV LK GEE	SEQ ID NO: 47
Delta5b Y2W/T18F M21NL	DWLKAVFEKLRDLYEKFFPAnLSTYTGIFTDQVLSV LK GEE	SEQ ID NO: 48
C2thirdhelix	AMSTYTGIFTDQVLSVLK GEE	SEQ ID NO: 49
C2thirdhelixStear ylpos1	C ₁₈ AMSTYTGIFTDQVLSVLK GEE	SEQ ID NO: 50
C2thirdhelix Stearylpos2	AK _{C18} STYTGIFTDQVLSVLK GEE	SEQ ID NO: 51
C2thirdhelix Stearylpos17	AMSTYTGIFTDQVLSVLK _{C18} GEE	SEQ ID NO: 52
Delta6T18F-PV	DYLKEVFEKLRDLYEKFFPAVSTYTGIFTDQVLSV LK GEE	SEQ ID NO: 53
Delta6T18F-PV-AIB7,17	DYLKEVAibEKLRLDYEKaibFPAVSTYTGIFTDQVLS V LK GEE	SEQ ID NO: 54
Delta13-31-PV	DKVKEFLSEYWEKAKEFAPAVSTYTGIFTDQVLSV LK GEE	SEQ ID NO: 55

Пример 2. Типичные миметические пептиды apoC-II с аминокислотными заменами обеспечивают гидролиз TG *in vitro*.

Для определения возможного влияния миметических пептидов apoC-II на гидролиз TG оценивали эффект пептидов с использованием *in vitro* анализа липолиза. Анализ LPL с сывороткой крови больного с дефицитом apoC-II показал, что типичные миметические пептиды apoC-II Delta4, Delta5 и Delta6, а также варианты Delta4 моно-ацил-Delta4 и би-ацил-Delta4 были способны обеспечивать гидролиз TG в присутствии LPL. При более низких концентрациях большинство тестируемых миметических пептидов, таких как Delta4, Delta5 и Delta6, действовали более эффективно, чем нативный белок apoC-II (фиг. 6).

Анализ LPL с использованием интралипида в качестве субстрата подтвердил, что все тестируемые миметические пептиды были способны обеспечивать гидролиз TG в присутствии LPL. Миметические пептиды apoC-II Delta4 и Delta5 действовали более эффективно, чем нативный белок apoC-II, при концентрациях от приблизительно 1 нМ до приблизительно 10 мкМ (фиг. 7).

Эти результаты демонстрируют, что типичные миметические пептиды apoC-II Delta4, Delta5 и Delta6 способны обеспечивать гидролиз TG *in vitro*.

Пример 3. Варианты Delta4 и третья спираль apoC-II обеспечивают гидролиз TG *in vitro*.

Шарнирная область между спиралью 2 и спиралью 3 белка apoC-II позволяет двум спиральям сохранять относительно прямую конформацию. Спираль 3 отклоняется от спирали 2 равномерно в разных направлениях на угол не более чем приблизительно 20°. Полагают, что такая конформация помогает спирали 3, которая содержит активирующий LPL домен, присоединяться к поверхности мицеллы липопротеина. Включение пролина в положении 58 шарнирного домена сохраняет и усиливает конформацию. Варианты Delta4, такие как Delta4b, Delta4b-1 и Delta4b S54E, содержат пролин в положении 58. Миметический пептид apoC-II C2thirdhelix включает аминокислотные остатки 59-79 белка apoC-II. C2thirdhelixStearylpos1, C2thirdhelixStearylpos2 и C2thirdhelixStearylpos17 включают модификацию стеариновой кислотой в C2thirdhelix на различных аминокислотных остатках.

Как показано на фиг. 8, большинство из вышеупомянутых миметических пептидов apoC-II обладали способностью обеспечивать гидролиз TG в присутствии LPL при использовании сыворотки крови больного с дефицитом apoC-II в качестве субстрата.

Более подробный анализ результатов C2thirdhelix, C2thirdhelixStearylpos1, C2thirdhelixStearylpos2 и C2thirdhelixStearylpos17 показал, что липидирование усиливает способность C2thirdhelix обеспечивать

гидролиз TG (фиг. 9). Сравнение миметических пептидов apoC-II Delta4, Delta4b и Delta4b-3 показало, что включение пролина в положении 58 и модификации стеариновой кислотой в лизиновом остатке в положении 56 усиливает способность типичного миметического пептида apoC-II Delta4 выводить TG (фиг. 10). На фиг. 11 подтверждается, что липидирование миметического пептида apoC-II Delta4b усиливает его способность усиливать липолиз, особенно при более низких концентрациях.

Авторы настоящего изобретения далее тестировали миметические пептиды apoC-II в широком диапазоне концентраций от 100 пМ до 10 мкМ. Миметические пептиды apoC-II Delta4b-1, Delta4b-2, Delta4b-3, Delta4b, Delta4b T57F и Delta4b обеспечивали гидролиз TG зависимым от дозы образом. Все миметические пептиды apoC-II, тестируемые в данном эксперименте, действовали более эффективно, чем полноразмерный белок apoC-II (фиг. 12).

Пептид Delta4c содержал модифицированный пальмитиновой кислотой лизин (K) в положении 60, и его производные включали усечения на С-конце на 3, 4, 7, 10, 11 или 14 аминокислот. В анализе LPL с сывороткой крови больного с дефицитом apoC-II в качестве субстрата и в диапазоне концентраций пептида от 10 пМ до 100 мкМ Delta4c и его усеченные варианты обеспечивали гидролиз TG (фиг. 13).

Совместно данные результаты показывают, что варианты типичного миметического пептида apoC-II Delta4 и варианты третьей спирали apoC-II могут обеспечивать гидролиз TG *in vitro*.

Пример 4. Варианты Delta5 обеспечивают гидролиз TG *in vitro*.

Осуществляли дополнительные аминокислотные замены в миметическом пептиде apoC-II Delta5b, который включает пролин в положении 58 и метионин в положении 60.

Анализ LPL выполняли с использованием сыворотки крови больного с дефицитом apoC-II в качестве субстрата. Пептиды тестировали в диапазоне концентраций от 100 пМ до 10 нМ. Как показано на фиг. 14, все варианты Delta5 с указанными аминокислотными заменами и Delta6 обладали способностью обеспечивать гидролиз TG зависимым от дозы образом.

Данные результаты показывают, что варианты типичного миметического пептида apoC-II Delta5 способны обеспечивать гидролиз TG *in vitro*.

Пример 5. Варианты Delta6 обеспечивают гидролиз TG *in vitro*.

Типичный миметический пептид apoC-II Delta6 дополнительно модифицировали, чтобы он лучше подходил для рекомбинантной экспрессии. Delta6L включает лейциновый (L) остаток в положении 60. Delta6PV включает пролин (P) в положении 58 и валин (V) в положении 60. Delta6PL включает пролин (P) в положении 58 и лейцин (L) в положении 60. Delta6T18F-PV дополнительно включает фенилаланин (F) в положении 57 по сравнению с Delta6PV. Delta6T18F-PV-AIB7,17 дополнительно включает аминокислоту (Aib) в положениях 46 и 56, а также фенилаланин (F) в положении 57 по сравнению с Delta6PV.

Как показано на фиг. 15A-D, пептид Delta6 и его варианты Delta6L, Delta6PV и Delta6PL активировали LPL *in vitro* при использовании сыворотки крови больного гипертриглицеридемией в качестве субстрата. Концентрации триглицеридов в сыворотке крови больного варьировали от приблизительно 1000 мг/дл до приблизительно 1700 мг/дл.

Авторы настоящего изобретения далее тестировали активность пептида Delta6 и его варианта Delta6PV в широком диапазоне концентраций от 100 пМ до 10 мкМ. Сыворотку крови больного с дефицитом apoC-II использовали в качестве субстрата. Как показано на фиг. 51, Delta6 и Delta6PV активировали LPL *in vitro* более эффективно, чем полноразмерный белок apoC-II.

Кроме того, варианты Delta6 Delta6PV, Delta6T18F-PV и Delta6T18F-PV-AIB7,17 активировали LPL *in vitro* с образцами сыворотки крови от больных с дефицитом apoC-II (фиг. 52).

Авторы настоящего изобретения создавали миметический пептид apoC-II Delta13-31-PV, который включает вариант спирали 1 apoC-II. Delta13-31-PV имеет последовательность DKVKEFLSEYWEKAKEFAPAVSTYTGIFTDQVLSVLKGEE (SEQ ID NO: 55), при этом подчеркнуты аминокислотные замены в спирали 1 apoC-II. Пептид Delta13-31-PV обеспечивал TG гидролиз *in vitro* зависимым от дозы образом (фиг. 52). Данные результаты показывают, что варианты типичного миметического пептида apoC-II Delta6 и миметический пептид apoC-II, содержащий вариант спирали 1 apoC-II способны обеспечивать гидролиз TG *in vitro*.

Пример 6. Delta4 и его варианты усиливают *in vivo* липолиз ApoC-II является кофактором для липопротеинлипазы, фермента, который гидролизует триглицериды. Дефицит apoC-II приводит к гипертриглицеридемии у субъектов-людей. Как описывается в Sakurai et al., J Pharmacol Exp Ther 356:341-353, 2016, авторы настоящего изобретения создавали нокаутных по apoC-II мышей, которые имели высокое содержание TG в плазме.

Миметический пептид apoC-II Delta4 вводили инъекцией подкожно нокаутным по apoC-II мышам и контролировали содержание липидов с течением времени (фиг. 16). Инъекция Delta4 приводила к быстрому и заметному снижению содержания TG в плазме. Подкожная инъекция Delta4 также приводила к снижению содержания суммарного холестерина (фиг. 17).

Нокаутным по apoC-II мышам также вводили внутривентрально инъекцией пептид Delta4 (фиг. 18 и 19). Подобным образом, инъекция Delta4 приводила к заметному снижению содержания TG в плазме с максимальным снижением через приблизительно 3 ч. Внутривентральная инъекция также при-

водила к снижению содержания суммарного холестерина.

Также тестировали производные Delta4 Delta4b и Delta4b-3 на предмет их способности обеспечивать гидролиз TG *in vivo* (фиг. 20). После перорального кормления через желудочный зонд растительным маслом содержание TG в сыворотке крови повышалось у мышей C57BL/6 в приблизительно 4,5 раза за 3 ч. Когда мышам вводили внутриперитонеальной инъекцией за 30 мин до кормления через желудочный зонд миметический пептид apoC-II Delta4, Delta4b или Delta4b-3, повышенное содержание TG существенно снижалось.

Данные результаты показывают, что миметический пептид apoC-II Delta4 и его варианты обладают способностью усиливать *in vivo* липолиз.

Пример 7. Delta6 и его варианты усиливали *in vivo* липолиз.

Миметический пептид apoC-II Delta6 вводили внутриперитонеальной инъекцией нокаутным по apoC-II мышам и контролировали липиды в плазме с течением времени (фиг. 21). Инъекция Delta6 приводила к быстрому и заметному снижению содержания TG в плазме. Внутриперитонеальная инъекция Delta6 также приводила к снижению содержания суммарного холестерина (фиг. 22).

Как показано на фиг. 23, три разных дозы пептида Delta6 (0,25, 0,5 и 1 мкмоль/кг массы тела) вводили внутриперитонеальной инъекцией нокаутным по apoC-II мышам и контролировали TG в плазме с течением времени. Все дозы Delta6 приводили к быстрому и заметному снижению содержания TG в плазме.

Также тестировали варианты Delta6 Delta6b-A, Delta6b-P и Delta6-NH на предмет их способности усиливать *in vivo* липолиз при концентрации 0,25 мкмоль/кг массы тела. Все варианты Delta6 приводили к существенному снижению содержания TG в плазме после их внутриперитонеальной инъекции нокаутным по apoC-II мышам (фиг. 24).

Как показано на фиг. 53, варианты Delta6 Delta6PV и Delta6-T18F-PV вводили внутриперитонеальной инъекцией нокаутным по apoC-II мышам при 0,1 мкмоль/кг массы тела и контролировали TG в плазме с течением времени. Как Delta6PV, так и Delta6-T18F-PV приводили к быстрому и снижению содержания TG в плазме у нокаутных по apoC-II мышей с максимальным снижением через приблизительно 6 ч после инъекции пептида.

Данные результаты показывают, что миметический пептид apoC-II Delta6 и его варианты обладают способностью усиливать *in vivo* липолиз.

Пример 8. Замещение apoC-III миметическими пептидами apoC-II ApoC-III обычно ассоциируют с богатыми триглицеридом липопротеинами, и он был идентифицирован как эффективный модулятор содержания TG в плазме. ApoC-III регулирует содержание TG в плазме посредством ряда механизмов, в том числе супрессией активности липопротеинлипазы (LPL) и LPL-независимыми эффектами на выведение TG. Авторы настоящего изобретения изучали эффект миметических пептидов apoC-II в отношении замещения apoC-III.

Инкубация VLDL и хиломикронов, выделенных из плазмы человека, с разными концентрациями миметического пептида apoC-II Delta6 показала, что Delta6 обладает более высокой аффинностью в отношении VLDL и хиломикронов, чем апополипротеины (фиг. 25). Подобным образом, инкубация VLDL, выделенного из плазмы человека, с Delta6 и его производными Delta6-A, Delta6-P и Delta6-NH показала, что Delta6 и производные были способны замещать apoC-III (фиг. 26).

Как показано на фиг. 27, выполняли *in vitro* анализ LPL с сывороткой крови больного гипертриглицеридемией. Миметические пептиды apoC-II Delta4 и Delta6 усиливали активность LPL у больных с высоким содержанием белка apoC-III.

Данные результаты показывают, что миметические пептиды apoC-II Delta4, Delta6 и их варианты способны замещать apoC-III и усиливать *in vitro* липолиз в сыворотке крови больного с высоким содержанием белка apoC-III.

Пример 9. Замещение apoC-III пептидом apoC-II-a.

Авторы настоящего изобретения изучали эффект пептида apoC-II-a в отношении замещения apoC-III.

Инкубация VLDL, выделенных из плазмы человека, с экзогенным пептидом apoC-II-a показала, что apoC-II-a обладает более высокой аффинностью в отношении VLDL, чем апополипротеины (фиг. 28). Масс-спектрометрический анализ MALDI-TOF показал, что пептид apoC-II-a селективно заменяет apoC-III и apoC-I, но не apoC-II (фиг. 29A). Интересно то, что связывание пептида apoC-II-a с VLDL почти пропорционально его концентрации (фиг. 29B).

Инкубация хиломикронов, выделенных из плазмы человека, с экзогенным пептидом apoC-II-a показала, что apoC-II-a обладает более высокой аффинностью в отношении хиломикронов, чем апополипротеины (фиг. 30).

Анализ LPL выполняли с использованием интралипида в качестве субстрата. Как показано на фиг. 31, apoC-III ингибировал продуцирование свободной жирной кислоты (NEFA). Добавление пептида apoC-II-a преодолеvalo ингибиторный эффект apoC-III и облегчало липолиз зависимым от дозы образом.

Анализ LPL выполняли с использованием плазмы человека с высоким содержанием TG в качестве субстрата в разбавлении 1:50. Результаты показаны на фиг. 32. При добавлении 50 мкМ рекомбинантно-

го белка ароС-III продуцирование свободной жирной кислоты (NEFA) снижалось от приблизительно 3,2 мкМ до приблизительно 1,7 мкМ. Пептид ароС-II-а добавляли при различных концентрациях. При концентрации 0,01 мкМ он начинал отрицательно влиять на липолиз. При концентрации приблизительно 0,2 мкМ он преодолевал ингибиторный эффект ароС-III. Более высокие концентрации ароС-II-а дополнительно облегчали липолиз. Предварительная инкубация ароС-III с плазмой человека не изменяла эффект пептида ароС-II-а.

Авторы настоящего изобретения также тестировали плазму от трансгенных мышей, надэкспрессирующих человеческий ароС-III. АроС-III в плазме супрессировал липолиз, что согласуется с известной способностью высоких концентраций ароС-III вызывать гипертриглицеридемию. В анализе LPL с использованием плазмы от трансгенных по ароС-III мышей пептид ароС-II-а преодолевал ингибиторный эффект повышенной экспрессии ароС-III во всех трех образцах плазмы трансгенных мышей (фиг. 33).

Пример 10. АроС-II-а смягчает постпрандиальную гипертриглицеридемию у мышей с помощью механизмов, дополнительных к активации липопротеинлипазы.

Постпрандиальная гипертриглицеридемия является важным фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний (CVD). Ранее авторы настоящего изобретения описывали миметический пептид ароС-II (ароС-II-а), который активирует LPL и снижает содержание TG в сыворотке крови мышей ароС-II-КО. Для исследования ароС-II-а в качестве терапевтического средства для постпрандиальной гипертриглицеридемии авторы настоящего изобретения изучали его эффект на нескольких мышинных моделях после тест с жировой нагрузкой.

После перорального кормления через желудочный зонд растительным маслом (10 мкл/грамм) содержание TG в сыворотке крови повышалось за 3 ч у мышей C57BL/6 по меньшей мере в 5 раз, но когда мышам вводили инъекцией ароС-II-а за 30 мин до кормления через желудочный зонд (1 мкмоль/кг; I.P. или S.Q.), то постпрандиальное повышенное содержание TG почти полностью снижалось. Постпрандиальное содержание TG в сыворотке крови мышей показано на фиг. 34А и 34В. Подобные результаты обнаруживали у мышей ароЕ-КО, что свидетельствует о том, что эффект ароС-II-а не зависит от ароЕ (не показано). АроС-II-а, по-видимому, не действовал на уровень абсорбции TG, поскольку он также быстро ускорял выведение TG из сыворотки крови после I.P. инъекции 20% интралипида. Добавление экзогенной LPL в образцы сыворотки крови, собранные после I.P. инъекции с интралипидом, показало, что липопротеиновые частицы от мышей, обработанных ароС-II-а, были лучшими субстратами для LPL.

Повышение в сыворотке крови содержания TG после I.P. инъекции интралипида только частично блокировалось на приблизительно 50% при совместном введении инъекцией мышам ингибитора LPL Triton WR1339, что свидетельствует о том, что ароС-II-а действует дополнительно LPL-независимыми механизмами. На фиг. 34А и 34В показано сравнение постпрандиального содержания TG в сыворотке крови мышей с совместной инъекцией Triton или без таковой. Инкубация сыворотки крови человека с экзогенным ароС-II-а в дозах, сравнимых с дозами, достигнутыми *in vivo* у мышей, показала, что ароС-II-а связывается со всеми липопротеинами, в том числе HDL, и вызывает замещение ароС-I и ароС-III. Кроме того, ингибирование LPL *in vitro* от добавления экзогенного ароС-III можно преодолеть путем добавления ароС-II-а в молярном отношении по меньшей мере 1:10 по сравнению с ароС-III. В заключение, миметический пептид ароС-II-а при относительно низких дозах может ускорять выведение постпрандиального содержания TG после жировой нагрузки. Это происходит частично путем активации LPL, как и ожидалось. Однако неожиданно авторы настоящего изобретения обнаружили, что ароС-II-а также снижает содержание триглицеридов, ослабляя ингибирование LPL с помощью ароС-III и, возможно, также блокируя другие известные LPL-независимые эффекты ароС-III и, возможно, ароС-I, в замедлении постпрандиального выведения TG.

Пример 11. Delta6PV усиливал *in vivo* липолиз на мышинных моделях (исследования с однократной дозой).

Эффект пептида Delta6PV в отношении *in vivo* липолиза изучали на мышах дикого типа, нокаутных по ароС-II и трансгенных по ароС-III мышах в исследованиях с однократной дозой.

После внутривентральной инъекции интралипида содержание TG в сыворотке крови существенно повышалось у мышей дикого типа. Совместная инъекция ингибитора LPL Triton дополнительно повышала содержание TG в сыворотке крови в более чем 1000 раз в момент времени 6 ч. При внутривентральной инъекции мышам инъекцией миметического пептида ароС-II Delta6PV повышение содержания TG существенно снижалось (фиг. 35В). Пептид Delta6PV обращал ингибирование LPL с помощью Triton.

Миметический пептид ароС-II Delta6PV вводили внутривентральной (фиг. 36В) или подкожной (фиг. 36С) инъекцией нокаутным по ароС-II мышам и содержание TG в плазме контролировали с течением времени. Инъекция Delta6PV приводила к быстрому и заметному снижению содержания TG в плазме.

После внутривентральной инъекции с интралипидом содержание TG в сыворотке крови повышалось у нокаутных по ароС-II мышей в приблизительно 7 раз через 6 ч после инъекции. При внутривентральной инъекции мышам инъекцией пептида Delta6PV через 1 ч после инъекции интралипида повышение содержания TG существенно снижалось (фиг. 37В).

Пептид Delta6PV вводили внутривентральной инъекцией трансгенным по ароС-III мышам и со-

держание TG в плазме контролировали с течением времени. Инъекция Delta6PV приводила к быстрому и заметному снижению содержания TG в плазме с максимальным снижением через приблизительно 6 ч после инъекции (фиг. 38B).

После внутривентральной инъекции с интралипидом содержание TG в сыворотке крови повышалось у трансгенных по apoC-III мышей в приблизительно 4 раза через 6 ч после инъекции. При внутривентральной введении мышам инъекцией пептида Delta6PV через 1 ч после инъекции интралипида повышение содержания TG существенно снижалось (фиг. 39).

Исследования с однократной дозой показали, что миметический пептид apoC-II.

Delta6PV обладает способностью усиливать *in vivo* липолиз на мышинных моделях.

Пример 12. Delta6PV усиливал *in vivo* липолиз на мышинных моделях (исследования с повторной дозой).

Мышам дикого типа, нокаутным по apoC-II мышам и трансгенным по apoC-III мышам вводили инъекцией миметический пептид apoC-II Delta6PV несколько раз внутривентральной инъекцией.

Пептид Delta6PV вводили внутривентральной инъекцией нокаутным по apoC-II мышам с 24-часовыми интервалами на протяжении 6 суток и измеряли содержание TG в плазме через 0 ч, 3 ч и 6 ч в день 1 и через 0 ч, 3 ч и 6 ч в день 6. Повторная инъекция Delta6PV приводила к заметному и длительному снижению содержания TG в плазме (фиг. 40). SEC-FPLC (эксклюзионную хроматографию размеров - жидкостную экспресс-хроматографию белков) выполняли на объединенных образцах плазмы через 0 ч и 6 ч в день 1 и через 0 ч и 6 ч в день 6 от мышей, обработанных пептидом Delta6PV при 1 мкмоль/кг (B.W.). Как показано на фиг. 41, содержание VLDL снижалось через 6 ч после инъекции пептида Delta6PV, тогда как содержание HDL повышалось, как измерено с помощью содержания фосфолипидов. Содержание TG также снижалось в пуле VLDL (фиг. 42).

Пептид Delta6PV вводили внутривентральной инъекцией трансгенным по apoC-III мышам с 24-часовыми интервалами на протяжении 5 суток и контролировали липиды в плазме в день 1 и день 5, как показано на фиг. 43A. Повторная инъекция Delta6PV приводила к более низкому содержанию TG в плазме через 1 ч, 3 ч и 6 ч после инъекции пептида в день 1 и день 5 по сравнению с контрольными условиями (фиг. 43B и фиг. 44). Образцы плазмы в 0 ч и 3 ч в день 1 и день 5 от мышей, обработанных 5 мкмоль/кг (B.W.) пептида Delta6PV, вносили в SEC-FPLC для разделения популяций VLDL и HDL. Содержание apoC-III в VLDL и HDL измеряли с помощью ELISA. Содержание apoC-III снижалось и в VLDL, и в HDL у обработанных Delta6PV мышей (фиг. 45A и фиг. 45B). Результаты свидетельствуют о том, что Delta6PV снижал содержание apoC-III в VLDL и HDL путем замещения.

После внутривентральной инъекции с интралипидом содержание TG в сыворотке крови повышалось у мышей дикого типа в более чем 40 раз через 3 ч после инъекции. При внутривентральной введении мышам инъекцией пептида Delta6PV через 1 ч после инъекции интралипида повышение содержания TG существенно снижалось (фиг. 46B).

Исследования с повторной дозой показали, что миметический пептид apoC-II Delta6PV обладает способностью усиливать *in vivo* липолиз на мышинных моделях.

Пример 13. Delta6PV усиливал *in vivo* липолиз на модели обезьяны с ожирением.

Миметический пептид apoC-II Delta6PV вводили внутривенной инъекцией обезьянам с ожирением с содержанием TG в плазме более чем 2 ммоль/л и контролировали содержание липидов в плазме с течением времени. Однократная инъекция пептида Delta6PV приводила к существенному снижению содержания TG в плазме, измеряемого через 24 ч, 48 ч и 72 ч после инъекции (фиг. 47). Эффект пептида Delta6PV на модели обезьяны с ожирением является зависимым от дозы. Инъекция пептида Delta6PV также приводила к заметному снижению содержания VLDL (фиг. 48A), хотя содержание LDL и HDL существенно не изменялось (фиг. 48B и фиг. 48C).

В заключение, миметический пептид apoC-II Delta6PV обладает способностью усиливать *in vivo* липолиз и снижать содержание VLDL на модели обезьяны с ожирением.

Пример 14. Замещение apoC-III пептидом Delta6PV.

Авторы настоящего изобретения исследовали эффект пептида Delta6PV в отношении замещения apoC-III.

Инкубация VLDL, выделенного из плазмы человека, с пептидом Delta6PV показала, что пептид Delta6PV обладает более высокой аффинностью в отношении VLDL, чем у апополипротеинов. Как показано на фиг. 49, пептид Delta6PV замещал apoC-III зависимым от дозы образом. ApoC-II в VLDL также замещался пептидом Delta6PV.

Анализ LPL также выполняли с использованием дефицитной по apoC-II плазмы человека в качестве субстрата. Результаты показаны на фиг. 50. При добавлении 25 мкМ рекомбинантного белка apoC-III продуцирование свободной жирной кислоты (NEFA) снижалось от приблизительно 1,5 мкМ до приблизительно 0,8 мкМ. Пептиды Delta6 и Delta6PV добавляли при различных концентрациях. Добавление пептидов Delta6 и Delta6PV преодолевало ингибиторный эффект apoC-III и облегчало липолиз. Данные результаты показывают, что пептид Delta6PV способен заменять apoC-III и усиливать *in vitro* липолиз.

Хотя настоящее изобретение было конкретно показано и описано со ссылкой на предпочтительный вариант осуществления и различные альтернативные варианты осуществления, специалистам в данной

области будет понятно, что в его форму и детали могут быть внесены различные изменения без отступления от сущности и объема настоящего изобретения.

Все литературные источники, выданные патенты и заявки на выдачу патентов, процитированные в основной части настоящего описания, тем самым включены посредством ссылки во всей их полноте для всех целей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный миметический пептид ароС-II, содержащий от N-конца до С-конца амфипатический первый спиральный домен, шарнирную область и второй спиральный домен, причем миметический пептид имеет последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью по отношению к полноразмерной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 9.

2. Выделенный миметический пептид ароС-II по п.1, где миметический пептид имеет последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью по отношению к полноразмерной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 9.

3. Выделенный миметический пептид ароС-II по п.1, при этом пептид имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9.

4. Фармацевтическая композиция, содержащая миметический пептид по п.1 и фармацевтически приемлемый носитель.

5. Фармацевтическая композиция по п.4, при этом фармацевтическая композиция подходит для подкожной инъекции.

6. Способ лечения гипертриглицеридемии у больного, предусматривающий введение больному эффективного количества миметического пептида по п.1 или фармацевтической композиции по п.4.

7. Способ по п.6, при котором гипертриглицеридемия связана с ожирением.

8. Способ по п.6, при котором гипертриглицеридемия связана с сахарным диабетом.

9. Способ по п.6, при котором гипертриглицеридемия связана с употреблением спирта.

10. Способ по п.6, при котором гипертриглицеридемия связана с медикаментом.

11. Способ по п.6, при котором гипертриглицеридемия вызвана дефицитом LPL.

12. Способ по п.11, при котором гипертриглицеридемия вызвана наследственным дефицитом липопротеинлипазы.

13. Способ по п.11, при котором дефицит LPL вызван мутацией гена LPL.

14. Способ по п.13, при котором мутация ведет к пониженной ферментативной активности LPL.

15. Способ по п.13, при котором мутация ведет к отсутствию ферментативной активности LPL.

16. Способ по п.11, при котором дефицит LPL диагностируют по отсутствию активности LPL в сыворотке крови больного.

17. Способ по п.13, при котором мутацию выявляют с помощью анализа последовательности ДНК.

18. Способ по п.6, при котором гипертриглицеридемия вызвана дефицитом ароС-II.

19. Способ по п.6, при котором гипертриглицеридемия вызвана повышенным содержанием ароС-III.

20. Способ по п.6, при котором концентрация триглицерида (TG) в сыворотке крови до лечения больного составляет от 150 до 199 мг/дл.

21. Способ по п.6, при котором концентрация триглицерида (TG) в сыворотке крови до лечения больного составляет от 200 до 499 мг/дл.

22. Способ по п.6, при котором концентрация триглицерида (TG) в сыворотке крови до лечения больного составляет от 500 до 999 мг/дл.

23. Способ по п.6, при котором концентрация триглицерида (TG) в сыворотке крови до лечения больного составляет от 1000 до 1999 мг/дл.

24. Способ по п.6, при котором концентрация триглицерида (TG) в сыворотке крови до лечения больного равняется или превышает 2000 мг/дл.

25. Способ по п.6, при котором у больного развился острый панкреатит или существует риск его развития.

26. Способ по п.6, при котором у больного развилось острое сердечно-сосудистое заболевание или существует риск его развития.

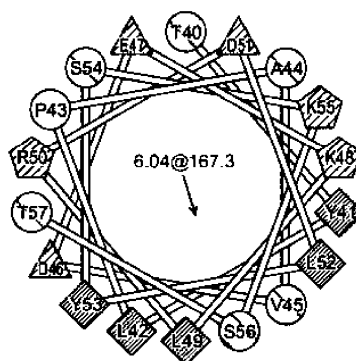
27. Способ получения миметического пептида по п.1, предусматривающий получение пептида рекомбинантным путем или с помощью химического синтеза.

Homo sapiens	T	Y	L	P	A	V	D	E	K	L	R	D	L	Y	S	K	S	T	A	
Pan troglodytes	T	Y	L	P	A	V	D	E	K	L	R	D	L	Y	S	K	S	T	A	
Macaca fascicularis	T	Y	L	P	A	V	D	E	K	L	R	D	L	Y	S	K	S	T	A	
Macaca mulatta	T	Y	L	P	A	V	D	E	K	L	R	D	L	Y	S	K	S	T	A	
Papio hamadryas	T	Y	L	P	A	V	D	E	K	L	R	D	L	Y	S	K	S	T	A	
Callithrix jacchus	T	Y	L	H	T	V	D	E	K	L	R	D	M	Y	S	K	S	T	A	
Mus musculus	T	Y	P	I	S	M	D	E	K	L	R	D	M	Y	S	K	S	S	A	
Rattus norvegicus	T	Y	L	T	S	V	D	E	K	L	R	D	M	Y	S	K	S	S	A	
Canis lupus familiaris	A	Y	P	T	T	M	D	E	K	I	R	D	I	Y	S	K	S	T	A	
Bos taurus	T	Y	L	P	A	V	D	E	K	L	R	D	L	Y	S	K	S	T	A	
Sus scrofa	T	Y	L	P	T	V	D	E	K	I	R	D	M	Y	S	K	S	T	A	
Cavia porcellus	T	Y	L	P	A	V	D	E	T	I	R	D	I	Y	S	K	I	G	S	A

Фиг. 1

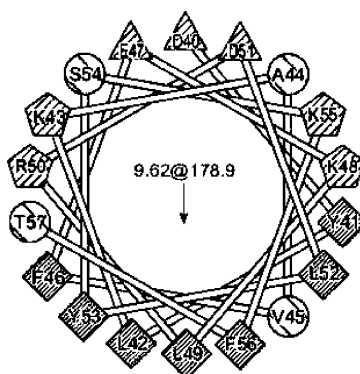
Нативный проС-II
(аминокислотные остатки 40-57):

TYLPAVDEKLRDLYSKST



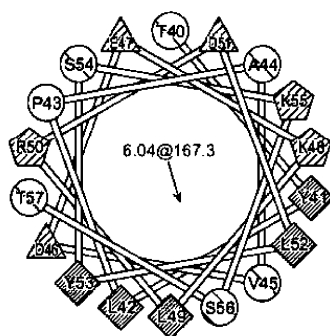
Фиг. 2А

Delta4': DYLKAVFEKLRDLYSKFT



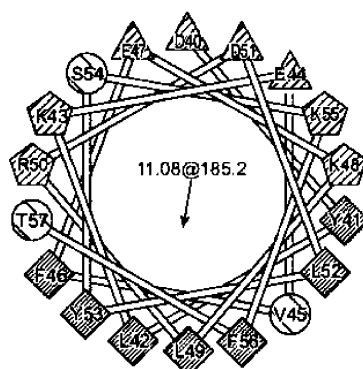
Фиг. 2В

Нативный ароС-II
(аминокислотные остатки 40-57):
TYLPAVDEKLRDLYSKST



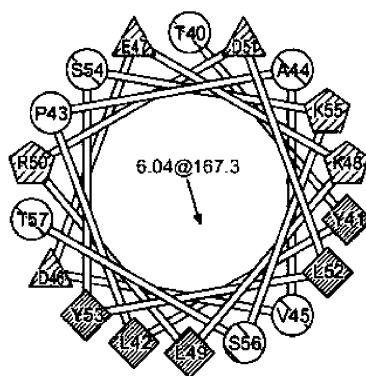
Фиг. 3А

Delta5': DYLKEVFEKLRDLYSKFT



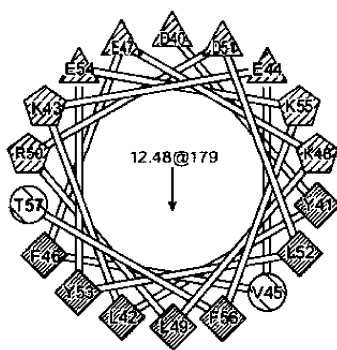
Фиг. 3В

Нативный ароС-II
(аминокислотные остатки 40-57):
TYLPAVDEKLRDLYSKST



Фиг. 4А

Delta6': DYLKEVFEKLRDLYEKFT



Фиг. 4В

Delta4': DYLDVWEKLRDLYSKFT

моно-ацил-Delta4': DYLDVWEKLRDLYSKFT

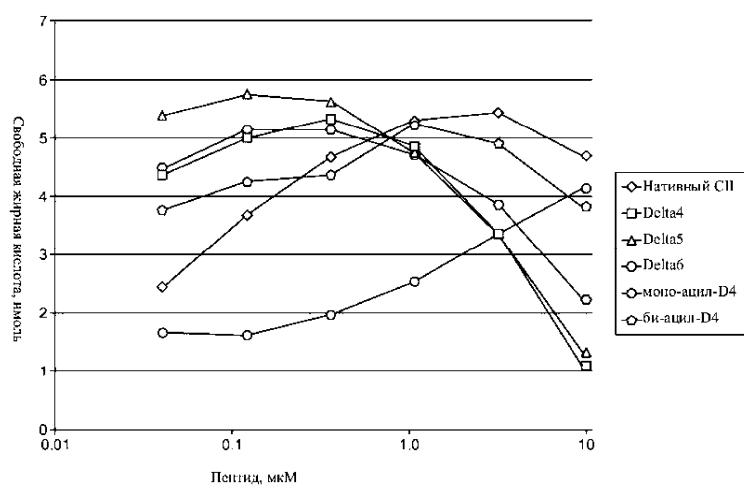
(C18)

ди-ацил-Delta4': DYLDVWEKLRDLYSKFT

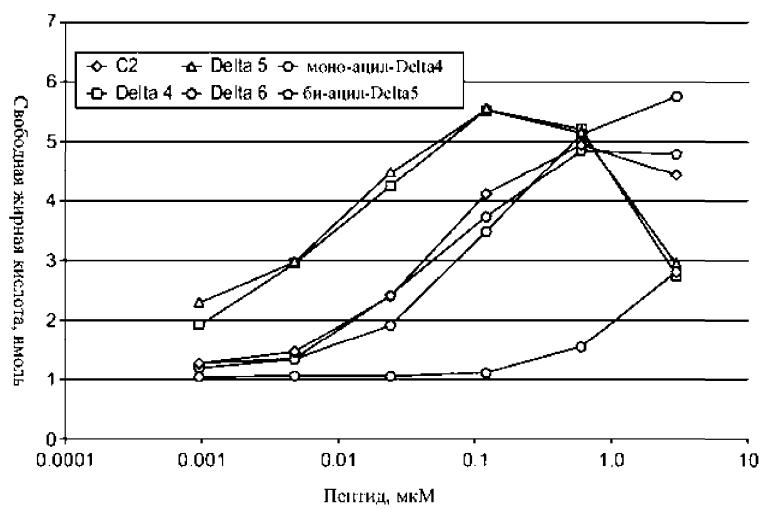
(C18)

(C18)

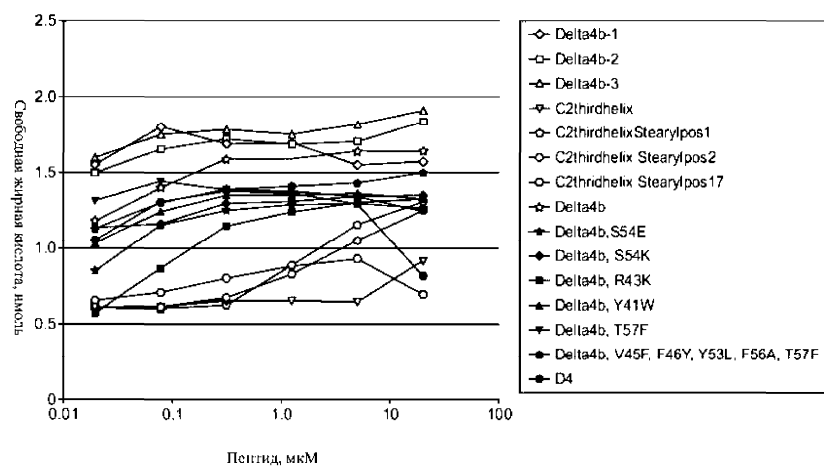
Фиг. 5



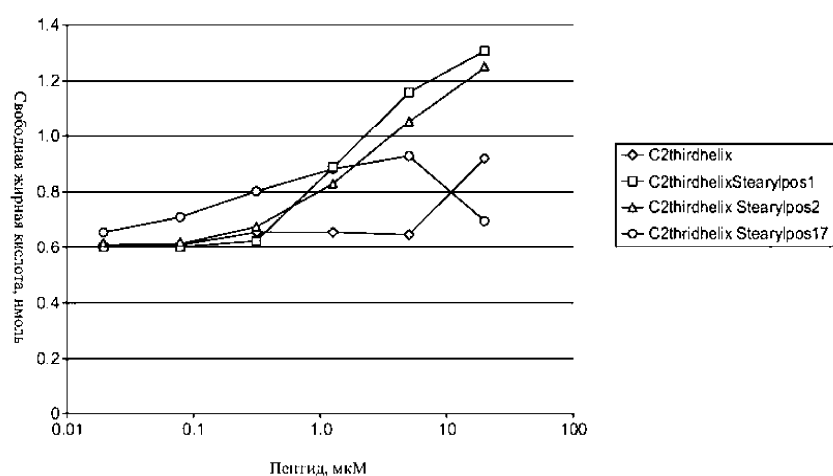
Фиг. 6



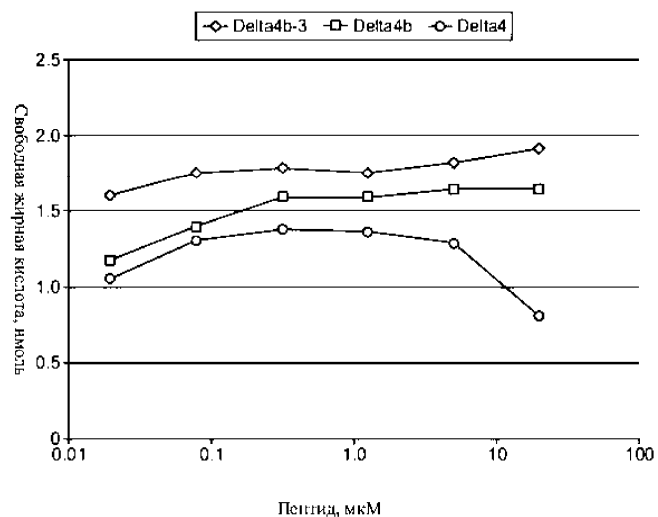
Фиг. 7



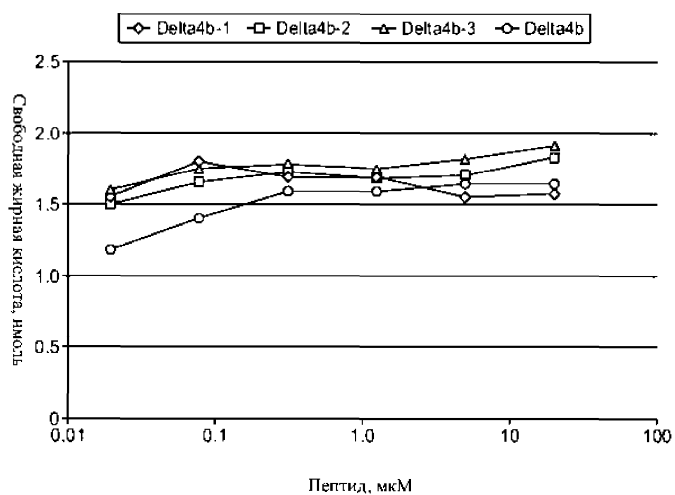
Фиг. 8



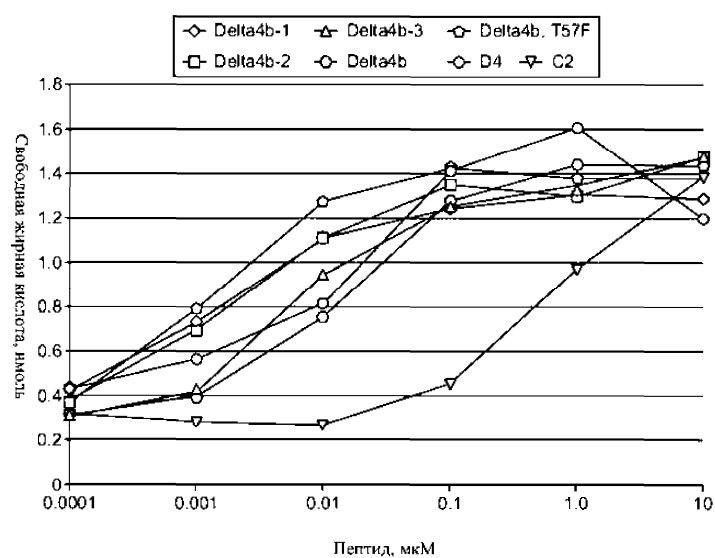
Фиг. 9



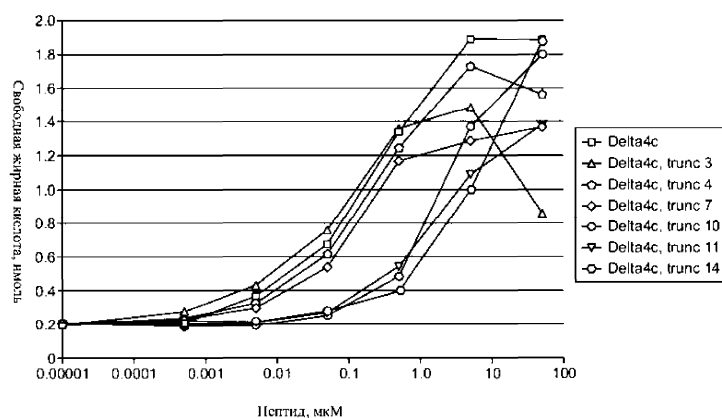
Фиг. 10



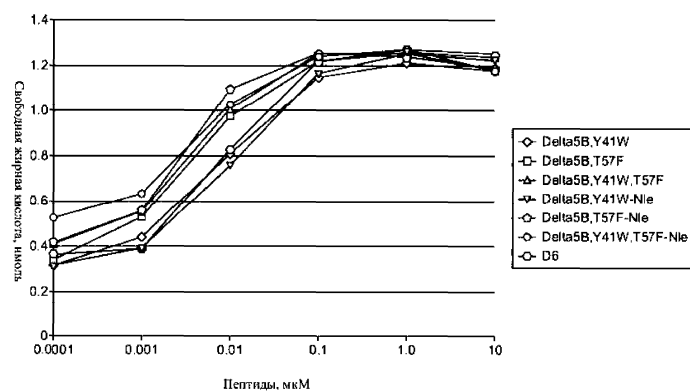
Фиг. 11



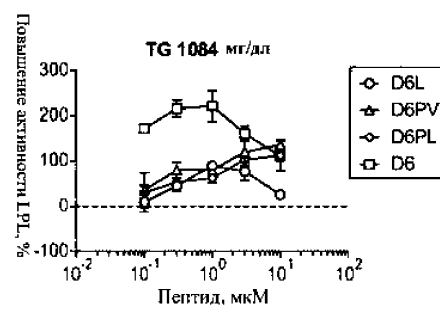
Фиг. 12



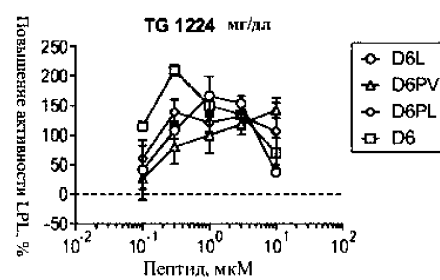
Фиг. 13



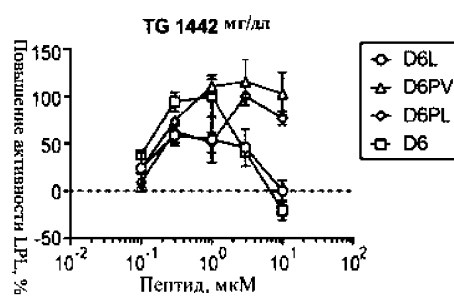
Фиг. 14



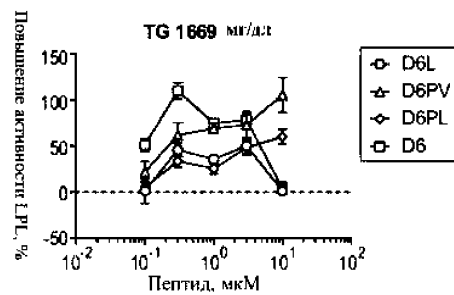
Фиг. 15А



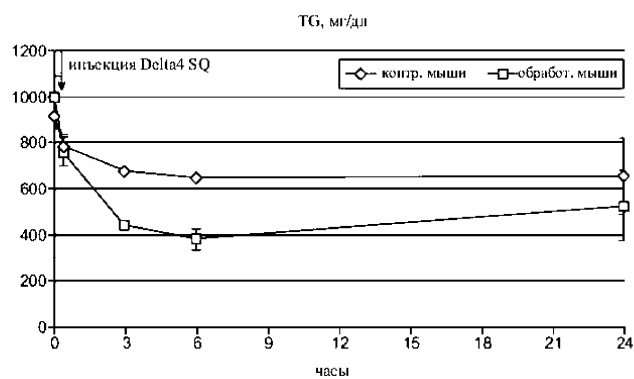
Фиг. 15В



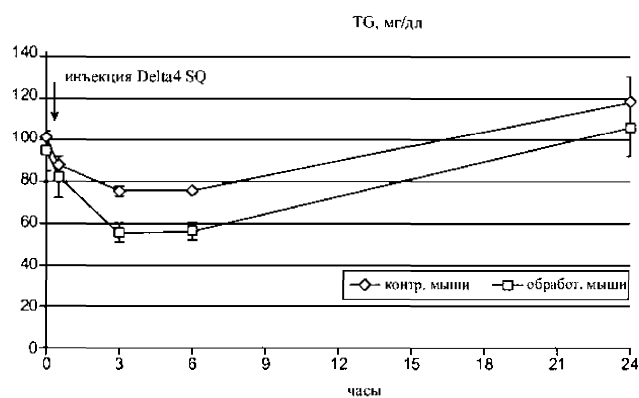
Фиг. 15С



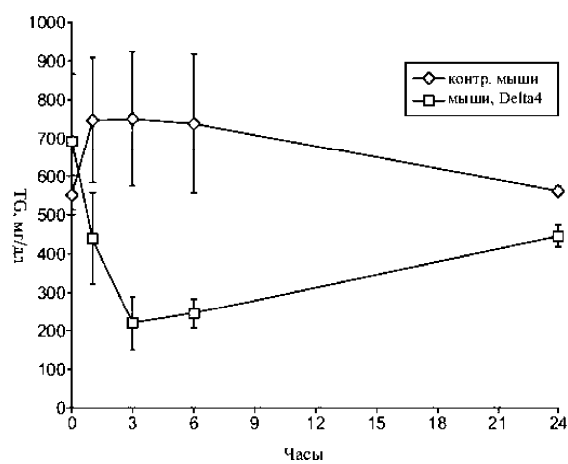
Фиг. 15D



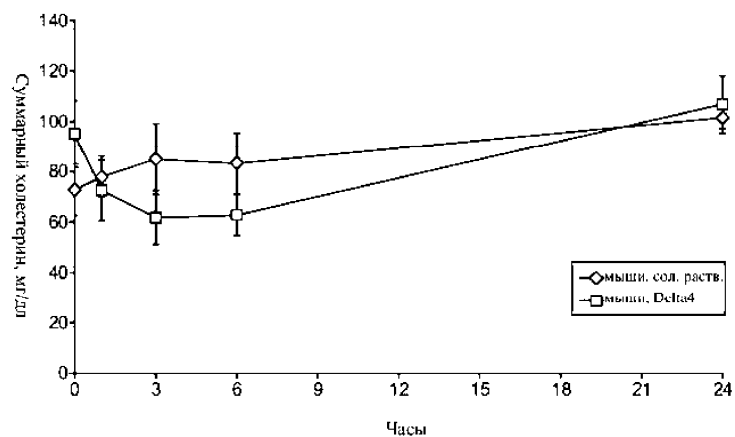
Фиг. 16



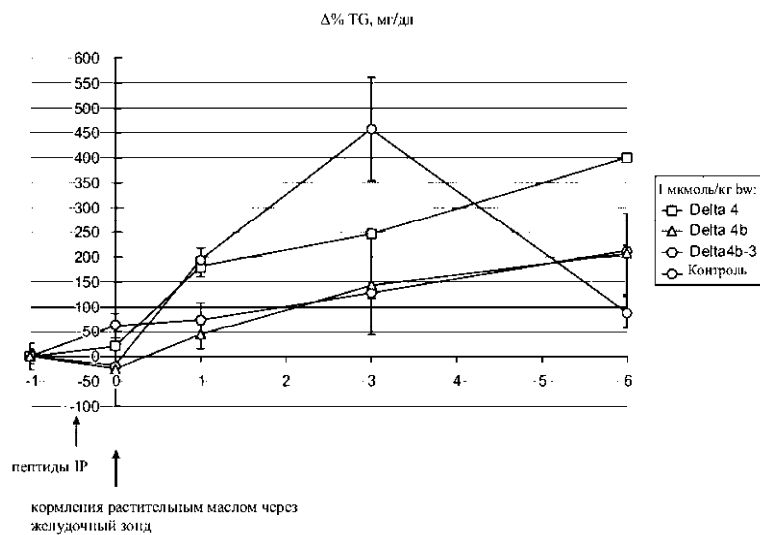
Фиг. 17



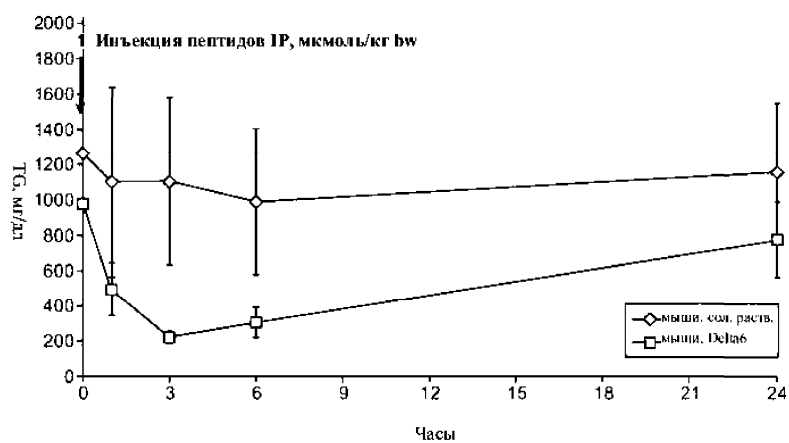
Фиг. 18



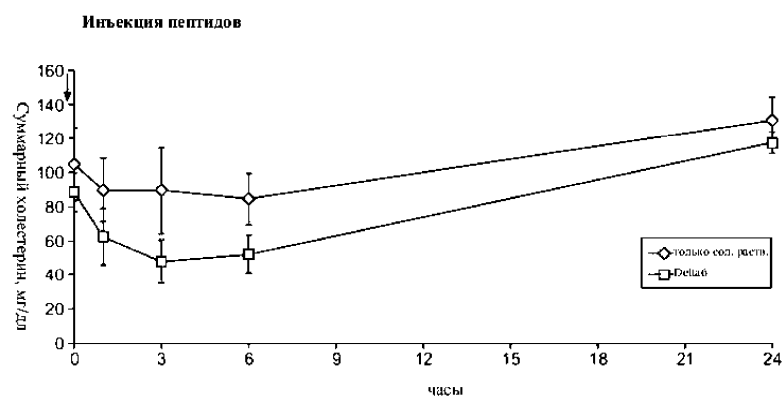
Фиг. 19



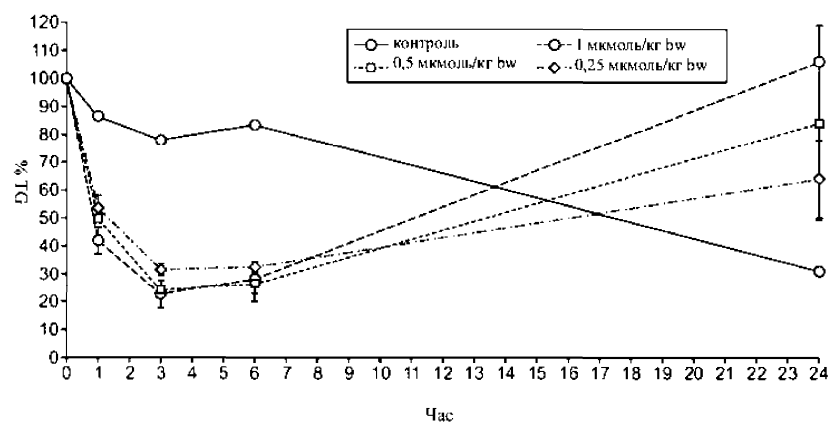
Фиг. 20



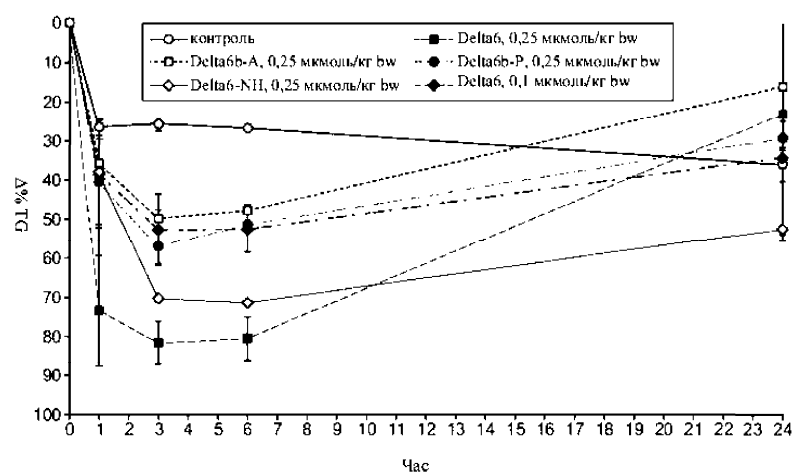
Фиг. 21



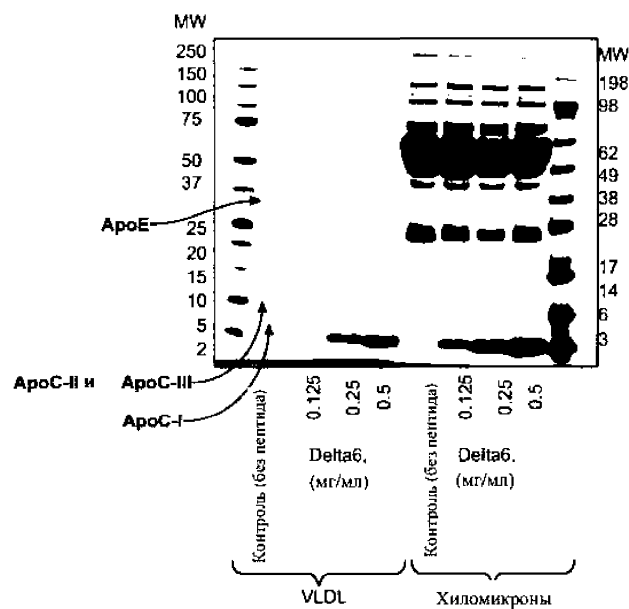
Фиг. 22



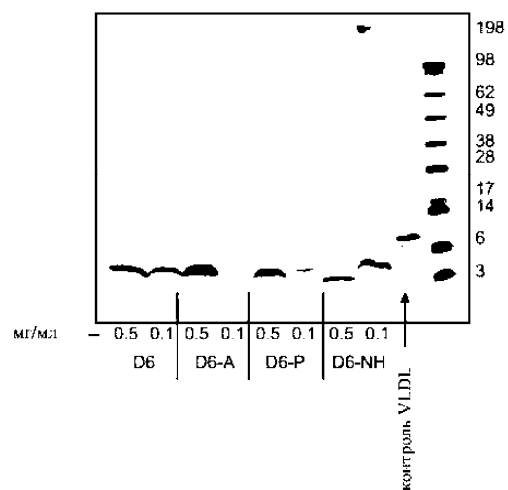
Фиг. 23



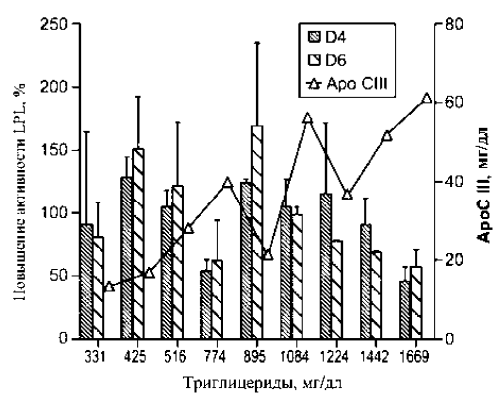
Фиг. 24



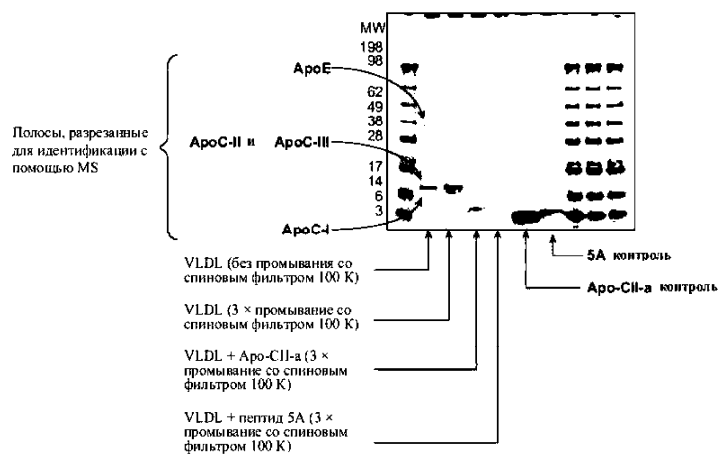
Фиг. 25



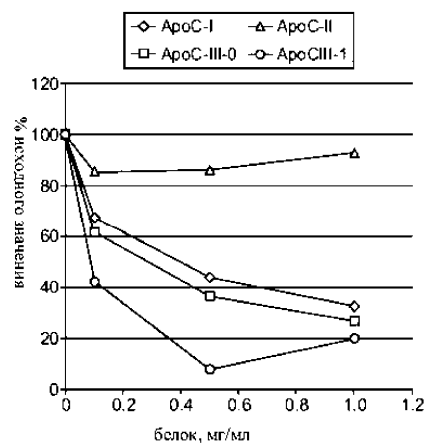
Фиг. 26



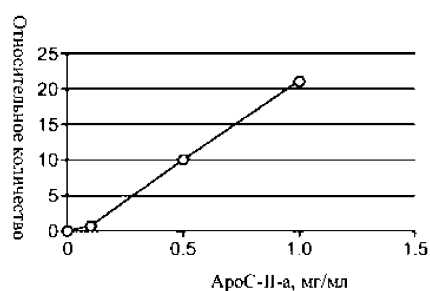
Фиг. 27



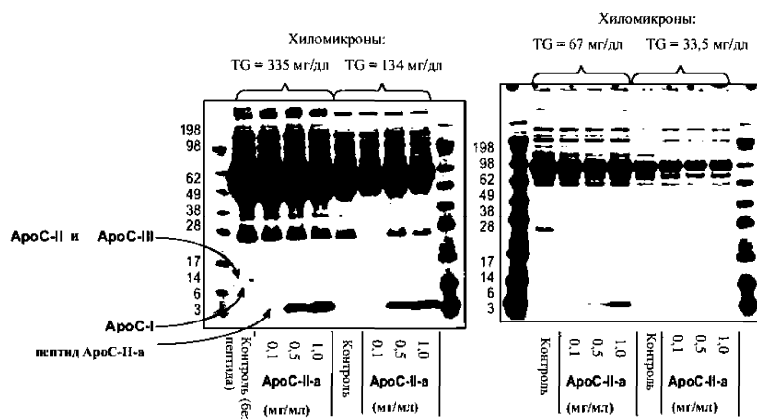
Фиг. 28



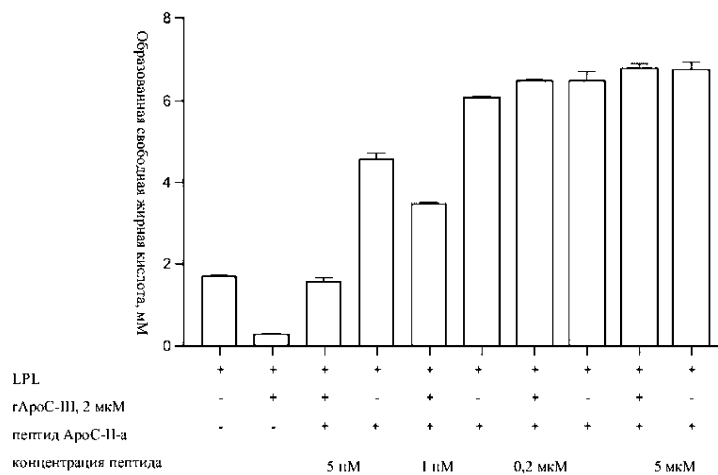
Фиг. 29А



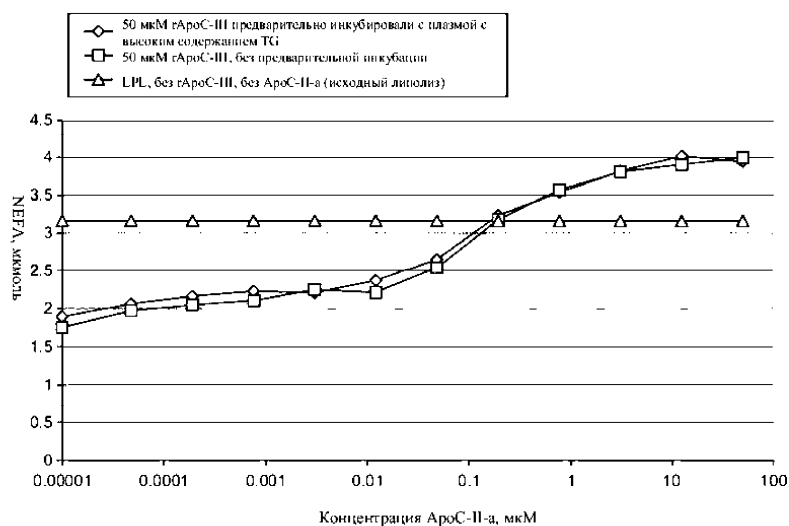
Фиг. 29В



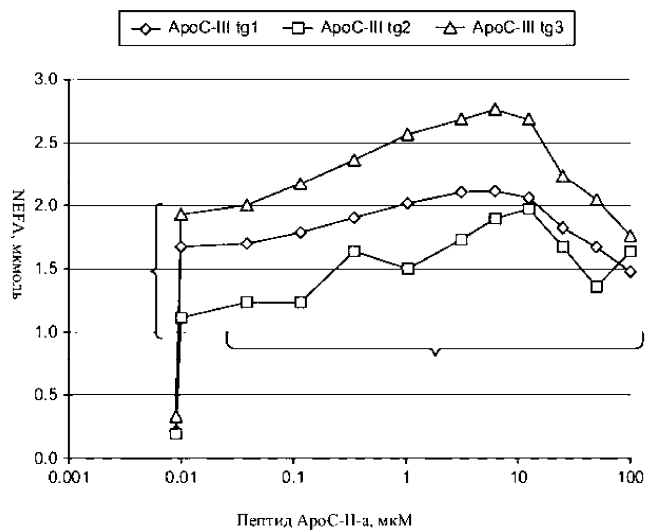
Фиг. 30



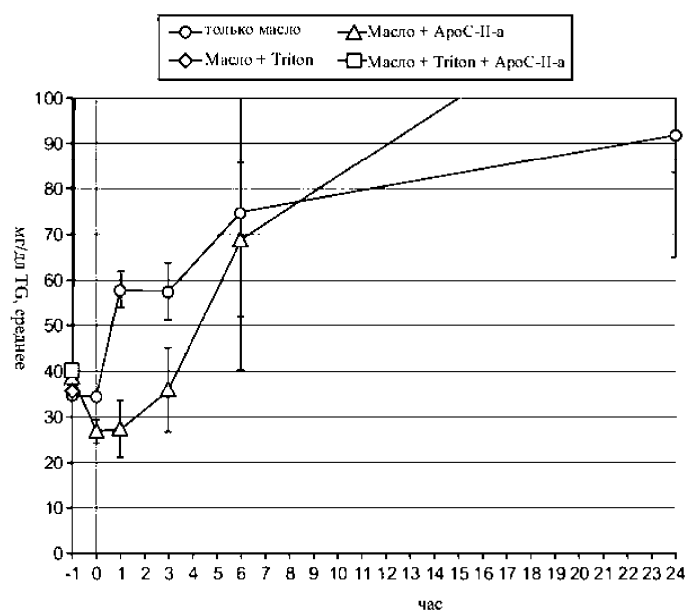
Фиг. 31



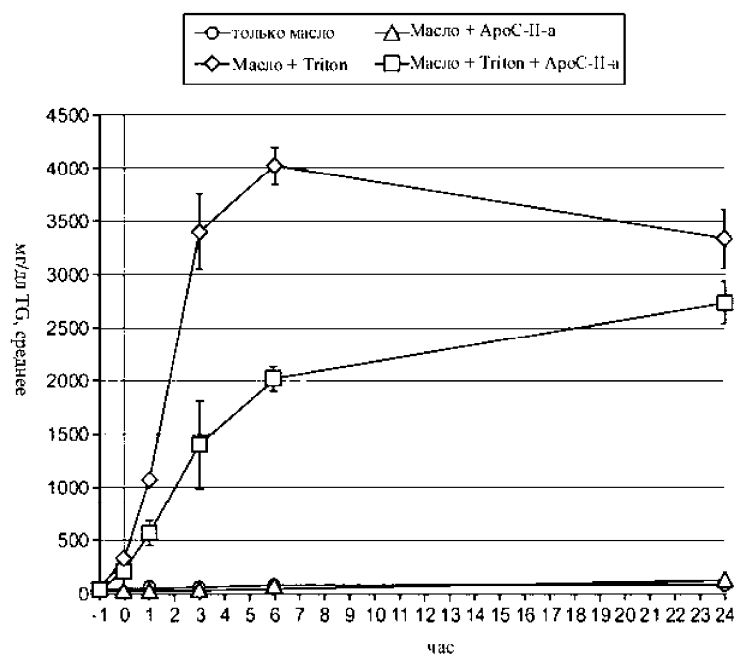
Фиг. 32



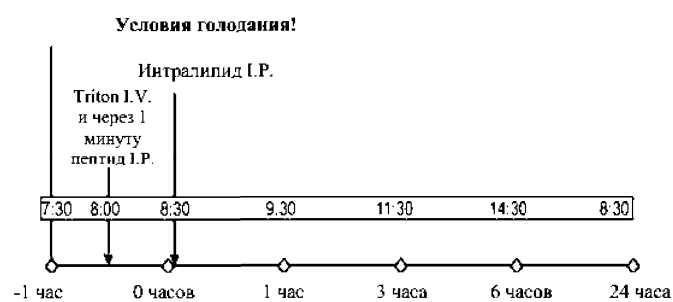
Фиг. 33



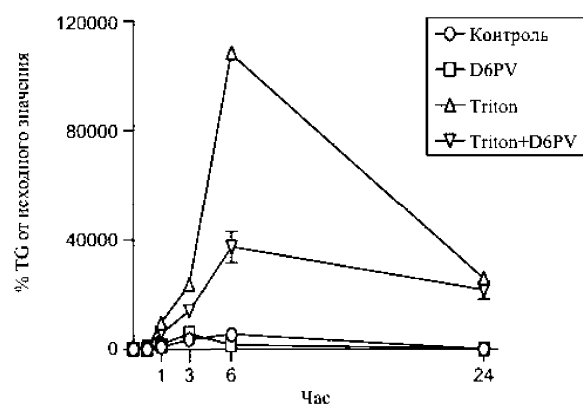
Фиг. 34А



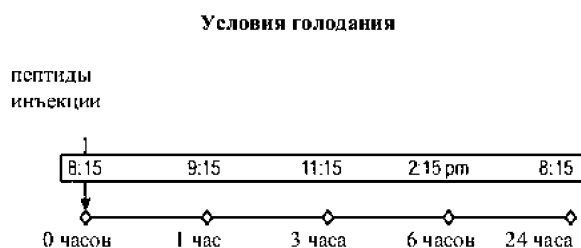
Фиг. 34В



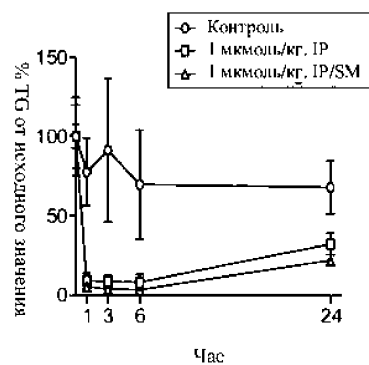
Фиг. 35А



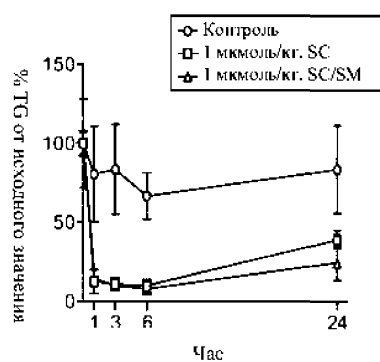
Фиг. 35В



Фиг. 36А

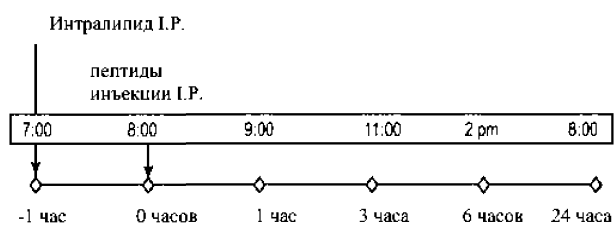


Фиг. 36В

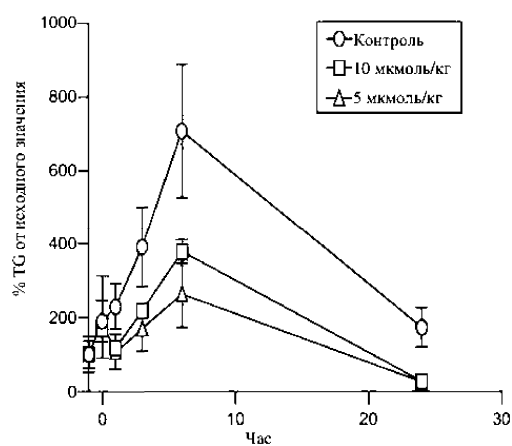


Фиг. 36С

Условия голодания!

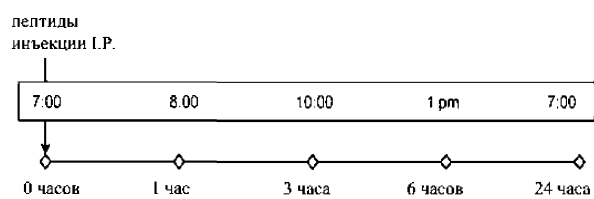


Фиг. 37А

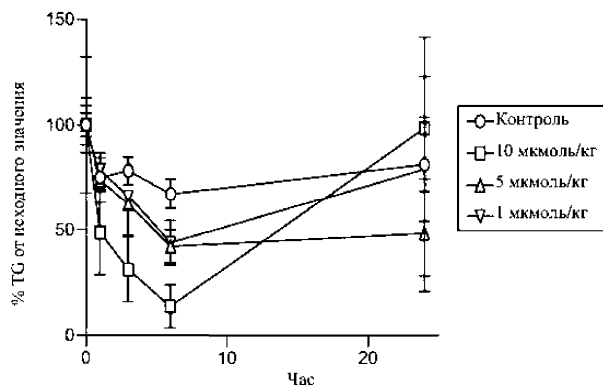


Фиг. 37В

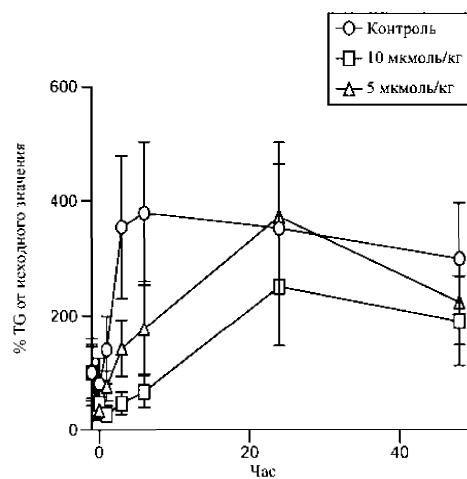
Условия голодания



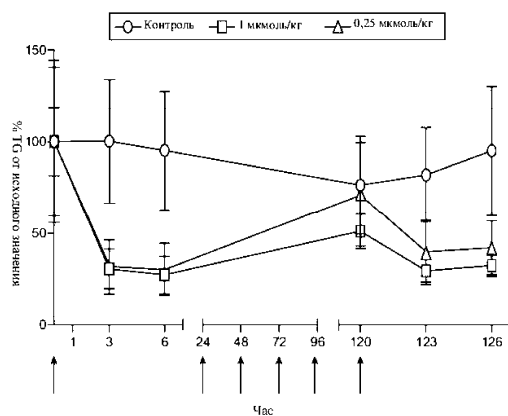
Фиг. 38А



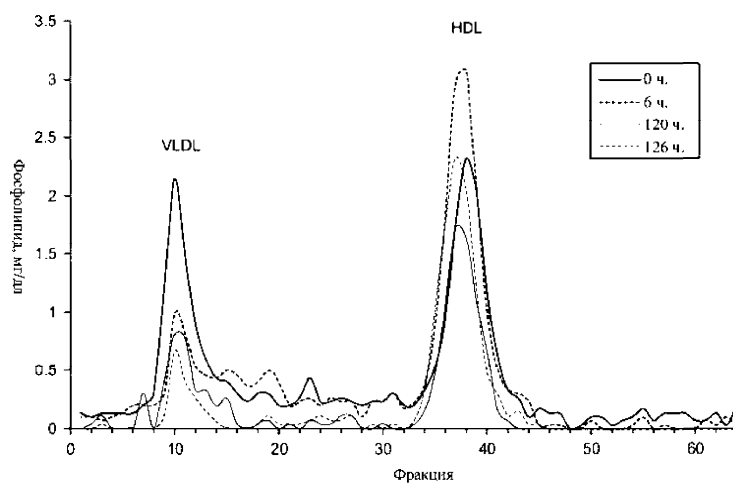
Фиг. 38В



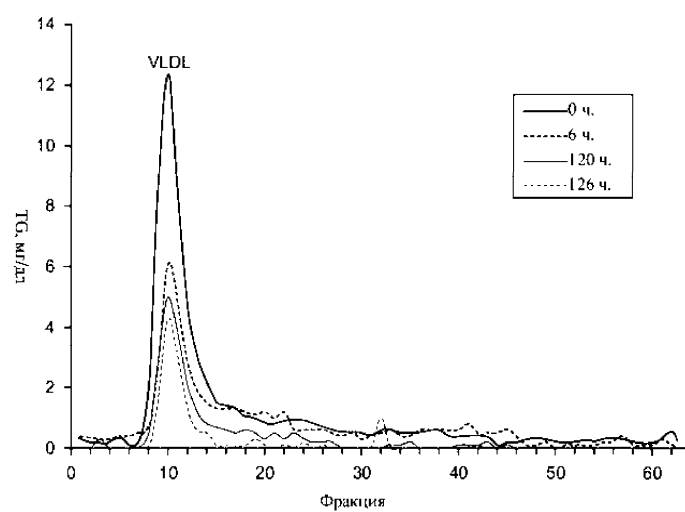
Фиг. 39



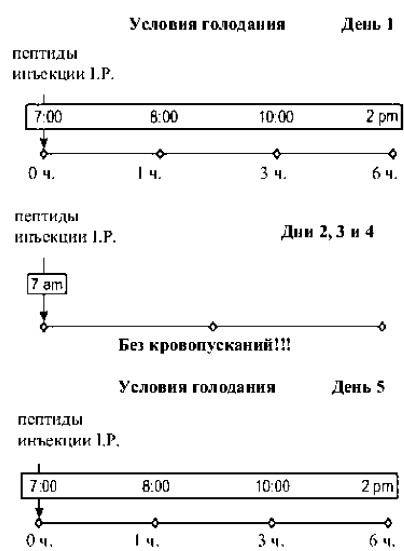
Фиг. 40



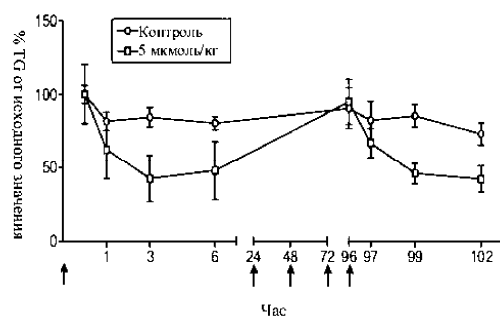
Фиг. 41



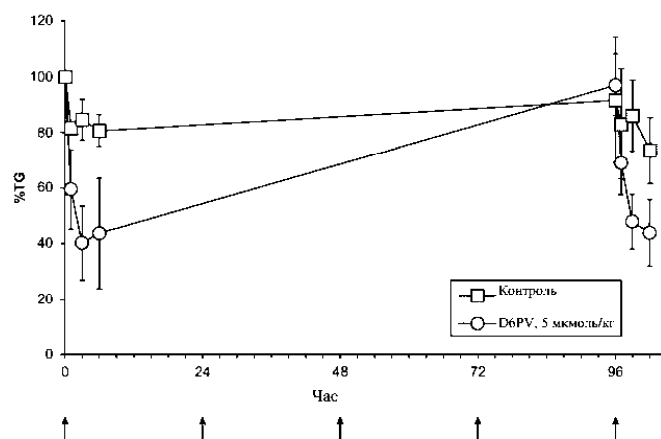
Фиг. 42



Фиг. 43А

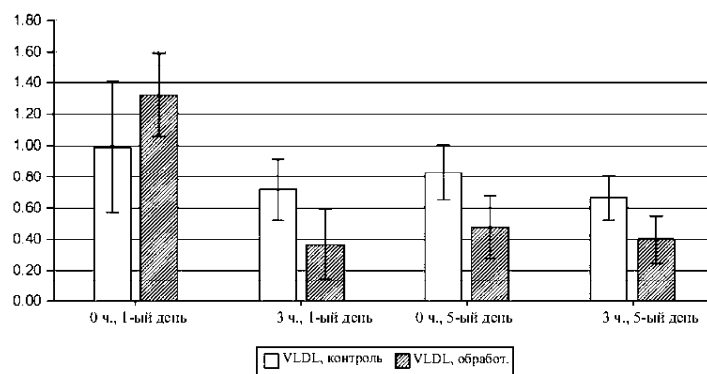


Фиг. 43В



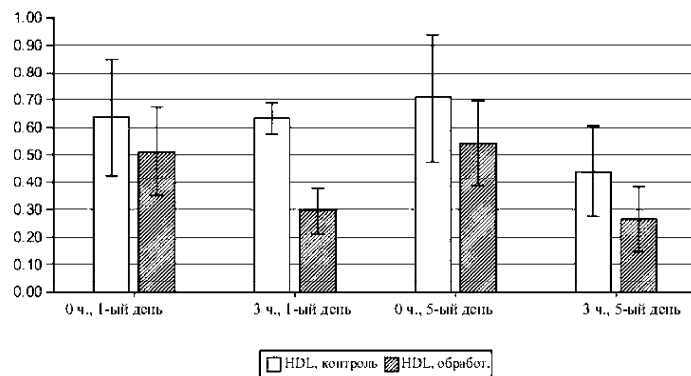
Фиг. 44

мкг/мл ApoC3 в VLDL



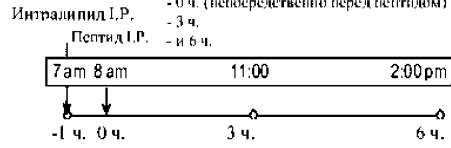
Фиг. 45А

мкг/мл ApoC3 в VLDL

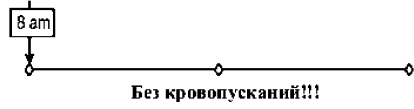


Фиг. 45В

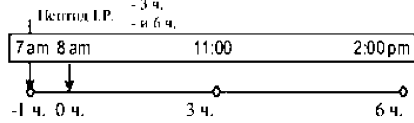
Кровопускания в: **День 1**
 - 1 ч. (непосредственно перед интралипидом)
 - 0 ч. (непосредственно перед пептидом)
 - 3 ч.
 - и 6 ч.



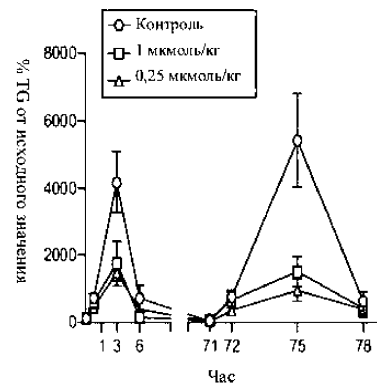
пептиды инъекции I.P. **Дни 2 и 3**



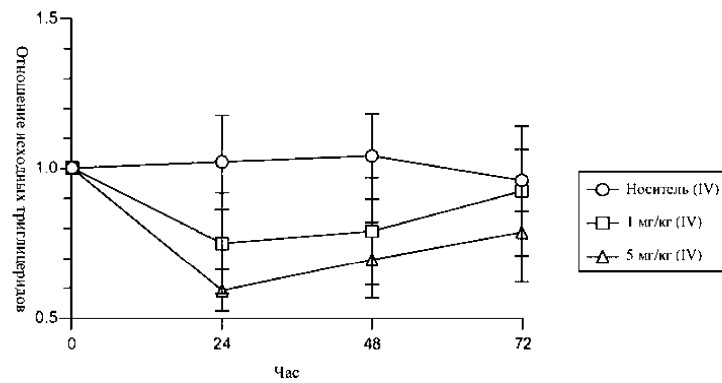
Кровопускания в: **День 4**
 - 1 ч. (непосредственно перед интралипидом)
 - 0 ч. (непосредственно перед пептидом)
 - 3 ч.
 - и 6 ч.



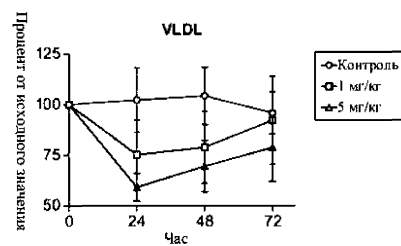
Фиг. 46А



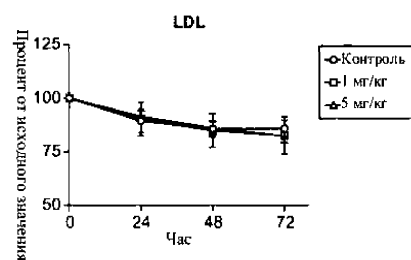
Фиг. 46В



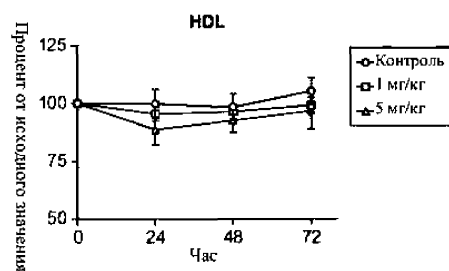
Фиг. 47



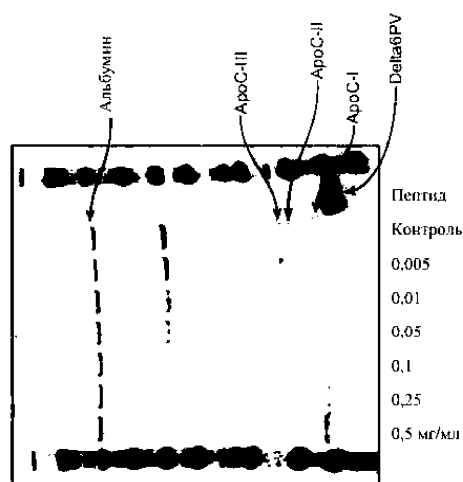
Фиг. 48А



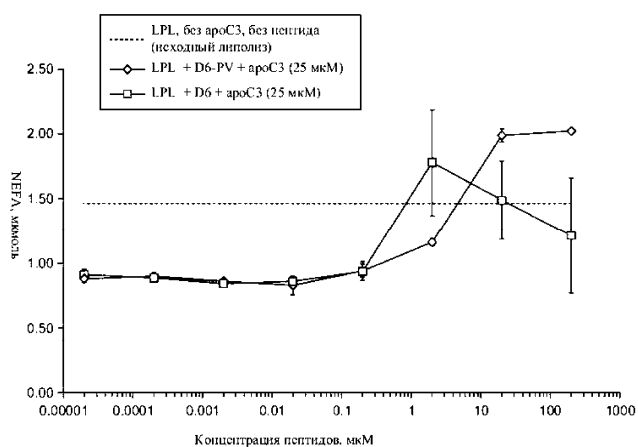
Фиг. 48В



Фиг. 48С

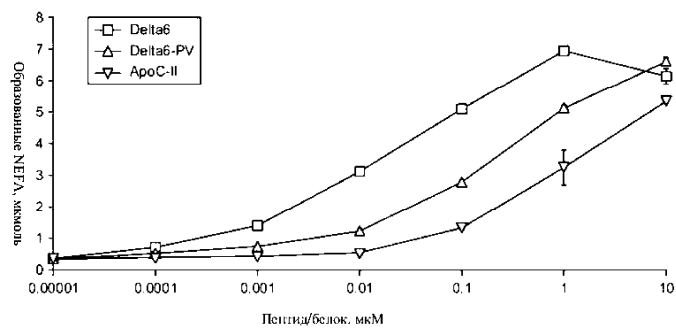


Фиг. 49

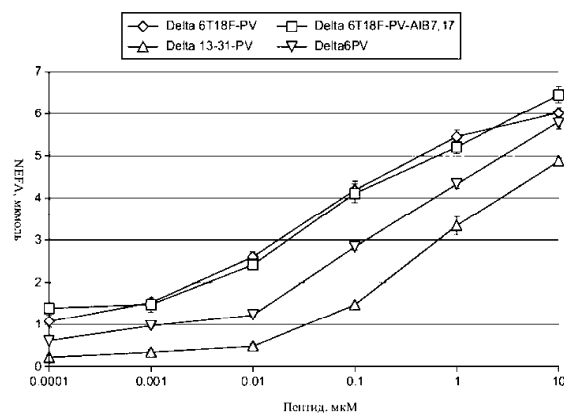


Фиг. 50

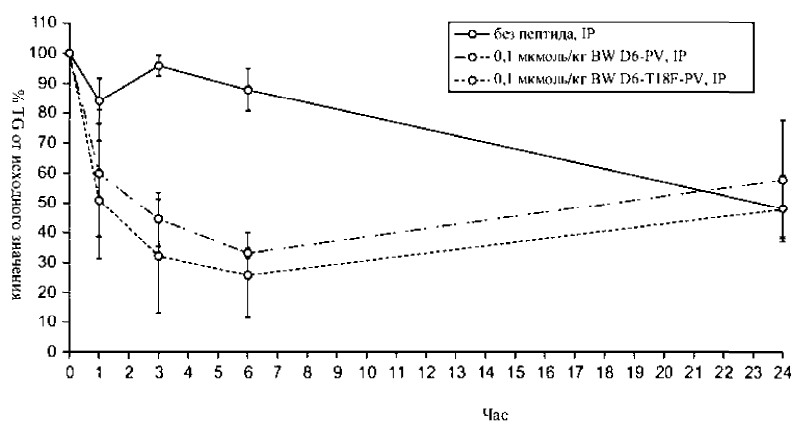
Анализ активации LPL



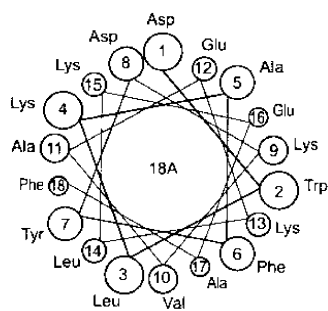
Фиг. 51



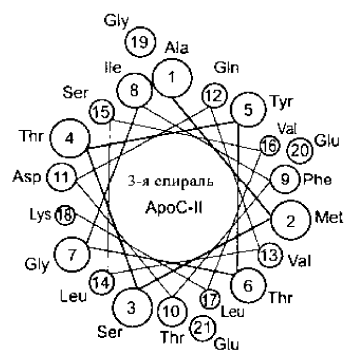
Фиг. 52



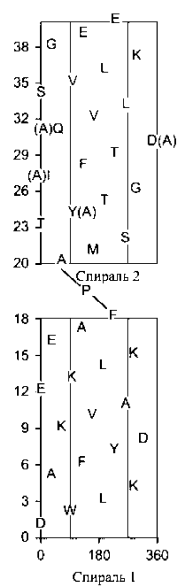
Фиг. 53



Фиг. 54А



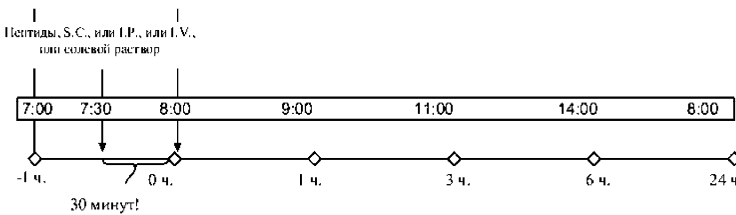
Фиг. 54В



Фиг. 54С

Условия голодания; без пищи, только вода

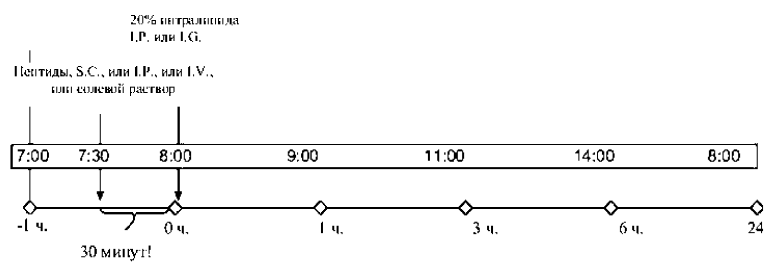
20% интралипида, I.P., или I.G.,
или растительное масло I.G.



Фиг. 55

Условия голодания; без пищи, только вода

Тилоксенол I.V.
или солевой раствор



Фиг. 56

