



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118891273 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 01

(21) 申请号 202380023372.3

(22) 申请日 2023.02.23

(30) 优先权数据

22158253.9 2022.02.23 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.08.23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2023/054519 2023.02.23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/161323 EN 2023.08.31

(71) 申请人 雷索特制药股份有限公司

地址 丹麦霍尔特

(72) 发明人 托马斯·恩格尔布雷希特·诺克尔

德·约纳森

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

72003

专利代理师 付文川

(51) Int.Cl.

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 29/02 (2006.01)

权利要求书8页 说明书38页

序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

膜联蛋白A1衍生的多肽类似物

(57) 摘要

本公开涉及衍生自膜联蛋白A1的多肽和多肽类似物以及包含所述多肽或多肽类似物的组合物,用于治疗炎性和缺血性病况。

1. 一种多肽或多肽类似物,至少包含序列AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKS (SEQ ID NO: 2) 或其功能变体,其中所述多肽由选自下列的多肽或其功能变体组成:

AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKS (SEQ ID NO:2)  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSS (SEQ ID NO:3)  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSK (SEQ ID NO:4)  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKG (SEQ ID NO:5)  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGG (SEQ ID NO:6)  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGP (SEQ ID NO:7)  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPG (SEQ ID NO:8)  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGS (SEQ ID NO:9)  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSA (SEQ ID NO:10)  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAV (SEQ ID NO:11)  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVS (SEQ ID NO:12)  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVSP (SEQ ID NO:13)  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVSPY (SEQ ID NO:14)  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVSPYP (SEQ ID NO:15)  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVSPYPT (SEQ ID NO:16)  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVSPYPTF (SEQ ID NO:17)  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVSPYPTFN (SEQ ID NO:18)  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVSPYPTFNP (SEQ ID NO:19)  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVSPYPTFNPS (SEQ ID NO:20)  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVSPYPTFNPSDV (SEQ ID NO:21)  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVSPYPTFNPSDV AALH (SEQ ID NO:22)  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVSPYPTFNPSDV AALHK (SEQ ID NO:23)  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVSPYPTFNPSDV AALHKA (SEQ ID NO:24)。

2. 根据权利要求1所述的多肽或多肽类似物,其中所述功能变体与SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中的任一个具有至少75%序列同一性,例如与SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中的任一个具有至少80%序列同一性,例如至少85%序列同一性,例如至少90%序列同一性,例如至少95%序列同一性。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽或多肽类似物,其中所述功能变体是选自SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个且具有一个或多个氨基酸取代的多肽,例如一个氨基酸取代、两个氨基酸取代、三个氨基酸取代、四个氨基酸取代或五个氨基酸取代。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽或多肽类似物,其中所述功能变体是选自SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个且具有一个氨基酸取代的多肽。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽或多肽类似物,其中所述功能变体是选自SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个且具有两个氨基酸取代的多肽。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽或多肽类似物,其中所述功能变体是选自SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个且具有三个氨基酸取代的多肽。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽或多肽类似物,其中所述功能变体是选自

SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个且具有四个氨基酸取代的多肽。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽或多肽类似物,其中所述一个或多个氨基酸取代是保守氨基酸取代。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽或多肽类似物,其中SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个的位置10处的丙氨酸残基被任意其他标准或非标准氨基酸取代;例如被独立地选自亮氨酸、天冬氨酸、甲硫氨酸、谷氨酸、异亮氨酸和精氨酸的氨基酸残基取代。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽或多肽类似物,其中SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个的位置21处的缬氨酸残基被任意其他标准或非标准氨基酸取代;例如被独立地选自亮氨酸、天冬氨酸、甲硫氨酸、谷氨酸、异亮氨酸和赖氨酸的氨基酸残基取代。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽或多肽类似物,其中SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个的位置24处的缬氨酸残基被任意其他标准或非标准氨基酸取代;例如被独立地选自亮氨酸、天冬氨酸、甲硫氨酸、谷氨酸、异亮氨酸、精氨酸和赖氨酸的氨基酸残基取代。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽或多肽类似物,其中SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个的位置24处的缬氨酸残基被独立地选自亮氨酸、天冬氨酸和甲硫氨酸的氨基酸残基取代。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽或多肽类似物,其中SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个的位置24处的缬氨酸残基被亮氨酸取代。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽或多肽类似物,其中SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个的位置35处的缬氨酸残基被任意其它标准或非标准氨基酸取代;例如被独立地选自甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸和精氨酸的氨基酸残基取代;例如被赖氨酸取代。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽或多肽类似物,其中SEQ ID NO:23至SEQ ID NO:24中任一个的位置50处的亮氨酸残基被任意其它标准或非标准氨基酸取代,例如被独立地选自甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸和精氨酸的氨基酸残基取代。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽或多肽类似物,选自以下:

AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KS (SEQ ID NO:25)、

AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSS (SEQ ID NO:26)、

AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSK (SEQ ID NO:27)、

AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKG (SEQ ID NO:28)、

AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGG (SEQ ID NO:29)、

AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGP (SEQ ID NO:30)、

AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPG (SEQ ID NO:31)、

AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGS (SEQ ID NO:32)、

AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSA (SEQ ID NO:33)、

AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSAX<sub>4</sub> (SEQ ID NO:34)、

AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSAX<sub>4</sub>S (SEQ ID NO:35)、  
AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSAX<sub>4</sub>SP (SEQ ID NO:36)、  
AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSAX<sub>4</sub>SPY (SEQ ID NO:37)、  
AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSAX<sub>4</sub>SPYP (SEQ ID NO:38)、  
AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSAX<sub>4</sub>SPYPT (SEQ ID NO:39)、  
AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSAX<sub>4</sub>SPYPTF (SEQ ID NO:40)、  
AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSAX<sub>4</sub>SPYPTFN (SEQ ID NO:41)、  
AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSAX<sub>4</sub>SPYPTFNP (SEQ ID NO:42)、  
AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSAX<sub>4</sub>SPYPTFNPS (SEQ ID NO:43)、  
AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSAX<sub>4</sub>SPYPTFNPS D (SEQ ID NO:44)、  
AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSAX<sub>4</sub>SPYPTFNPS DVAAX<sub>5</sub>H (SEQ ID NO:45)、  
AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSAX<sub>4</sub>SPYPTFNPS DVAAX<sub>5</sub>HK (SEQ ID NO:46) 和  
AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSAX<sub>4</sub>SPYPTFNPS DVAAX<sub>5</sub>HKA (SEQ ID NO:47),  
其中X<sub>1</sub>选自丙氨酸、亮氨酸、天冬氨酸、甲硫氨酸、谷氨酸、异亮氨酸和精氨酸,  
其中X<sub>2</sub>选自缬氨酸、亮氨酸、天冬氨酸、甲硫氨酸、谷氨酸、异亮氨酸和赖氨酸,  
其中X<sub>3</sub>选自缬氨酸、甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸和精氨酸,优选亮氨酸,

其中X<sub>4</sub>选自缬氨酸、甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸和精氨酸,优选赖氨酸,并且

其中X<sub>5</sub>选自亮氨酸、甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸和精氨酸,

或具有一个或多个氨基酸取代的其功能变体,例如在除X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>和X<sub>5</sub>以外的任意位置上具有1、2、3、4或5个氨基酸取代。

17. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽或多肽类似物,选自以下:

AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKS (SEQ ID NO:48)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSS (SEQ ID NO:49)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSK (SEQ ID NO:50)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKG (SEQ ID NO:51)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGG (SEQ ID NO:52)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGP (SEQ ID NO:53)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPG (SEQ ID NO:54)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGS (SEQ ID NO:55)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSA (SEQ ID NO:56)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAV (SEQ ID NO:57)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVS (SEQ ID NO:58)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSP (SEQ ID NO:59)、

AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPY (SEQ ID NO:60)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPYP (SEQ ID NO:61)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPYPT (SEQ ID NO:62)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPYPTF (SEQ ID NO:63)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPYPTFN (SEQ ID NO:64)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPYPTFNP (SEQ ID NO:65)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPYPTFNPS (SEQ ID NO:66)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPYPTFNPSD (SEQ ID NO:67)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPYPTFNPSDDV AALH (SEQ ID NO:68)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPYPTFNPSDDV AALHK (SEQ ID NO:69) 和  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPYPTFNPSDDV AALHKA (SEQ ID NO:70),  
或其功能变体。

18. 根据权利要求17所述的多肽或多肽类似物,其中所述功能变体是选自SEQ ID NO:48至SEQ ID NO:70中任一个且具有一个或多个氨基酸取代,例如具有1、2、3、4或5个氨基酸取代的多肽。

19. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽或多肽类似物,选自以下:

AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSK (SEQ ID NO:50)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKG (SEQ ID NO:51)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGG (SEQ ID NO:52)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGP (SEQ ID NO:53)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPG (SEQ ID NO:54)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGS (SEQ ID NO:55)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSA (SEQ ID NO:56)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAV (SEQ ID NO:57)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVS (SEQ ID NO:58)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSP (SEQ ID NO:59) 和  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPY (SEQ ID NO:60),  
或其功能变体。

20. 根据权利要求19所述的多肽或多肽类似物,其中所述功能变体是选自SEQ ID NO:50至SEQ ID NO:60中任一个且具有一个或多个氨基酸取代,例如具有1、2、3、4或5个氨基酸取代的多肽。

21. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽或多肽类似物,选自以下:

AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSK (SEQ ID NO:50)、  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGS (SEQ ID NO:55) 和  
AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPY (SEQ ID NO:60),  
或其功能变体。

22. 根据权利要求21所述的多肽或多肽类似物,其中所述功能变体是选自SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:60中任一个且具有一个或多个氨基酸取代,例如具有1、2、3、4或5个氨基酸取代的多肽。

23. 根据权利要求17-22中任一项所述的多肽或多肽类似物,其中所述功能变体是选自SEQ ID NO:48至SEQ ID NO:70中任一个且具有一个氨基酸取代的多肽,例如选自SEQ ID NO:50至SEQ ID NO:60中任一个且具有一个氨基酸取代的多肽,例如选自SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:60中任一个且具有一个氨基酸取代的多肽。

24. 根据权利要求17-22中任一项所述的多肽或多肽类似物,其中所述功能变体是选自SEQ ID NO:48至SEQ ID NO:70中任一个且具有两个氨基酸取代的多肽,例如选自SEQ ID NO:50至SEQ ID NO:60中任一个且具有两个氨基酸取代的多肽,例如选自SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:60中任一个且具有两个氨基酸取代的多肽。

25. 根据权利要求17-22中任一项所述的多肽或多肽类似物,其中所述功能变体是选自SEQ ID NO:48至SEQ ID NO:70中任一个且具有三个氨基酸取代的多肽,例如选自SEQ ID NO:50至SEQ ID NO:60中任一个且具有三个氨基酸取代的多肽,例如选自SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:60中任一个且具有三个氨基酸取代的多肽。

26. 根据权利要求17-22中任一项所述的多肽或多肽类似物,其中所述功能变体是选自SEQ ID NO:48至SEQ ID NO:70中任一个且具有四个氨基酸取代的多肽,例如选自SEQ ID NO:50至SEQ ID NO:60中任一个且具有四个氨基酸取代的多肽,例如选自SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:60中任一个且具有四个氨基酸取代的多肽。

27. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽或多肽类似物,其中所述一个或多个氨基酸取代是保守氨基酸取代。

28. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽或多肽类似物,其中所述多肽或多肽类似物被乙酰化。

29. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽或多肽类似物,其中N端氨基酸残基被乙酰化( $\text{COCH}_3$ 或 $\text{Ac}^-$ )。

30. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽或多肽类似物,其中C端氨基酸残基被酰胺化( $-\text{NH}_2$ )。

31. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽或多肽类似物,其中所述多肽或其功能变体

a. 结合一种或多种甲酰肽受体,包括甲酰肽受体1 (FPR1)、甲酰肽受体2 (FPR2) 和甲酰肽受体3 (FPR3),和/或

b. 激活和/或刺激一种或多种甲酰肽受体,包括甲酰肽受体1 (FPR1)、甲酰肽受体2 (FPR2) 和甲酰肽受体3 (FPR3),和/或

c. 是一种或多种甲酰肽受体的配体和/或激动剂,包括甲酰肽受体1 (FPR1)、甲酰肽受体2 (FPR2) 和甲酰肽受体3 (FPR3),和/或

d. 结合、激活FPR2和/或是FPR2的激动剂,和/或

e. 激活免疫细胞,和/或

f. 激活白细胞,例如吞噬性白细胞,例如单核细胞,和/或

g. 激活白细胞,例如多形核白细胞 (PMN),例如中性粒细胞,和/或

h. 激活中性粒细胞和/或单核细胞,和/或

i. 激活白细胞的效应功能,例如诱导中性粒细胞趋化作用、动员中性粒细胞补体受体3 (CR3) 和激活中性粒细胞NADPH-氧化酶中的一种或多种,和/或

j. 诱导白细胞如吞噬性白细胞、如单核细胞的吞噬作用,和/或

k. 诱导白细胞如多形核白细胞(PMN)、如中性粒细胞的趋化作用。

32. 一种多肽缀合物,其包含前述权利要求中任一项所述的多肽或多肽类似物以及一个或多个分支氨基酸探针,其中所述分支氨基酸探针包含第一氨基烷基氨基酸残基,

所述第一氨基烷基氨基酸残基任选地共价连接至第二氨基烷基氨基酸残基,或共价连接至第二和第三氨基烷基氨基酸残基,以形成2或3个氨基烷基氨基酸残基的线性链,

其中,所述第一、第二和/或第三氨基烷基氨基酸残基中的一个或多个的侧链均通过将独立地选自以下的分子连接至侧链氨基来修饰:AAAq-AAA、(aa<sub>3</sub>)<sub>p</sub>-AAAq、AAAq-(aa<sub>3</sub>)<sub>p</sub>、[(aa<sub>3</sub>)-AAA]<sub>p</sub>和[AAA-(aa<sub>3</sub>)]<sub>p</sub>,

其中q是选自0、1、2和3的数字,p是选自1、2和3的数字,AAA是氨基烷基氨基酸残基,并且(aa<sub>3</sub>)是独立地选自Arg、His、Gly和Ala的氨基酸残基,

其中所述第一氨基烷基氨基酸残基与所述多肽的N端共价连接、与所述多肽的C端共价连接、和/或与所述多肽内的氨基烷基氨基酸残基的侧链氨基共价连接,

条件是所述分支氨基酸探针由2至9个氨基酸残基组成。

33. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽缀合物,其中所述氨基烷基氨基酸残基单独地选自赖氨酸和鸟氨酸。

34. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽缀合物,其中所述多肽或多肽类似物的N端氨基酸残基在α氨基处被乙酰化。

35. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽缀合物,其中与所述侧链氨基共价连接的分子独立地选自以下:Lys<sub>q</sub>-Lys、(aa<sub>3</sub>)<sub>p</sub>-Lys<sub>q</sub>、Lys<sub>q</sub>-(aa<sub>3</sub>)<sub>p</sub>、[(aa<sub>3</sub>)-Lys]<sub>p</sub>、[Lys-(aa<sub>3</sub>)]<sub>p</sub>、Orn<sub>q</sub>-Orn、(aa<sub>3</sub>)<sub>p</sub>-Orn<sub>q</sub>、Orn<sub>q</sub>-(aa<sub>3</sub>)<sub>p</sub>、[(aa<sub>3</sub>)-Orn]<sub>p</sub>和[Orn-(aa<sub>3</sub>)]<sub>p</sub>、Orn<sub>p</sub>-Lys<sub>p</sub>、Lys<sub>p</sub>-Orn<sub>p</sub>、[Orn-Lys]<sub>p</sub>和[Lys-Orn]<sub>p</sub>,其中q是选自0、1、2和3的数字,p是选自1、2和3的数字,(aa<sub>3</sub>)是独立地选自Arg、His、Gly和Ala的氨基酸残基,并且N端Lys、Orn或(aa<sub>3</sub>)氨基酸残基任选地在α氨基处被乙酰化。

36. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽缀合物,其中与所述侧链氨基共价连接的分子独立地选自Lys<sub>q</sub>-Lys、Orn<sub>q</sub>-Orn、Orn<sub>p</sub>-Lys<sub>p</sub>、Lys<sub>p</sub>-Orn<sub>p</sub>、[Orn-Lys]<sub>p</sub>和[Lys-Orn]<sub>p</sub>,其中q是选自0、1、2和3的数字,p是选自1、2和3的数字,并且N端Lys或Orn氨基酸残基任选地在α氨基处被乙酰化。

37. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽缀合物,其中所述氨基烷基氨基酸残基是赖氨酸残基。

38. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽缀合物,其中与所述侧链氨基共价连接的分子独立地选自Lys<sub>q</sub>-Lys、(aa<sub>3</sub>)<sub>p</sub>-Lys<sub>q</sub>、Lys<sub>q</sub>-(aa<sub>3</sub>)<sub>p</sub>、[(aa<sub>3</sub>)-Lys]<sub>p</sub>和[Lys-(aa<sub>3</sub>)]<sub>p</sub>,并且N端Lys或(aa<sub>3</sub>)残基任选地在α氨基处被乙酰化。

39. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽或多肽类似物,其中与所述侧链氨基共价连接的分子是Lys<sub>q</sub>-Lys,其中q是选自0、1、2和3的数字,并且N端Lys残基任选地在α氨基处被乙酰化。

40. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽缀合物,其中所述分支氨基酸探针由2个氨基酸残基、3个氨基酸残基、4个氨基酸残基、5个氨基酸残基或6个氨基酸残基组成。

41. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽缀合物,其中所述分支氨基酸探针由3个氨

基酸残基组成。

42. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽缀合物, 其中与所述侧链氨基共价连接的分子独立地选自以下: Lys、Ac-Lys、Lys-Lys、Ac-Lys-Lys、Lys-Lys-Lys、Ac-Lys-Lys-Lys、Lys-Lys-Lys-Lys、Ac-Lys-Lys-Lys-Lys、Lys-Lys-Lys-Lys-Lys、Ac-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys、Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys、Lys-Gly-Lys、Ac-Lys-Gly-Lys、Lys-Lys-Gly、Ac-Lys-Lys-Gly、Lys-Gly、Ac-Lys-Gly、Lys-Ala-Lys、Ac-Lys-Ala-Lys、Lys-Lys-Ala、Ac-Lys-Lys-Ala、Lys-Ala、Ac-Lys-Ala、Lys-His-Lys、Ac-Lys-His-Lys、Lys-Lys-His、Ac-Lys-Lys-His、Lys-His、Ac-Lys-His、Lys-Arg-Lys、Ac-Lys-Arg-Lys、Lys-Lys-Arg、Ac-Lys-Lys-Arg、Lys-Arg和Ac-Lys-Arg。

43. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽缀合物, 其中所述分支氨基酸探针选自以下:

a. (Lys) Lys<sub>1</sub>-、(Lys-Lys) Lys<sub>1</sub>-、(Lys-Lys-Lys) Lys<sub>1</sub>-、(Lys-Lys-Lys-Lys) Lys<sub>1</sub>-、(Lys-Gly-Lys) Lys<sub>1</sub>-、(Lys-Lys-Gly) Lys<sub>1</sub>-、(Lys-Gly) Lys<sub>1</sub>-、(Lys-Ala-Lys) Lys<sub>1</sub>-、(Lys-Lys-Ala) Lys<sub>1</sub>-、(Lys-Ala) Lys<sub>1</sub>-、(Lys-His-Lys) Lys<sub>1</sub>-、(Lys-Lys-His) Lys<sub>1</sub>-、(Lys-His) Lys<sub>1</sub>-、(Lys-Arg-Lys) Lys<sub>1</sub>-、(Lys-Lys-Arg) Lys<sub>1</sub>-和(Lys-Arg) Lys<sub>1</sub>- , 其中所述第一赖氨酸残基(Lys<sub>1</sub>-) 任选地在N端乙酰化或C端酰胺化;

b. Ac-(Ac-Lys) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Lys) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Lys-Lys) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Lys-Lys-Lys) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Gly-Lys) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Lys-Gly) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Gly) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Ala-Lys) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Lys-Ala) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Ala) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-His-Lys) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Lys-His) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-His) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Arg-Lys) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Lys-Arg) Lys<sub>1</sub>-和Ac-(Ac-Lys-Arg) Lys<sub>1</sub>-;

c. (Ac-Lys) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>、(Ac-Lys-Lys) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>、(Ac-Lys-Lys-Lys) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>、(Ac-Lys-Lys-Lys-Lys) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>、(Ac-Lys-Gly-Lys) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>、(Ac-Lys-Lys-Gly) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>、(Ac-Lys-Gly) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>、(Ac-Lys-Ala-Lys) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>、(Ac-Lys-Lys-Ala) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>、(Ac-Lys-Ala) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>、(Ac-Lys-His-Lys) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>、(Ac-Lys-Lys-His) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>、(Ac-Lys-His) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>、(Ac-Lys-Arg-Lys) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>、(Ac-Lys-Lys-Arg) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>和(Ac-Lys-Arg) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>;

d. Ac-(Ac-Lys) Lys-Lys-、(Ac-Lys) Lys-Lys-、Ac-(Lys) Lys-Lys-、(Lys) Lys-Lys-、(Ac-Lys) Lys-Lys-NH<sub>2</sub>、(Lys) Lys-Lys-NH<sub>2</sub>;

e. Ac-Lys-(Ac-Lys) Lys-、Lys-(Ac-Lys) Lys-、Ac-Lys-(Lys) Lys-、Lys-(Lys) Lys-、Lys-(Ac-Lys) Lys-NH<sub>2</sub>、Lys-(Lys) Lys-NH<sub>2</sub>; 和

f. Ac-(Ac-Lys-Lys)-Lys-、(Ac-Lys-Lys)-Lys-、Ac-(Lys-Lys)-Lys-和(Lys-Lys)-Lys-、(Ac-Lys-Lys)-Lys-NH<sub>2</sub>和(Lys-Lys)-Lys-NH<sub>2</sub>。

44. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽缀合物, 其中所述分支氨基酸探针选自Ac-(Ac-Lys) Lys-、Ac-(Lys) Lys-、(Ac-Lys) Lys-NH<sub>2</sub>、(Lys) Lys-NH<sub>2</sub>和(Lys) Lys-。

45. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽缀合物, 其中所述第一氨基烷基氨基酸残基与所述多肽或多肽类似物的N端共价连接。

46. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽缀合物, 其中所述第一氨基烷基氨基酸残基与所述多肽或多肽类似物内的赖氨酸或鸟氨酸残基的侧链氨基共价连接。

47. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽缀合物, 其中所述第一氨基烷基氨基酸残

基与所述多肽或多肽类似物的C端共价连接。

48. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽缀合物,其包含1个分支氨基酸探针。

49. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽缀合物,其包含2个分支氨基酸探针。

50. 一种药物组合物,其包含前述权利要求中任一项所述的多肽或多肽类似物或多肽缀合物。

51. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽或多肽类似物或多肽缀合物,用作药物。

52. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽或多肽类似物或多肽缀合物,用于治疗缺血性病况和/或炎性病况。

53. 根据前述权利要求中任一项所述用途的多肽或多肽类似物或多肽缀合物,其中所述治疗是预防性的、改善性的或治愈性的。

54. 根据前述权利要求中任一项所述用途的多肽或多肽类似物或多肽缀合物,其中所述病况是急性、亚急性或慢性的。

55. 根据前述权利要求中任一项所述用途的多肽或多肽类似物或多肽缀合物,其中所述缺血性和/或炎性病况在哺乳动物例如人的一个或多个器官的组织中。

56. 根据前述权利要求中任一项所述用途的多肽或多肽类似物或多肽缀合物,其中所述器官选自肾、肝、脑、心脏、肌肉、骨髓、皮肤、骨骼、肺、呼吸道、脾、外分泌腺、膀胱、内分泌腺、生殖器官包括阴茎管、眼睛、耳朵、血管系统、胃肠道包括小肠、结肠、直肠、肛管和前列腺。

57. 根据前述权利要求中任一项所述用途的多肽或多肽类似物或多肽缀合物,其中所述缺血性病况是继发性缺血。

58. 根据前述权利要求中任一项所述用途的多肽或多肽类似物或多肽缀合物,其中所述缺血是由于卒中、损伤、脓毒性休克、全身性低血压、心脏病发作导致的心脏骤停、心律失常、动脉粥样硬化疾病伴随血栓形成、心脏或任意器官血管的栓塞、血管痉挛、主动脉瘤或其他器官的动脉瘤、冠状动脉狭窄、心肌梗塞、心绞痛、心包炎、心肌炎、粘液血症或心内膜炎引起的。

59. 根据前述权利要求中任一项所述用途的多肽或多肽类似物或多肽缀合物,其中所述缺血性和/或炎性病况与手术例如大型手术相关;或与器官移植例如实体器官移植相关。

60. 根据前述权利要求中任一项所述用途的多肽或多肽类似物或多肽缀合物,其中所述缺血性和/或炎性病况选自术后全身炎症反应综合征(SIRS)和术后器官功能障碍;例如术后肾衰竭,包括急性肾损伤(AKI)、肾毒性和/或慢性肾衰竭(CRF)。

61. 根据前述权利要求中任一项所述用途的多肽或多肽类似物或多肽缀合物,其中所述缺血性和/或炎性病况是再灌注损伤。

62. 根据前述权利要求中任一项所述用途的多肽或多肽类似物或多肽缀合物,其中所述炎性疾病选自关节病(关节疾病)、类风湿性关节炎(RA)、痛风、胃肠系统炎性疾病和多发性硬化症。

63. 根据前述权利要求中任一项所述用途的多肽或多肽类似物或多肽缀合物,其中所述炎性病况或疾病是肝脏炎症,例如非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。

## 膜联蛋白A1衍生的多肽类似物

### 技术领域

[0001] 本公开涉及衍生自膜联蛋白A1的多肽和多肽类似物以及包含所述多肽或多肽类似物的组合物,用于治疗炎性和缺血性病症。

### [0002] 发明背景

[0003] 膜联蛋白超家族由13种具有显著生物学和结构同源性的钙磷脂结合蛋白组成。膜联蛋白在结构上分为高度保守的核心结构域和可变的N-末端结构域。膜联蛋白A1 (ANXA1, 37kDa-SEQ ID NO:1) 是一种抑制血源性多形核白细胞 (PMN) 向周围组织外渗的抗炎蛋白。所述蛋白与N-甲酰肽受体 (FPR) 2或FPR-L1受体结合,并由此启动一系列信号传导事件。在炎性刺激后,血源性多形核白细胞 (PMN) 迁移到周围组织中。PMN的迁移或外渗受介体如粘附分子、细胞因子和蛋白酶的调节,这些介体控制促炎和抗炎过程。PMN的破坏性潜力很高,并且可能会损害自身。因此,控制PMN外渗和炎性应答很重要。

[0004] 对于作为抗炎剂的治疗目的,完整的膜联蛋白A1蛋白相对于其功能片段或修饰形式具有许多缺点。所述蛋白的大尺寸使其更难通过可用于较小多肽的技术进行递送 (例如透皮或透粘膜)。对于用于治疗眼部炎症,预期较小的分子能够更好地穿透角膜上皮。此外,对蛋白水解降解的敏感性是对于所有肽类药物来说特别关注的问题,尤其是大的肽,并且尤其是在考虑 (许多患者优选的) 口服递送的情况下。

[0005] 一些在多肽N-末端侧缺乏重要区域的膜联蛋白A1衍生物已被证明在一些炎性和介体释放测定中缺乏显著活性,而全长的N-末端N-乙酰基膜联蛋白A1 (2-26) 在多种系统下都被认为具有生物活性。许多主要衍生自膜联蛋白A1蛋白的独特N-末端部分的肽已被证明具有抗炎特性。研究最广泛的膜联蛋白A1肽之一是肽Ac2-26,它模拟54个氨基酸的N-末端区域的第2至第26个氨基酸。与Ac 1-188片段 (和天然蛋白) 一样,它具有N-末端乙酰化以增加其稳定性,并可能增加其半衰期。已经表明,膜联蛋白A1及其N-末端肽 (Ac2-26) 通过FPR2/脂氧素A4 (FPR2/A1x) 受体而发挥其大部分抗炎作用。在体内,已表明Ac2-26肽在心肌缺血再灌注 (I/R)、肠系膜I/R、糖原腹膜炎和IL1气囊模型中发挥抗炎作用,据报道可显著减少中性粒细胞向损伤/炎性部位的募集。这种肽的抗炎特性并不局限于急性炎症模型。在关节炎模型中,关节内施用Ac2-26肽显示可通过减少中性粒细胞募集来减轻疾病严重程度。

[0006] Ac2-26肽的较短版本,如肽Ac2-12和Ac2-6,也已显示在急性炎症模型中发挥一定程度的抗炎作用。已经公开了具有抗炎作用的较长多肽,例如对应于氨基酸残基2-48和11-48的多肽 (WO 2012/174397)。许多实验室开展的工作表明,衍生自完全独立于膜联蛋白A1蛋白N-末端的区域的肽,更具体地说是氨基酸247-253 (位于蛋白核心区域的第三重复中,称为抗炎素-2 (AF2)),也具有抗炎特性。

### [0007] 发明概述

[0008] 本公开涉及膜联蛋白A1多肽类似物、包含膜联蛋白A1多肽和分支氨基酸探针 (BAP) 的缀合物、以及包含膜联蛋白A1多肽类似物或其缀合物的组合物,用于治疗缺血性和/或炎性病症。

[0009] 本公开的一个方面涉及至少包含序列AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKS (SEQ ID NO: 2)的多肽或多肽类似物,或其功能变体,其中所述多肽由选自SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24的多肽或其功能变体组成。

[0010] 本公开的另一个方面涉及包含所述多肽或多肽类似物和一个或多个分支氨基酸探针的多肽缀合物。

[0011] 本公开的另一个方面涉及包含所述多肽或多肽类似物的药物组合物。

[0012] 本公开的另一方面涉及多肽或多肽类似物用于治疗缺血性病况和/或炎性病况。

## 附图说明

[0013] 图1:从人血中分离的单核细胞的体外吞噬作用。结果表示为四次实验的平均值±SEM,每次实验使用来自不同健康志愿者的单核细胞。数据显示,化合物1 (AnxA1 2-29 (V24L))、化合物2 (AnxA1 2-34 (V24L))和化合物3 (AnxA1 2-39 (V24L))诱导的吞噬作用的程度高于AnxA1 2-50 (与媒介物相比增加2.5至3倍)。详情见实施例1。

[0014] 图2:多形核白细胞 (PMN) 的体外趋化反应。数据显示,与媒介物相比,化合物1、2和3提高了PMN趋化性 (增加1.6至3倍)。详情见实施例2。

[0015] 发明详述

[0016] 本公开涉及膜联蛋白A1的多肽类似物、所述多肽类似物的缀合形式以及包含膜联蛋白A1的多肽类似物或其缀合形式的组合物。所公开的多肽类似物、缀合物和组合物对于治疗缺血性和炎性病况特别有效。

[0017] 全长膜联蛋白A1 (智人) 具有以下序列:

[0018] >sp|P04083|ANXA1\_人膜联蛋白A1 OS=Homo sapiens GN=ANXA1PE=1SV=2

[0019] MAMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVSPYPTFNPSSDVAALHKAIMVKGVD EATIIDI  
LTKRNNAQRQQIKAAYLQETGKPLDETLKKALTGHLEEVVLALLKTPAQFDADELRAAMKGLGTDEDTLIEILASR  
TNKEIRDINRVYREELKRD LAKDITSDTSGDFRNALLSLAKGRSEDFGVNEDLADSDARALYEAGERRKGT DVNV  
FNTILTTRSYPQLRRVFQKYTKYSKHDMNKVLDLELKGDI EKCLTAIVKCATSKPAFFAEKLHQAMKGVGTRHKAL  
IRIMVSRSEIDMNDIKAFYQKMYGISLCQAILDETKGDYEKILVALCGGN (SEQ ID NO:1)。

[0020] 第一方面是提供至少包含序列AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKS (SEQ ID NO:2)的多肽或多肽类似物,或其功能变体,其中所述多肽由选自以下组的多肽组成:

[0021] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKS (SEQ ID NO:2)

[0022] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSS (SEQ ID NO:3)

[0023] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSK (SEQ ID NO:4)

[0024] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKG (SEQ ID NO:5)

[0025] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGG (SEQ ID NO:6)

[0026] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGP (SEQ ID NO:7)

[0027] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPG (SEQ ID NO:8)

[0028] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGS (SEQ ID NO:9)

[0029] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSA (SEQ ID NO:10)

[0030] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAV (SEQ ID NO:11)

[0031] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVS (SEQ ID NO:12)

- [0032] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVSP (SEQ ID NO:13)
- [0033] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVSPY (SEQ ID NO:14)
- [0034] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVSPYP (SEQ ID NO:15)
- [0035] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVSPYPT (SEQ ID NO:16)
- [0036] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVSPYPTF (SEQ ID NO:17)
- [0037] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVSPYPTFN (SEQ ID NO:18)
- [0038] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVSPYPTFNP (SEQ ID NO:19)
- [0039] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVSPYPTFNPS (SEQ ID NO:20)
- [0040] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVSPYPTFNPSSD (SEQ ID NO:21)
- [0041] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVSPYPTFNPSSDVAALH (SEQ ID NO:22)
- [0042] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVSPYPTFNPSSDVAALHK (SEQ ID NO:23)
- [0043] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVSPYPTFNPSSDV AALHKA (SEQ ID NO:24) ,
- [0044] 或其功能变体。
- [0045] 本文还提供了选自SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24的多肽,或其功能变体。
- [0046] 在优选的实施方案中,功能变体不包括所公开的多肽或多肽类似物的功能片段。优选地,本发明的多肽或多肽类似物具有由SEQ ID NO显示的长度(即连续氨基酸的数量)。
- [0047] 本文还公开了至少包含序列AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKS (SEQ ID NO:2)的多肽或多肽类似物或其功能变体的功能变体,其中所述多肽由选自SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个的多肽的功能变体组成。
- [0048] 在一个实施方案中,本文定义的多肽或多肽类似物(包括其功能变体)激活和/或刺激甲酰肽受体1 (FPR1)、甲酰肽受体2 (FPR2) 和甲酰肽受体3 (FPR3) 中的一种或多种。
- [0049] 在一个实施方案中,本文定义的功能性多肽是甲酰肽受体1 (FPR1)、甲酰肽受体2 (FPR2) 和甲酰肽受体3 (FPR3) 中的一种或多种的配体和/或激动剂。
- [0050] 本文中的术语“激动剂”是指本文定义的多肽,其能够结合或在某些实施方案中能够至少在在一定程度上结合和/或激活受体,或在某些实施方案中至少在在一定程度上激活受体。例如,FPR2激动剂因此能够结合和/或激活FPR2。
- [0051] 激动剂可以是多种不同类型受体的激动剂,从而能够结合和/或激活多种不同类型的受体。所述激动剂也可以是选择性激动剂,其仅结合和激活一种类型的受体。本文中的术语“拮抗剂”是指能够抑制受体激动剂作用的物质。
- [0052] 完全激动剂结合(具有亲和力)并激活受体,对该受体表现出完全功效。本文中的“部分激动剂”是指能够结合并激活特定受体但相对于完全激动剂仅对受体具有部分功效的肽。部分激动剂在与完全激动剂竞争占有受体时可充当拮抗剂,并且与单独使用完全激动剂时观察到的效果或激活相比,导致受体激活的净减少。
- [0053] 本文中的“选择性激动剂”是指具有选择性并因此主要结合并激活一种类型的受体的化合物。因此,选择性FPR2激动剂对FPR2具有选择性。
- [0054] 在一个实施方案中,本公开的多肽或多肽类似物能够结合并在一定程度上激活一种或多种甲酰肽受体,并且可以对不同受体具有不同的结合亲和力和/或不同的受体激活功效。亲和力是指肽配体与其受体之间的分子间力的数量和大小,以及配体在其受体结合位点处的停留时间;受体激活功效是指肽配体在结合靶受体后产生生物反应的能力以及该

反应的定量量度。在一些实施方案中,亲和力和受体激活功效的这种差异是通过本领域常规的受体结合/激活研究来确定的,例如通过生成关于刺激表达本文所述一种或多种类型受体的细胞中或表达不同类型受体的组织上的配体结合的 $EC_{50}$ 和 $E_{max}$ 值。高亲和力意味着与具有较低亲和力的配体肽相比,需要较低浓度的配体即可获得50%的受体结合;高受体激活功效意味着与具有较低亲和力和/或受体活性功效(较高 $EC_{50}$ 值)的肽相比,需要较低浓度的肽即可获得50%的受体激活反应(低 $EC_{50}$ 值)。

[0055] 在一个实施方案中,多肽可以对选自FPR1、FPR2和FPR3中的两种或更多种受体具有不同的亲和力和/或受体激活功效。

[0056] 多肽激动剂的受体激活效力也可以用 $p(A_{50})$ 值来测定,这是确定激动剂的受体激活功效的常规方法。

[0057] 在特定的实施方案中,功能性多肽对甲酰肽受体2 (FPR2) 具有结合亲和力和/或受体功效。这可以使用常规方法进行测试,或按照实施例概述的方法进行测试。

[0058] 在一个特定的实施方案中,多肽能够结合并激活FPR2。在另一个实施方案中,所述肽是FPR2的完全激动剂。

[0059] 在一个实施方案中,提供了至少包含序列AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKS (SEQ ID NO:2) 的多肽或多肽类似物,或其功能变体,其中所述多肽由选自SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个的多肽或其功能变体组成,能够进行以下一项或多项:

[0060] a) 结合一种或多种甲酰肽受体,包括FPR1、FPR2和FPR3,和/或

[0061] b) 激活和/或刺激一种或多种甲酰肽受体,包括FPR1、FPR2和FPR3,和/或

[0062] c) 结合和/或激活FPR2,和/或

[0063] d) 激活免疫细胞,和/或

[0064] e) 激活白细胞,例如吞噬性白细胞,例如单核细胞

[0065] f) 激活白细胞,例如多形核白细胞(PMN),例如中性粒细胞,和/或

[0066] g) 激活中性粒细胞和/或单核细胞,和/或

[0067] h) 激活白细胞的效应功能,例如诱导中性粒细胞趋化作用、动员中性粒细胞补体受体3(CR3)和激活中性粒细胞NADPH-氧化酶中的一种或多种,和/或

[0068] i) 诱导白细胞(例如吞噬性白细胞,例如单核细胞)的吞噬作用,和/或

[0069] j) 诱导白细胞(例如多形核白细胞(PMN),例如中性粒细胞)的趋化作用。

[0070] 本文定义的多肽的变体原则上能够在一个或多个位置处具有一个或多个取代。所公开序列中的单个氨基酸残基可被任意给定的蛋白生成性或非蛋白生成性氨基酸取代。

[0071] 在本公开的一个实施方案中,由选自SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个的多肽组成的多肽的功能变体与SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一者具有至少75%序列同一性,例如与SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一者具有至少80%序列同一性,例如至少85%序列同一性,例如至少90%序列同一性,例如至少95%序列同一性。

[0072] 在本公开的一个实施方案中,本文定义的多肽的功能变体是选自SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个且具有一个或多个氨基酸取代的多肽。一个氨基酸取代表示原始序列和变体序列之间的氨基酸在一个位置上不同。

[0073] 在本公开的一个实施方案中,本文定义的多肽的功能变体是选自SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个且具有一个氨基酸取代的多肽。

[0074] 在本公开的一个实施方案中,本文定义的多肽的功能变体是选自SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个且具有两个氨基酸取代的多肽。

[0075] 在本公开的一个实施方案中,本文定义的多肽的功能变体是选自SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个且具有三个氨基酸取代的多肽。

[0076] 在本公开的一个实施方案中,本文定义的多肽的功能变体是选自SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个且具有四个氨基酸取代的多肽。

[0077] 在本公开的一个实施方案中,本文定义的多肽的功能变体是选自SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个且具有五个氨基酸取代的多肽。

[0078] 在一个实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代是保守性氨基酸取代。在一个实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代是非保守性氨基酸取代。

[0079] 遗传编码是指天然引入到多肽中(蛋白生成性)的20种标准氨基酸Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Tyr、Thr、Trp、Val,以及2种通过独特合成机制引入到蛋白中的氨基酸:Sec(硒代半胱氨酸,或U)和Pyl(吡咯赖氨酸,O)。这些都是L-立体异构体。

[0080] 除了22种标准或天然氨基酸外,还有许多其他非天然存在的氨基酸(非蛋白生成性或非标准的氨基酸)。它们要么不存在于蛋白中,要么不能由标准细胞机制直接分离产生。非标准氨基酸通常是通过标准氨基酸进行修饰(例如翻译后修饰)而形成的。非天然氨基酸残基的例子有Abu、Aib、Nle(正亮氨酸)、DOrn(D-鸟氨酸,脱鸟苷酸化精氨酸)、Nal( $\beta$ -2-萘基-丙氨酸)、D-Nal( $\beta$ -2-萘基-D-丙氨酸)、DArg、DTrp、DPhe和DVal。

[0081] 本公开的任意氨基酸都可以是L-或D-构型。如果没有特别说明,则优选指L-异构体形式。

[0082] 术语“多肽”还包括本领域已知的通过化学或酶催化反应引入的翻译后修饰。如果需要,可以在分区(partitioning)之前引入此类翻译后修饰。此外,功能等效物可以包括化学修饰,例如泛素化、标记(例如,用放射性核素、各种酶等)、聚乙二醇化(用聚乙二醇衍生化)或插入氨基酸(或通过化学合成进行氨基酸取代),这些修饰通常不会发生在人蛋白中(例如鸟氨酸)。

[0083] 本文定义的具有N-端烷基化和C-端酯化的多肽也涵盖在本公开之内。功能等效物还包括由相同分子形成的糖基化的共价或聚集性缀合物,包括二聚体或不相关的化学部分。此类功能等效物是通过本领域已知的方法将功能性连接到包括在N-端和C-端中的任一处或两处的片段中发现的基团来制备的。

[0084] 在一个实施方案中,SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个的位置10处的丙氨酸残基被任意其他标准或非标准氨基酸取代。

[0085] 在一个实施方案中,SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个的位置10处的丙氨酸残基被独立地选自亮氨酸、天冬氨酸、甲硫氨酸、谷氨酸、异亮氨酸和精氨酸的氨基酸残基取代。

[0086] 在一个实施方案中,SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个的位置10处的残基不是丙氨酸;即,是除丙氨酸之外的任意氨基酸。

[0087] 在一个实施方案中,SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个的位置21处的缬氨酸残基被任意其他标准或非标准氨基酸取代。

[0088] 在一个实施方案中,SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个的位置21处的缬氨酸残基被独立地选自亮氨酸、天冬氨酸、甲硫氨酸、谷氨酸、异亮氨酸和赖氨酸的氨基酸残基取代。

[0089] 在一个实施方案中,SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个的位置21处的残基不是缬氨酸,即是除缬氨酸之外的任意氨基酸。

[0090] 在一个实施方案中,SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个的位置10处的丙氨酸残基和位置21处的缬氨酸残基均被独立地选自亮氨酸、天冬氨酸、甲硫氨酸、谷氨酸、异亮氨酸、精氨酸和赖氨酸的氨基酸残基取代;例如被独立地选自亮氨酸、天冬氨酸和甲硫氨酸的氨基酸残基取代;例如被亮氨酸取代。在一个实施方案中,SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个的残基10和残基21是相同的。

[0091] 在一个实施方案中,SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个的位置24处的缬氨酸残基被任意其他标准或非标准氨基酸取代。

[0092] 在一个实施方案中,SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个的位置24处的残基不是缬氨酸,即是除缬氨酸之外的任意氨基酸。

[0093] 在一个实施方案中,SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个的位置24处的缬氨酸残基被独立地选自甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸和精氨酸的氨基酸残基取代。

[0094] 在优选的实施方案中,SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个的位置24处的缬氨酸残基被亮氨酸取代。在一些实施方案中,Val24Leu突变增加了蛋白酶稳定性。

[0095] 在一个实施方案中,SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个的位置35处的缬氨酸残基被任意其他标准或非标准氨基酸取代。

[0096] 在一个实施方案中,SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个的位置35处的缬氨酸残基被独立地选自甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸和精氨酸的氨基酸残基取代。

[0097] 在一个实施方案中,SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个的位置35处的残基是赖氨酸。

[0098] 在一个实施方案中,SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个的位置35处的残基不是缬氨酸,即是除缬氨酸之外的任意氨基酸。

[0099] 在一个实施方案中,SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24中任一个的位置50处的亮氨酸残基被任意其他标准或非标准氨基酸取代。

[0100] 在一个实施方案中,SEQ ID NO:23至SEQ ID NO:24中任一个的位置50处的亮氨酸残基被独立地选自甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸和精氨酸的氨基酸残基取代。

[0101] 在一个实施方案中,SEQ ID NO:23至SEQ ID NO:24中任一个的位置50处的残基是除亮氨酸之外的任意氨基酸。

[0102] 在一个实施方案中,提供了选自以下的多肽:

- [0103] AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KS (SEQ ID NO:25) ,
- [0104] AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSS (SEQ ID NO:26) ,
- [0105] AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSK (SEQ ID NO:27) ,
- [0106] AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKG (SEQ ID NO:28) ,
- [0107] AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGG (SEQ ID NO:29) ,
- [0108] AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGP (SEQ ID NO:30) ,
- [0109] AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPG (SEQ ID NO:31) ,
- [0110] AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGS (SEQ ID NO:32) ,
- [0111] AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSA (SEQ ID NO:33) ,
- [0112] AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSAX<sub>4</sub> (SEQ ID NO:34) ,
- [0113] AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSAX<sub>4</sub>S (SEQ ID NO:35) ,
- [0114] AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSAX<sub>4</sub>SP (SEQ ID NO:36) ,
- [0115] AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSAX<sub>4</sub>SPY (SEQ ID NO:37) ,
- [0116] AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSAX<sub>4</sub>SPYP (SEQ ID NO:38) ,
- [0117] AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSAX<sub>4</sub>SPYPT (SEQ ID NO:39) ,
- [0118] AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSAX<sub>4</sub>SPYPTF (SEQ ID NO:40) ,
- [0119] AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSAX<sub>4</sub>SPYPTFN (SEQ ID NO:41) ,
- [0120] AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSAX<sub>4</sub>SPYPTFNP (SEQ ID NO:42) ,
- [0121] AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSAX<sub>4</sub>SPYPTFNPS (SEQ ID NO:43) ,
- [0122] AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSAX<sub>4</sub>SPYPTFNPS D (SEQ ID NO:44) ,
- [0123] AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSAX<sub>4</sub>SPYPTFNPS DVAAX<sub>5</sub>H (SEQ ID NO:45) ,
- [0124] AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSAX<sub>4</sub>SPYPTFNPS DVAAX<sub>5</sub>HK (SEQ ID NO:46) ,和
- [0125] AMVSEFLKQX<sub>1</sub>WFIENEEQEYX<sub>2</sub>QTX<sub>3</sub>KSSKGGPGSAX<sub>4</sub>SPYPTFNPS DVAAX<sub>5</sub>HKA (SEQ ID NO:47) ,
- [0126] 其中X<sub>1</sub>选自丙氨酸、亮氨酸、天冬氨酸、甲硫氨酸、谷氨酸、异亮氨酸和精氨酸,
- [0127] 其中X<sub>2</sub>选自缬氨酸、亮氨酸、天冬氨酸、甲硫氨酸、谷氨酸、异亮氨酸和赖氨酸。
- [0128] 其中X<sub>3</sub>选自缬氨酸、甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸和精氨酸;优选为亮氨酸,
- [0129] 其中X<sub>4</sub>选自缬氨酸、甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸和精氨酸;优选为赖氨酸,并且
- [0130] 其中X<sub>5</sub>选自亮氨酸、甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸和精氨酸,
- [0131] 或者具有一个或多个氨基酸取代的其功能变体,例如在除X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>和X<sub>5</sub>以外的任意位置处具有1、2、3、4或5个氨基酸取代。

- [0132] 在另一个实施方案中,提供了选自以下的多肽:
- [0133] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKS (SEQ ID NO:48),
- [0134] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSS (SEQ ID NO:49),
- [0135] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSK (SEQ ID NO:50),
- [0136] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKG (SEQ ID NO:51),
- [0137] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGG (SEQ ID NO:52),
- [0138] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGP (SEQ ID NO:53),
- [0139] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPG (SEQ ID NO:54),
- [0140] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGS (SEQ ID NO:55),
- [0141] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSA (SEQ ID NO:56),
- [0142] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAV (SEQ ID NO:57),
- [0143] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVS (SEQ ID NO:58),
- [0144] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSP (SEQ ID NO:59),
- [0145] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPY (SEQ ID NO:60),
- [0146] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPYP (SEQ ID NO:61),
- [0147] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPYPT (SEQ ID NO:62),
- [0148] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPYPTF (SEQ ID NO:63),
- [0149] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPYPTFN (SEQ ID NO:64),
- [0150] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPYPTFNP (SEQ ID NO:65),
- [0151] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPYPTFNPS (SEQ ID NO:66),
- [0152] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPYPTFNPSSD (SEQ ID NO:67),
- [0153] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPYPTFNPSSDV AALH (SEQ ID NO:68),
- [0154] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPYPTFNPSSDV AALHK (SEQ ID NO:69),
- 和
- [0155] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPYPTFNPSSDV AALHKA (SEQ ID NO:70),
- [0156] 或其功能变体。
- [0157] 在本公开的一个实施方案中,由选自SEQ ID NO:48至SEQ ID NO:70中任一个的多肽组成的多肽的功能变体与SEQ ID NO:48至SEQ ID NO:70中的任一个具有至少75%的序列同一性,例如与SEQ ID NO:48至SEQ ID NO:70中的任一个具有至少80%的序列同一性,例如至少85%的序列同一性,例如至少90%的序列同一性,例如至少95%的序列同一性。
- [0158] 在本公开的一个实施方案中,本文定义的多肽的功能变体是选自SEQ ID NO:48至SEQ ID NO:70中任一个并且具有一个或多个氨基酸取代的多肽。一个氨基酸取代表示原始序列和变体序列之间的氨基酸在一个位置处不同。
- [0159] 在本公开的一个实施方案中,本文定义的多肽的功能变体是选自SEQ ID NO:48至SEQ ID NO:70中任一个且具有一个氨基酸取代的多肽。
- [0160] 在本公开的一个实施方案中,本文定义的多肽的功能变体是选自SEQ ID NO:48至SEQ ID NO:70中任一个且具有两个氨基酸取代的多肽。
- [0161] 在本公开的一个实施方案中,本文定义的多肽的功能变体是选自SEQ ID NO:48至SEQ ID NO:70中任一个且具有三个氨基酸取代的多肽。

[0162] 在本公开的一个实施方案中,本文定义的多肽的功能变体是选自SEQ ID NO:48至SEQ ID NO:70中任一个且具有四个氨基酸取代的多肽。

[0163] 在本公开的一个实施方案中,本文定义的多肽的功能变体是选自SEQ ID NO:48至SEQ ID NO:70中任一个且具有五个氨基酸取代的多肽。

[0164] 在具体的实施方案中,提供了由选自以下的肽组成的多肽或多肽类似物:

[0165] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSK (SEQ ID NO:50),

[0166] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKG (SEQ ID NO:51),

[0167] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGG (SEQ ID NO:52),

[0168] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGP (SEQ ID NO:53),

[0169] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPG (SEQ ID NO:54),

[0170] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGS (SEQ ID NO:55),

[0171] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSA (SEQ ID NO:56),

[0172] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAV (SEQ ID NO:57),

[0173] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVS (SEQ ID NO:58),

[0174] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSP (SEQ ID NO:59), 和

[0175] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPY (SEQ ID NO:60),

[0176] 或其功能变体。

[0177] 在本公开的一个实施方案中,本文定义的多肽的功能变体是选自SEQ ID NO:50至SEQ ID NO:60中任一个且具有一个或多个氨基酸取代的多肽。一个氨基酸取代表示原始序列和变体序列之间的氨基酸在一个位置处不同。

[0178] 在本公开的一个实施方案中,本文定义的多肽的功能变体是选自SEQ ID NO:50至SEQ ID NO:60中任一个且具有一个氨基酸取代的多肽。

[0179] 在本公开的一个实施方案中,本文定义的多肽的功能变体是选自SEQ ID NO:50至SEQ ID NO:60中任一个且具有两个氨基酸取代的多肽。

[0180] 在本公开的一个实施方案中,本文定义的多肽的功能变体是选自SEQ ID NO:48至SEQ ID NO:70中任一个且具有三个氨基酸取代的多肽。

[0181] 在本公开的一个实施方案中,本文定义的多肽的功能变体是选自SEQ ID NO:50至SEQ ID NO:60中任一个且具有四个氨基酸取代的多肽。

[0182] 在本公开的一个实施方案中,本文定义的多肽的功能变体是选自SEQ ID NO:50至SEQ ID NO:60中任一个且具有五个氨基酸取代的多肽。

[0183] 在一个优选实施方案中,所述多肽或多肽类似物选自下组:

[0184] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSK (SEQ ID NO:50),

[0185] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGS (SEQ ID NO:55), 和

[0186] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPY (SEQ ID NO:60),

[0187] 或其功能变体。

[0188] 在本公开的一个实施方案中,本文定义的多肽的功能变体是选自SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:60中任一个且具有一个或多个氨基酸取代的多肽。一个氨基酸取代是指原始序列和变体序列之间的氨基酸在一个位置处不同。

[0189] 在本公开的一个实施方案中,本文定义的多肽的功能变体是选自SEQ ID NO:50、

SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:60中任一个且具有一个氨基酸取代的多肽。

[0190] 在本公开的一个实施方案中,本文定义的多肽的功能变体是选自SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:60中任一个且具有两个氨基酸取代的多肽。

[0191] 在本公开的一个实施方案中,本文定义的多肽的功能变体是选自SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:60中任一个且具有三个氨基酸取代的多肽。

[0192] 在本公开的一个实施方案中,本文定义的多肽的功能变体是选自SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:60中任一个且具有四个氨基酸取代的多肽。

[0193] 在本公开的一个实施方案中,本文定义的多肽的功能变体是选自SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:60中任一个且具有五个氨基酸取代的多肽。

[0194] 在一个实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代是保守性氨基酸取代。在一个实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代是非保守性氨基酸取代。

[0195] 在本公开的一个实施方案中,多肽或多肽类似物(包括本文定义的任意功能变体)被乙酰化。多肽主链或侧链中的任意合适残基都可以被乙酰化。在一个实施方案中,多肽在N端被乙酰化。

[0196] 在本公开的一个实施方案中,多肽或多肽类似物(包括本文定义的任意功能变体)在N端氨基酸残基(例如位置1,在一个实施方案中为丙氨酸)处被乙酰化( $\text{COCH}_3$ 或 $\text{Ac}^-$ )。

[0197] 在本公开的一个实施方案中,多肽或多肽类似物(包括本文定义的任意功能变体)在C端被酰胺化( $-\text{NH}_2$ )。

[0198] 在本公开的一个实施方案中,所述多肽、多肽类似物或其功能变体:

[0199] a. 与一种或多种甲酰肽受体结合,包括甲酰肽受体1 (FPR1)、甲酰肽受体2 (FPR2)和甲酰肽受体3 (FPR3),和/或

[0200] b. 激活和/或刺激一种或多种甲酰肽受体,包括甲酰肽受体1 (FPR1)、甲酰肽受体2 (FPR2)和甲酰肽受体3 (FPR3),和/或

[0201] c. 是一种或多种甲酰肽受体的配体和/或激动剂,包括甲酰肽受体1

[0202] (FPR1)、甲酰肽受体2 (FPR2)和甲酰肽受体3 (FPR3),和/或

[0203] d. 结合、激活FPR2和/或是FPR2的激动剂,和/或

[0204] e. 激活免疫细胞,和/或

[0205] f. 激活白细胞,例如吞噬性白细胞,例如单核细胞,和/或

[0206] g. 激活白细胞,例如多形核白细胞 (PMN),例如中性粒细胞,和/

[0207] 或

[0208] h. 激活中性粒细胞和/或单核细胞,和/或

[0209] i. 激活白细胞的效应功能,例如诱导中性粒细胞趋化作用、动员中性粒细胞补体受体3 (CR3)和激活中性粒细胞NADPH氧化酶中的一种或多种,和/或

[0210] j. 诱导白细胞(例如吞噬性白细胞,例如单核细胞)的吞噬作用,和/

[0211] 或

[0212] k. 诱导白细胞(例如多形核白细胞 (PMN),例如中性粒细胞)的趋化作用。

[0213] 分支氨基酸探针 (branched amino acid probe, BAP)

[0214] 本公开的另一个方面是提供本公开的多肽或多肽类似物,其通过添加一个或多个“分支氨基酸探针”进行修饰。分支氨基酸探针 (BAP) 公开于WO 2015/162485中。在一个实施

方案中,本公开的多肽或多肽类似物是包含所述多肽和一个或多个分支氨基酸探针的缀合物。

[0215] 在一些实施方案中,本文提供的多肽或多肽类似物缀合物与相应的天然或未缀合的多肽相比具有某些改进的特性。在一个实施方案中,本文提供的BAP缀合物具有增加的结合亲和力和/或对一种或多种相关受体(例如FPR)的激活。在另一个实施方案中,本文提供的BAP缀合物更稳定,例如对蛋白酶的敏感性更低。此外,在一个实施方案中,BAP缀合物具有更高的溶解度。

[0216] 一方面提供了多肽缀合物,其包含:

[0217] 至少包含序列AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKS (SEQ ID NO:2)的多肽或多肽类似物,或其功能变体,其中所述多肽由选自SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24的多肽或其功能变体组成,以及

[0218] 一个或多个分支氨基酸探针,其由2至9个氨基酸残基组成,,其中所述分支氨基酸探针的分支点由一个氨基酸残基的 $\epsilon$ -氨基与另一个氨基酸残基的羧基之间的酰胺键形成,其他所有键均为常规肽键,并且其中所述分支氨基酸探针的一个或多个 $\alpha$ 氨基任选地被乙酰化。

[0219] 再一方面提供了多肽缀合物,其包含:

[0220] 至少包含序列AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKS (SEQ ID NO:2)的多肽或多肽类似物,或其功能变体,其中所述多肽由选自SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24的多肽或其功能变体组成,

[0221] 以及一个或多个分支氨基酸探针,

[0222] 其中所述分支氨基酸探针包含第一氨基烷基氨基酸残基,

[0223] 所述第一氨基烷基氨基酸残基(AAA)任选地共价连接至第二氨基烷基氨基酸残基,或共价连接至第二和第三氨基烷基氨基酸残基,以形成2或3个氨基烷基氨基酸残基的线性链,

[0224] 其中,所述第一、第二和/或第三氨基烷基氨基酸残基中的一个或多个的侧链各自通过将独立地选自以下组的分子连接至侧链氨基进行修饰:AAAq-AAA、(aa3)<sub>p</sub>-AAAq、AAAq-(aa3)<sub>p</sub>、[(aa3)-AAA]<sub>p</sub>和[AAA-(aa3)]<sub>p</sub>,

[0225] 其中q是选自0、1、2和3的数字,p是选自1、2和3的数字,AAA是氨基烷基氨基酸残基,并且(aa3)是独立地选自Arg、His、Gly和Ala的氨基酸残基,

[0226] 其中所述第一氨基烷基氨基酸残基与所述多肽或多肽类似物的N端共价连接、与所述多肽或多肽类似物的C端共价连接、和/或与所述多肽或多肽类似物内的氨基烷基氨基酸残基的侧链氨基共价连接,

[0227] 条件是所述分支氨基酸探针由2至9个氨基酸残基组成。

[0228] 再一方面提供了多肽缀合物,其包含:

[0229] 选自SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25至SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48至SEQ ID NO:70的多肽,或其功能变体,以及

[0230] 一个或多个分支氨基酸探针,其由2至9个氨基酸残基组成,其中所述分支氨基酸探针的分支点由一个氨基酸残基的 $\epsilon$ -氨基与另一个氨基酸残基的羧基之间的酰胺键形成,其他所有键均为常规肽键,并且其中所述分支氨基酸探针的一个或多个 $\alpha$ 氨基任选地被乙

酰化。

[0231] 再一方面提供了多肽缀合物,其包含:

[0232] 选自SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25至SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48至SEQ ID NO:70的多肽或其功能变体,以及

[0233] 一个或多个分支氨基酸探针,

[0234] 其中所述分支氨基酸探针包含第一氨基烷基氨基酸残基,

[0235] 所述第一氨基烷基氨基酸残基(AAA)任选地共价连接至第二氨基烷基氨基酸残基,或共价连接至第二和第三氨基烷基氨基酸残基,以形成2或3个氨基烷基氨基酸残基的线性链,

[0236] 其中,所述第一、第二和/或第三氨基烷基氨基酸残基中的一个或多个的侧链各自通过将独立地选自以下组的分子连接至侧链氨基进行修饰:AAAq-AAA、(aa3)<sub>p</sub>-AAAq、AAAq-(aa3)<sub>p</sub>、[(aa3)-AAA]<sub>p</sub>和[AAA-(aa3)]<sub>p</sub>,

[0237] 其中q是选自0、1、2和3的数字,p是选自1、2和3的数字,AAA是氨基烷基氨基酸残基,并且(aa3)是独立地选自Arg、His、Gly和Ala的氨基酸残基,

[0238] 其中所述第一氨基烷基氨基酸残基与所述多肽或多肽类似物的N端共价连接、与所述多肽或多肽类似物的C端共价连接、和/或与所述多肽或多肽类似物内的氨基烷基氨基酸残基的侧链氨基共价连接,

[0239] 条件是所述分支氨基酸探针由2至9个氨基酸残基组成。

[0240] 在一个实施方案中,所述分子的N端氨基酸残基在 $\alpha$ 氨基处被乙酰化。

[0241] 在一个实施方案中,所述第一氨基烷基氨基酸残基通过肽键(酰胺)连接,所述肽键(酰胺)由所述第一氨基烷基氨基酸的羧酸或其衍生物与所述多肽的N端氨基酸残基的 $\alpha$ 氨基反应形成;通过肽键连接至所述多肽的C端氨基酸残基,所述肽键由所述氨基烷基氨基酸残基的 $\alpha$ 氨基与所述C端氨基酸残基的羧酸或其衍生物反应形成;和/或通过酰胺连接至所述多肽内的氨基烷基氨基酸残基,所述酰胺由所述第一氨基烷基氨基酸残基的羧酸或其衍生物与氨基烷基氨基酸残基的烷基氨基反应形成。

[0242] 如本文所定义,在一个实施方案中,氨基酸残基与其它氨基酸残基和/或肽共价连接意味着存在肽键。在另一个实施方案中,氨基酸残基与所述多肽内的氨基烷基氨基酸残基的侧链氨基共价连接意味着存在酰胺键。

[0243] 肽键(酰胺键)是当一个分子的羧基与另一个分子的氨基发生反应导致释放出H<sub>2</sub>O分子时在两个分子之间形成的共价化学键。该过程通常发生在氨基酸之间。

[0244] 如果要将分支氨基酸探针共价连接至所述多肽的N端,则优选将分支氨基酸探针主链的N端氨基烷基氨基酸残基乙酰化。

[0245] 如果分支氨基酸探针要与所述多肽内的氨基烷基氨基酸残基的侧链氨基共价连接,则优选将分支氨基酸探针主链的N端氨基烷基氨基酸残基乙酰化。

[0246] 如果要将分支氨基酸探针共价连接至所述多肽的C端,则所述分支氨基酸探针主链的C端氨基烷基氨基酸残基优选为羧酸、醛、酯或酰胺,例如一级酰胺(primary amide);最优选为酰胺化的。

[0247] 本公开的氨基烷基氨基酸残基(或AAA)和氨基酸残基(aa<sub>3</sub>)可以各自是相同(同一)的或不同(不同一)的。

[0248] 氨基烷基氨基酸残基

[0249] 根据本公开,每个分支氨基酸探针包含至少一个,例如两个,例如三个氨基烷基氨基酸残基。

[0250] 根据本公开,“氨基烷基氨基酸残基”(或AAA)是具有常规胺( $-\text{NH}_2$ )和羧酸( $-\text{COOH}$ )官能团以及第一( $\alpha$ -)碳原子共价连接的侧链的氨基酸,其中侧链包含氨基烷基基团( $-\text{CnH}_{2n}\text{NH}_2$ )。

[0251] 因此,氨基烷基氨基酸残基(或AAA)是具有包含氨基烷基( $-\text{CnH}_{2n}\text{NH}_2$ )或由氨基烷基( $-\text{CnH}_{2n}\text{NH}_2$ )组成的侧链的氨基酸,在一个实施方案中表示为侧链氨基烷基基团。

[0252] 在一个实施方案中,侧链烷基衍生自甲基( $\text{CH}_3$ -)、乙基( $\text{C}_2\text{H}_5$ -)、丙基( $\text{C}_3\text{H}_7$ -)、丁基( $\text{C}_4\text{H}_9$ -)、戊基( $\text{C}_5\text{H}_{11}$ -)、己基( $\text{C}_6\text{H}_{13}$ -)、庚基( $\text{C}_7\text{H}_{15}$ -)、辛基( $\text{C}_8\text{H}_{17}$ -)、壬基( $\text{C}_9\text{H}_{19}$ -)、癸基( $\text{C}_{10}\text{H}_{21}$ -)、十一烷基( $\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ -)和十二烷基( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}$ -)。当命名为具有特定碳数的烷基残基时,旨在涵盖具有该碳数的所有几何异构体;因此,例如,“丁基”旨在包括正丁基、仲丁基、异丁基和叔丁基。

[0253] 在一个实施方案中,所述氨基烷基氨基酸残基的侧链氨基( $\text{NH}_2$ )是甲胺的胺、乙胺的胺、丙胺的胺、正丁胺的胺、戊胺的胺、正己胺的胺、庚胺的胺、辛胺的胺、壬胺的胺、癸胺的胺、十一胺的胺或十二胺的胺。

[0254] 在一个实施方案中,侧链氨基烷基基团选自甲胺( $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ )、乙胺( $-\text{C}_2\text{H}_4\text{NH}_2$ )、丙胺( $-\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_2$ )、正丁胺( $-\text{C}_4\text{H}_8\text{NH}_2$ )、戊胺( $-\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NH}_2$ )、正己胺( $-\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NH}_2$ )、庚胺( $-\text{C}_7\text{H}_{14}\text{NH}_2$ )、辛胺( $-\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NH}_2$ )、壬胺( $-\text{C}_9\text{H}_{18}\text{NH}_2$ )、癸胺( $-\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{NH}_2$ )、十一胺( $-\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{NH}_2$ )和十二胺( $-\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{NH}_2$ )组成的组。

[0255] 在本公开的一个实施方案中,在每个BAP中包含的所述第一、第二和/或第三氨基烷基氨基酸残基的侧链氨基( $\text{NH}_2$ )均通过在其上连接分子进行修饰。

[0256] 在一个实施方案中,在每个BAP中包含的所述氨基烷基氨基酸残基的侧链氨基选自:

[0257]  $\beta$  (beta) 氨基(侧链上有1个亚甲基,甲胺);

[0258]  $\gamma$  (gamma) 氨基(侧链上有2个亚甲基,乙胺);

[0259]  $\delta$  (delta) 氨基(侧链上有3个亚甲基,丙胺);=鸟氨酸

[0260]  $\epsilon$  (epsilon) 氨基(侧链上有4个亚甲基,正丁胺);=赖氨酸

[0261]  $\zeta$  (zeta) 氨基(侧链上有5个亚甲基,戊胺);

[0262]  $\eta$  (eta) 氨基(侧链上有6个亚甲基,正己胺);

[0263]  $\theta$  (theta) 氨基(侧链上有7个亚甲基,庚胺);

[0264]  $\iota$  (iota) 氨基(侧链上有8个亚甲基,辛胺);

[0265]  $\kappa$  (kappa) 氨基(侧链上有9个亚甲基,壬胺);

[0266]  $\lambda$  (lambda) 氨基(侧链上有10个亚甲基,癸胺);

[0267]  $\mu$  (mu) 氨基(侧链上有11个亚甲基,十一胺);和

[0268]  $\nu$  (nu) 氨基(侧链上有12个亚甲基,十二胺)。

[0269] 例如, $\epsilon$ -氨基与从 $\alpha$ -碳(包括 $\alpha$ -碳)开始的第五个碳共价连接,该 $\alpha$ -碳与羧基( $\text{C}=\text{OOH}$ )共价连接。

[0270] 侧链为正丁胺、侧链氨基为 $\epsilon$  (epsilon) 氨基的氨基烷基氨基酸残基为赖氨酸

(Lys,K)。

[0271] 类似地, $\delta$ -氨基与从 $\alpha$ -碳开始的第四个碳共价连接。

[0272] 侧链为丙胺、侧链氨基为 $\delta$  (delta) 氨基的氨基烷基氨基酸残基为鸟氨酸 (Orn)。

[0273] 鸟氨酸是在细胞中通过精氨酸脱脒基化而形成的。虽然它不用于体内蛋白生成,但它参与了几种酶途径,并且因为它可以通过酶促脱脒基化形成精氨酸而似乎在体内氮平衡中发挥作用。

[0274] 本公开的任意氨基酸可以是L-或D-构型。如果没有特别说明,则优选指L-异构体形式。

[0275] 因此,在一个实施方案中氨基烷基氨基酸残基单独地是L-或D-构型。在一个实施方案中,氨基烷基氨基酸残基是L-构型。

[0276] 在一个实施方案中,分支氨基酸探针中包含的氨基烷基氨基酸残基单独地选自赖氨酸和鸟氨酸。

[0277] 在一个实施方案中,氨基烷基氨基酸残基选自赖氨酸和D-赖氨酸。在一个具体实施方案中,氨基烷基氨基酸残基是赖氨酸残基。

[0278] 在一个实施方案中,氨基烷基氨基酸残基选自鸟氨酸和D-鸟氨酸。

[0279] 在本公开的一个实施方案中,提供了如本文定义的多肽或多肽类似物以及一个或多个分支氨基酸探针,

[0280] 其中所述分支氨基酸探针包含选自赖氨酸和鸟氨酸的第一氨基酸残基,

[0281] 所述第一氨基酸残基任选地共价连接至选自赖氨酸或鸟氨酸的第二氨基酸残基或第二氨基酸残基和第三氨基酸残基,以形成2或3个赖氨酸或鸟氨酸残基的线性链,

[0282] 其中,所述第一、第二和/或第三赖氨酸或鸟氨酸残基中的一个或多个的侧链通过将独立地选自以下组的分子连接至 $\delta$ -氨基(鸟氨酸)或 $\epsilon$ -氨基(赖氨酸)来修饰:

[0283]  $\text{Lys}_q\text{-Lys}$ 、 $(\text{aa}_3)_p\text{-Lys}_q$ 、 $\text{Lys}_q\text{-(aa}_3)_p$ 、 $[(\text{aa}_3)\text{-Lys}]_p$ 、 $[\text{Lys-(aa}_3)]_p$ 、

[0284]  $\text{Orn}_q\text{-Orn}$ 、 $(\text{aa}_3)_p\text{-Orn}_q$ 、 $\text{Orn}_q\text{-(aa}_3)_p$ 、 $[(\text{aa}_3)\text{-Orn}]_p$ 和 $[\text{Orn-(aa}_3)]_p$ 、

[0285]  $\text{Orn}_p\text{-Lys}_p$ 、 $\text{Lys}_p\text{-Orn}_p$ 、 $[\text{Orn-Lys}]_p$ 和 $[\text{Lys-Orn}]_p$ ,

[0286] 其中q是选自0、1、2和3的数字,p是选自1、2和3的数字,并且 $(\text{aa}_3)$ 是独立地选自Arg、His、Gly和Ala的氨基酸残基,

[0287] 其中所述第一赖氨酸或鸟氨酸残基共价连接至所述多肽或多肽类似物的N端,共价连接至所述多肽或多肽类似物的C端,和/或共价连接至所述多肽或多肽类似物内赖氨酸残基的 $\epsilon$ -氨基或鸟氨酸残基的 $\delta$ -氨基,

[0288] 条件是所述分支氨基酸探针由2至9个氨基酸残基组成。

[0289] 在一个实施方案中,提供了如本文定义的多肽或多肽类似物和一个或多个分支氨基酸探针,

[0290] 其中所述分支氨基酸探针包含第一赖氨酸残基,

[0291] 所述第一赖氨酸残基任选地共价连接至第二赖氨酸残基,或共价连接至第二赖氨酸残基和第三赖氨酸残基,以形成2或3个赖氨酸残基的线性链,

[0292] 其中所述第一、第二和/或第三赖氨酸残基中的一个或多个的侧链通过将独立地选自下列组的分子连接至所述赖氨酸的 $\epsilon$ -氨基来修饰: $\text{Lys}_q\text{-Lys}$ 、 $(\text{aa}_3)_p\text{-Lys}_q$ 、 $\text{Lys}_q\text{-(aa}_3)_p$ 、 $[(\text{aa}_3)\text{-Lys}]_p$ 、 $[\text{Lys-(aa}_3)]_p$ ,其中q是选自0、1、2和3的数字,p是选自1、2和3的数字,

并且(aa<sub>3</sub>)是独立地选自Arg、His、Gly和Ala的氨基酸残基,

[0293] 其中所述第一赖氨酸残基共价连接至所述多肽或多肽类似物的N端,共价连接至所述多肽或多肽类似物的C端,和/或共价连接至所述多肽或多肽类似物内赖氨酸残基的 $\epsilon$ -氨基或鸟氨酸残基的 $\delta$ -氨基,

[0294] 条件是所述分支氨基酸探针由2至9个氨基酸残基组成。

[0295] 对探针进行分支化

[0296] 在一个实施方案中的本公开的分支氨基酸探针(BAP)由2至9个氨基酸残基组成。

[0297] 在本公开的一个实施方案中,所述一个或多个分支氨基酸探针中的每一个均由2至3个氨基酸残基组成,例如由3至4个氨基酸残基组成,例如由4至5个氨基酸残基组成,例如由5至6个氨基酸残基组成,例如由6至7个氨基酸残基组成,例如由7至8个氨基酸残基组成,例如由8至9个氨基酸残基组成。

[0298] 在本公开的一个实施方案中,所述一个或多个分支氨基酸探针中的每一个均由2个氨基酸残基组成,例如由3个氨基酸残基组成,例如由4个氨基酸残基组成,例如由5个氨基酸残基组成,例如由6个氨基酸残基组成,例如由7个氨基酸残基组成,例如由8个氨基酸残基组成,例如由9个氨基酸残基组成。在本公开的一个具体实施方案中,所述一个或多个分支氨基酸探针中的每一个均由3个氨基酸残基组成。

[0299] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针包含第一氨基烷基氨基酸残基(也称为AAA<sub>1</sub>),该第一氨基烷基氨基酸残基与本文定义的多肽或多肽类似物连接,以提供本公开的多肽缀合物。

[0300] 在本公开的一个实施方案中,一个或多个分支氨基酸探针(中的每一个)的第一氨基烷基氨基酸与本公开的多肽或多肽类似物的N端共价连接,与所述多肽的C端共价连接,和/或与所述多肽内的氨基烷基氨基酸残基的侧链氨基共价连接。

[0301] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针包含第一氨基烷基氨基酸残基。在一个实施方案中,通过将本文定义的分子连接至侧链氨基来修饰所述第一氨基烷基氨基酸残基的侧链。

[0302] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针的第一氨基烷基氨基酸在 $\alpha$ 氨基处被乙酰化。在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针的第一氨基烷基氨基酸残基的N端被乙酰化。

[0303] 在本公开的一个实施方案中,当包含第一氨基烷基氨基酸残基的分支氨基酸探针与本文定义的多肽的N端共价连接时,或当包含第一氨基烷基氨基酸残基的分支氨基酸探针与所述多肽内的氨基烷基氨基酸残基的侧链氨基共价连接时,所述分支氨基酸探针的所述第一氨基烷基氨基酸残基的N端被乙酰化。

[0304] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针的第一氨基烷基氨基酸残基的C端是羧酸、醛、酯或酰胺,例如一级酰胺(CONH<sub>2</sub>)。在本公开的一个优选实施方案中,第一氨基烷基氨基酸残基的C端被酰胺化。

[0305] 在本公开的一个实施方案中,当包含第一氨基烷基氨基酸残基的分支氨基酸探针与本文定义的多肽的C端共价连接时,所述分支氨基酸探针的所述第一氨基烷基氨基酸残基的C端为酰胺。

[0306] 在本公开的一个实施方案中,所述第一氨基烷基氨基酸残基与第二氨基烷基氨基

酸残基共价连接,以形成2个氨基烷基氨基酸残基的线性链。在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针的第二氨基烷基氨基酸残基的 $\alpha$ -氨基被乙酰化。在一个实施方案中,分支氨基酸探针的第二氨基烷基氨基酸残基的N端被乙酰化。

[0307] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针的第二氨基烷基氨基酸残基的C端是羧酸、醛、酯或酰胺,例如一级酰胺( $\text{CONH}_2$ )。在本公开的一个优选实施方案中,第二氨基烷基氨基酸残基的C端被酰胺化。

[0308] 在本公开的一个实施方案中,所述第一氨基烷基氨基酸残基共价连接至第二氨基烷基氨基酸残基和(共价连接至)第三氨基烷基氨基酸残基,以形成3个氨基烷基氨基酸残基的线性链。

[0309] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针的第三氨基烷基氨基酸残基的 $\alpha$ -氨基被乙酰化。在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针的第三氨基烷基氨基酸残基的N端被乙酰化。

[0310] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针的第三氨基烷基氨基酸残基的C端是羧酸、醛、酯或酰胺,例如一级酰胺( $\text{CONH}_2$ )。在本公开的一个优选实施方案中,第三氨基烷基氨基酸残基的C端被酰胺化。

[0311] 在本公开的一个实施方案中,第一氨基烷基氨基酸残基具有在其胺基团上结合的第二和第三氨基烷基氨基酸残基。在本公开的一个实施方案中,第一氨基烷基氨基酸残基具有在其羧酸基团上共价连接的第二和第三氨基烷基氨基酸残基。在一个实施方案中,第一氨基烷基氨基酸残基具有在其胺基团处连接的第二氨基烷基氨基酸残基和在其羧酸基团处连接的第三氨基烷基氨基酸残基。

[0312] 第二和第三氨基烷基氨基酸残基可分别表示为 $\text{AAA}_2$ 和 $\text{AAA}_3$ 。

[0313] 在本公开的一个实施方案中,所述第一、第二和/或第三氨基烷基氨基酸残基的每一个均是具有选自以下的侧链氨基烷基的氨基酸:甲胺( $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ )、乙胺( $-\text{C}_2\text{H}_4\text{NH}_2$ )、丙胺( $-\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_2$ )、正丁胺( $-\text{C}_4\text{H}_8\text{NH}_2$ )、戊胺( $-\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NH}_2$ )、正己胺( $-\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NH}_2$ )、庚胺( $-\text{C}_7\text{H}_{14}\text{NH}_2$ )、辛胺( $-\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NH}_2$ )、壬胺( $-\text{C}_9\text{H}_{18}\text{NH}_2$ )、癸胺( $-\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{NH}_2$ )、十一胺( $-\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{NH}_2$ )和十二胺( $-\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{NH}_2$ )。

[0314] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针的第一、第二和/或第三氨基烷基氨基酸残基中的每一个均单独地选自赖氨酸、D-赖氨酸、鸟氨酸和D-鸟氨酸。

[0315] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针的第一、第二和第三氨基烷基氨基酸残基的每一个均为赖氨酸残基(包括L-赖氨酸和D-赖氨酸)。

[0316] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针的第一、第二或第三氨基烷基氨基酸残基在 $\alpha$ 氨基处被乙酰化( $\text{Ac-AA}(\text{COCH}_3)$ )。

[0317] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针的第一,第一和第二,以及第一、第二和第三氨基烷基氨基酸残基被称为分支氨基酸探针的氨基烷基氨基酸主链( $\text{AAA}_1$ 、 $\text{AAA}_{1-2}$ 、 $\text{AAA}_{1-3}$ )。

[0318] 在本公开的一个实施方案中,第一,第一和第二,以及第一、第二和第三个氨基烷基氨基酸残基各自为赖氨酸残基。在一个实施方案中,分支氨基酸探针的第一,第一和第二,以及第一、第二和第三赖氨酸残基被称为分支氨基酸探针的赖氨酸主链( $\text{Lys}_1$ 、 $\text{Lys}_{1-2}$ 、 $\text{Lys}_{1-3}$ )。

[0319] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针的赖氨酸主链的第一赖氨酸残基、

或第二赖氨酸残基、或第三赖氨酸残基在 $\alpha$ -氨基处被乙酰化(Ac-Lys)。

[0320] 在本公开的一个实施方案中,所述第一、第二和/或第三氨基烷基氨基酸残基之一的侧链通过将本文定义的分子连接至侧链氨基来修饰。

[0321] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针包含第一氨基烷基氨基酸残基,其中通过将本文定义的分子连接至侧链氨基来修饰所述第一氨基烷基氨基酸残基的侧链。

[0322] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针包含第一和第二氨基烷基氨基酸残基,其中通过将本文定义的分子连接至侧链氨基来修饰所述第一氨基烷基氨基酸残基的侧链。

[0323] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针包含第一和第二氨基烷基氨基酸残基,其中通过将本文定义的分子连接至侧链氨基来修饰所述第二氨基烷基氨基酸残基的侧链。

[0324] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针包含第一和第二氨基烷基氨基酸残基,其中通过将本文定义的分子连接至侧链氨基来修饰所述第一和第二氨基烷基氨基酸残基的侧链。

[0325] 在本公开的一个实施方案中,所述第一、第二和/或第三氨基烷基氨基酸残基中的两个的侧链通过将本文定义的分子连接至侧链氨基来修饰。

[0326] 在本公开的一个实施方案中,第一、第二和第三氨基烷基氨基酸残基的所有三个的侧链均通过将本文定义的分子连接至侧链氨基来修饰。

[0327] 在本公开的一个实施方案中,i)第一氨基烷基氨基酸残基、ii)第二氨基烷基氨基酸残基、iii)第三氨基烷基氨基酸残基、iv)第一和第二氨基烷基氨基酸残基、v)第一和第三氨基烷基氨基酸残基、vi)第二和第三氨基烷基氨基酸残基、或vii)第一、第二和第三氨基烷基氨基酸残基的侧链通过将本文定义的分子连接至侧链氨基来修饰。

[0328] 在本公开的一个实施方案中,支链氨基酸的赖氨酸主链的第一赖氨酸残基,或第二赖氨酸残基,或第三赖氨酸残基,或第一和第二赖氨酸残基,或第一和第三赖氨酸残基,或第二和第三赖氨酸残基,或第一、第二和第三赖氨酸残基通过将分子连接至 $\epsilon$ -氨基来修饰。

[0329] 在本公开的一个实施方案中,所述第一、第二和/或第三氨基烷基氨基酸残基中每一个的一个或多个的侧链通过将独立地选自以下组的分子连接至侧链氨基来修饰: $AA_q$ - $AAA$ 、 $(aa_3)_p$ - $AAA_q$ 、 $AAA_q$ - $(aa_3)_p$ 、 $[(aa_3)-AAA]_p$ 和 $[AAA-(aa_3)]_p$ ,其中q是选自0、1、2和3的数字,p是选自1、2和3的数字,AAA是氨基烷基氨基酸残基,并且 $(aa_3)$ 是独立地选自Arg、His、Gly和Ala的氨基酸残基。在一个实施方案中,分子的N端AAA或 $(aa)_3$ 在 $\alpha$ -氨基处被乙酰化。

[0330] 在本公开的一个实施方案中,所述第一、第二和/或第三氨基烷基氨基酸残基中每一个的一个或多个的侧链通过将独立地选自以下的分子连接至侧链氨基来修饰:

[0331]  $Lys_q$ -Lys、 $(aa_3)_p$ - $Lys_q$ 、 $Lys_q$ - $(aa_3)_p$ 、 $[(aa_3)-Lys]_p$ 、 $[Lys-(aa_3)]_p$ 、

[0332]  $Orn_q$ -Orn、 $(aa_3)_p$ - $Orn_q$ 、 $Orn_q$ - $(aa_3)_p$ 、 $[(aa_3)-Orn]_p$ 和 $[Orn-(aa_3)]_p$ 、

[0333]  $Orn_p$ - $Lys_p$ 、 $Lys_p$ - $Orn_p$ 、 $[Orn-Lys]_p$ 和 $[Lys-Orn]_p$ ;

[0334] 其中q是选自0、1、2和3的数字,p是选自1、2和3的数字,并且 $(aa)_3$ 是独立地选自Arg、His、Gly和Ala的氨基酸残基。在一个实施方案中,所述分子的N端Lys、Orn或 $(aa)_3$ 在 $\alpha$ -氨基处被乙酰化。

[0335] 在本公开的一个实施方案中,所述第一、第二和/或第三氨基烷基氨基酸残基中每一个的一个或多个的侧链通过将独立地选自以下的分子连接至侧链氨基来修饰: $\text{Lys}_q$ -Lys、 $(\text{aa}_3)_p$ -Lys $_q$ 、Lys $_q$ -( $\text{aa}_3$ ) $_p$ 、 $[(\text{aa}_3)$ -Lys] $_p$ 和 $[\text{Lys}-(\text{aa}_3)]_p$ ,其中q是选自0、1、2和3的数字,p是选自1、2和3的数字,Lys是选自L-Lys和D-Lys的赖氨酸残基,并且( $\text{aa}_3$ )是独立地选自Arg、His、Gly和Ala的氨基酸残基。在一个实施方案中,所述分子的N端Lys或( $\text{aa}_3$ ) $_3$ 在 $\alpha$ 氨基处被乙酰化。

[0336] 在本公开的一个实施方案中,赖氨酸主链的所述第一、第二和/或第三赖氨酸残基中每一个的一个或多个的侧链通过将独立地选自以下的分子连接至侧链的 $\epsilon$ -氨基来修饰: $\text{Lys}_q$ -Lys、 $(\text{aa}_3)_p$ -Lys $_q$ 、Lys $_q$ -( $\text{aa}_3$ ) $_p$ 、 $[(\text{aa}_3)$ -Lys] $_p$ 和 $[\text{Lys}-(\text{aa}_3)]_p$ ,其中q是选自0、1、2和3的数字,p是选自1、2和3的数字,Lys是选自L-Lys和D-Lys的赖氨酸残基,并且( $\text{aa}_3$ )是独立地选自Arg、His、Gly和Ala的氨基酸残基。在一个实施方案中,所述分子的N端Lys或( $\text{aa}_3$ ) $_3$ 在 $\alpha$ 氨基处被乙酰化。

[0337] 在本公开的一个实施方案中,赖氨酸主链的所述第一、第二和/或第三赖氨酸残基中每一个的一个或多个的侧链通过将Lys $_q$ -Lys分子连接至侧链的 $\epsilon$ -氨基来修饰,其中q是选自0、1、2和3的数字。在一个实施方案中,所述分子的N端Lys在 $\alpha$ 氨基处被乙酰化。

[0338] 在本公开的一个实施方案中,与分支氨基酸探针的赖氨酸主链的一个或多个赖氨酸残基的 $\epsilon$ -氨基共价连接的分子独立地选自Lys $_q$ -Lys、 $(\text{aa}_3)_p$ -Lys $_q$ 、Lys $_q$ -( $\text{aa}_3$ ) $_p$ 、 $[(\text{aa}_3)$ -Lys] $_p$ 和 $[\text{Lys}-(\text{aa}_3)]_p$ ,其中q是选自0、1、2和3的数字,p是选自1、2和3的数字,并且( $\text{aa}_3$ )是独立地选自Arg、His、Gly和Ala的氨基酸残基。在一个实施方案中,所述分子的N端Lys或( $\text{aa}_3$ ) $_3$ 在 $\alpha$ 氨基处被乙酰化。

[0339] 因此,在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针的第一赖氨酸残基,或第二赖氨酸残基,或第三赖氨酸残基,或第一和第二赖氨酸残基,或第一和第三赖氨酸残基,或第二和第三赖氨酸残基,或第一、第二和第三赖氨酸残基各自通过将独立地选自以下的分子连接至 $\epsilon$ -氨基来修饰: $\text{Lys}_q$ -Lys、 $(\text{aa}_3)_p$ -Lys $_q$ 、Lys $_q$ -( $\text{aa}_3$ ) $_p$ 、 $[(\text{aa}_3)$ -Lys] $_p$ 和 $[\text{Lys}-(\text{aa}_3)]_p$ ,其中q是选自0、1、2和3的数字,p是选自1、2和3的数字,并且( $\text{aa}_3$ )是独立地选自Arg、His、Gly和Ala的氨基酸残基。在一个实施方案中,所述分子的N端Lys或( $\text{aa}_3$ ) $_3$ 在 $\alpha$ 氨基处被乙酰化。

[0340] 在本公开的一个具体实施方案中,( $\text{aa}_3$ )是独立地选自Gly和Ala的氨基酸残基。在进一步的实施方案中,( $\text{aa}_3$ )是Gly。

[0341] 在本公开的一个实施方案中,与所述第一、第二和/或第三烷基胺氨基酸残基的侧链氨基共价连接的分子在N端氨基酸残基的 $\alpha$ 氨基处被乙酰化。

[0342] 在本公开的一个实施方案中,所述分子独立地选自Ac-AAA $_q$ -AAA、Ac-( $\text{aa}_3$ ) $_p$ -AAA $_q$ 、Ac-AAA $_q$ -( $\text{aa}_3$ ) $_p$ 、Ac- $[(\text{aa}_3)$ -AAA] $_p$ 和Ac- $[\text{AAA}-(\text{aa}_3)]_p$ 、和/或AAA $_q$ -AAA、( $\text{aa}_3$ ) $_p$ -AAA $_q$ 、AAA $_q$ -( $\text{aa}_3$ ) $_p$ 、 $[(\text{aa}_3)$ -AAA] $_p$ 和 $[\text{AAA}-(\text{aa}_3)]_p$ 。

[0343] 在本公开的一个实施方案中,所述分子独立地选自Ac-Orn $_q$ -Orn、Ac-( $\text{aa}_3$ ) $_p$ -Orn $_q$ 、Ac-Orn $_q$ -( $\text{aa}_3$ ) $_p$ 、Ac- $[(\text{aa}_3)$ -Orn] $_p$ 、Ac- $[\text{Orn}-(\text{aa}_3)]_p$ 、Ac-Orn $_p$ -Lys $_p$ 、Ac-Lys $_p$ -Orn $_p$ 、Ac- $[\text{Orn}-\text{Lys}]_p$ 和Ac- $[\text{Lys}-\text{Orn}]_p$ 、和/或Orn $_q$ -Orn、( $\text{aa}_3$ ) $_p$ -Orn $_q$ 、Orn $_q$ -( $\text{aa}_3$ ) $_p$ 、 $[(\text{aa}_3)$ -Orn] $_p$ 和 $[\text{Orn}-(\text{aa}_3)]_p$ 、Orn $_p$ -Lys $_p$ 、Lys $_p$ -Orn $_p$ 、 $[\text{Orn}-\text{Lys}]_p$ 和 $[\text{Lys}-\text{Orn}]_p$ 。

[0344] 因此,在本公开的一个实施方案中,所述分子独立地选自Ac-Lys $_q$ -Lys、Ac-( $\text{aa}_3$ ) $_p$ -Lys $_q$ 、Ac-Lys $_q$ -( $\text{aa}_3$ ) $_p$ 、Ac- $[(\text{aa}_3)$ -Lys] $_p$ 和Ac- $[\text{Lys}-(\text{aa}_3)]_p$ ;和/或Lys $_q$ -Lys、( $\text{aa}_3$ ) $_p$ -Lys $_q$ 、

$\text{Lys}_q - (\text{aa}_3)_p$ 、 $[(\text{aa}_3) - \text{Lys}]_p$  和  $[\text{Lys} - (\text{aa}_3)]_p$ 。

[0345] 在本公开的一个具体实施方案中,与侧链氨基共价连接的分子为  $\text{Ac} - \text{AAA}_q - \text{AAA}$  或  $\text{AAA}_q - \text{AAA}$ ,其中 $q$ 为选自0、1、2和3的数字。

[0346] 因此,在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针由2至9个氨基烷基氨基酸残基组成。在一个实施方案中,所述2至9个氨基烷基氨基酸残基单独地选自赖氨酸、D-赖氨酸、鸟氨酸和D-鸟氨酸。

[0347] 在本公开的一个具体实施方案中,与侧链氨基共价连接的分子是  $\text{Ac} - \text{Lys}_q - \text{Lys}$  或  $\text{Lys}_q - \text{Lys}$ ,其中 $q$ 是选自0、1、2和3的数字。

[0348] 因此,在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针由2至9个赖氨酸残基组成。

[0349] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针包含至多1、2、3或4个选自Arg、His、Gly和Ala ( $\text{aa}_3$ ) 的氨基酸,其中剩余的氨基酸为氨基烷基氨基酸残基。在另一个实施方案中,分支氨基酸探针包含至多1个Arg残基,和/或包含至多1个His残基,和/或包含至多1个Gly残基,和/或包含至多1个Ala残基。

[0350] 在本公开的一个实施方案中,与第一、第二和/或第三氨基烷基氨基酸残基中的一个或多个的侧链氨基共价连接的分子选自AAA、Ac-AAA、AAA-AAA、Ac-AAA-AAA、AAA-AAA-AAA、Ac-AAA-AAA-AAA、AAA-AAA-AAA-AAA、Ac-AAA-AAA-AAA-AAA、AAA-Gly-AAA、Ac-AAA-Gly-AAA、AAA-AAA-Gly、Ac-AAA-AAA-Gly、AAA-Gly、Ac-AAA-Gly、AAA-Ala-AAA、Ac-AAA-Ala-AAA、AAA-AAA-Ala、Ac-AAA-AAA-Ala、AAA-Ala、Ac-AAA-Ala、AAA-His-AAA、Ac-AAA-His-AAA、AAA-AAA-His、Ac-AAA-AAA-His、AAA-His、Ac-AAA-His、AAA-Arg-AAA、Ac-AAA-Arg-AAA、AAA-AAA-Arg、Ac-AAA-AAA-Arg、AAA-Arg和Ac-AAA-Arg;其中AAA为本文所定义的氨基烷基氨基酸残基。上述AAA、Gly、Ala、His和Arg氨基酸残基可以各自为L-构象或D-构象。

[0351] 在本公开的一个实施方案中,与第一、第二和/或第三氨基烷基氨基酸残基中的一个或多个的侧链氨基共价连接的分子选自以下:Lys、Ac-Lys、Lys-Lys、Ac-Lys-Lys、Lys-Lys-Lys、Ac-Lys-Lys-Lys、Lys-Lys-Lys-Lys、Ac-Lys-Lys-Lys-Lys、Lys-Gly-Lys、Ac-Lys-Gly-Lys、Lys-Lys-Gly、Ac-Lys-Lys-Gly、Lys-Gly、Ac-Lys-Gly、Lys-Ala-Lys、Ac-Lys-Ala-Lys、Lys-Lys-Ala、Ac-Lys-Lys-Ala、Lys-Ala、Ac-Lys-Ala、Lys-His-Lys、Ac-Lys-His-Lys、Lys-Lys-His、Ac-Lys-Lys-His、Lys-His、Ac-Lys-His、Lys-Arg-Lys、Ac-Lys-Arg-Lys、Lys-Lys-Arg、Ac-Lys-Lys-Arg、Lys-Arg和Ac-Lys-Arg。

[0352] 在本公开的一个具体实施方案中,与第一、第二和/或第三赖氨酸残基中的一个或多个的 $\epsilon$ -氨基共价连接的分子选自以下:Lys、Ac-Lys、Lys-Lys、Ac-Lys-Lys、Lys-Lys-Lys、Ac-Lys-Lys-Lys、Lys-Lys-Lys-Lys、Ac-Lys-Lys-Lys-Lys、Lys-Gly-Lys、Ac-Lys-Gly-Lys、Lys-Lys-Gly、Ac-Lys-Lys-Gly、Lys-Gly、Ac-Lys-Gly、Lys-Ala-Lys、Ac-Lys-Ala-Lys、Lys-Lys-Ala、Ac-Lys-Lys-Ala、Lys-Ala、Ac-Lys-Ala、Lys-His-Lys、Ac-Lys-His-Lys、Lys-Lys-His、Ac-Lys-Lys-His、Lys-His、Ac-Lys-His、Lys-Arg-Lys、Ac-Lys-Arg-Lys、Lys-Lys-Arg、Ac-Lys-Lys-Arg、Lys-Arg和Ac-Lys-Arg。

[0353] 在本公开的一个具体实施方案中,分支氨基酸探针包含选自Lys和D-Lys的第一赖氨酸残基或由选自Lys和D-Lys的第一赖氨酸残基组成,所述第一赖氨酸残基任选地被N端乙酰化或C端酰胺化,其中所述第一赖氨酸残基通过将选自以下组的分子连接至所述第一赖氨酸残基的 $\epsilon$ -氨基来修饰:Lys、Ac-Lys、Lys-Lys、Ac-Lys-Lys、Lys-Lys-Lys、Ac-Lys-

Lys-Lys、Lys-Lys-Lys-Lys、Ac-Lys-Lys-Lys-Lys、Lys-Gly-Lys、Ac-Lys-Gly-Lys、Lys-Lys-Gly、Ac-Lys-Lys-Gly、Lys-Gly、Ac-Lys-Gly、Lys-Ala-Lys、Ac-Lys-Ala-Lys、Lys-Lys-Ala、Ac-Lys-Lys-Ala、Lys-Ala、Ac-Lys-Ala、Lys-His-Lys、Ac-Lys-His-Lys、Lys-Lys-His、Ac-Lys-Lys-His、Lys-His、Ac-Lys-His、Lys-Arg-Lys、Ac-Lys-Arg-Lys、Lys-Lys-Arg、Ac-Lys-Lys-Arg、Lys-Arg和Ac-Lys-Arg。

[0354] 在本公开的一个具体实施方案中,分支氨基酸探针包含各自选自Lys和D-Lys的第一和第二赖氨酸残基或由各自选自Lys和D-Lys的第一和第二赖氨酸残基组成,所述第二赖氨酸残基任选地被N端乙酰化或C端酰胺化,其中i)所述第一赖氨酸残基、ii)所述第二赖氨酸残基或iii)所述第一和第二残基各自通过将选自以下组的分子连接至所述赖氨酸残基的 $\epsilon$ -氨基来修饰:Lys、Ac-Lys、Lys-Lys、Ac-Lys-Lys、Lys-Lys-Lys、Ac-Lys-Lys-Lys、Lys-Lys-Lys-Lys、Ac-Lys-Lys-Lys-Lys、Lys-Gly-Lys、Ac-Lys-Gly-Lys、Lys-Lys-Gly、Ac-Lys-Lys-Gly、Lys-Gly、Ac-Lys-Gly、Lys-Ala-Lys、Ac-Lys-Ala-Lys、Lys-Lys-Ala、Ac-Lys-Lys-Ala、Lys-Ala、Ac-Lys-Ala、Lys-His-Lys、Ac-Lys-His-Lys、Lys-Lys-His、Ac-Lys-Lys-His、Lys-His、Ac-Lys-His、Lys-Arg-Lys、Ac-Lys-Arg-Lys、Lys-Lys-Arg、Ac-Lys-Lys-Arg、Lys-Arg和Ac-Lys-Arg。

[0355] 在本公开的一个具体实施方案中,分支氨基酸探针包含各自选自Lys和D-Lys的第一、第二和第三赖氨酸残基或由各自选自Lys和D-Lys的第一、第二和第三赖氨酸残基组成,所述第三赖氨酸残基任选地被N端乙酰化或C端酰胺化,其中i)所述第一赖氨酸残基、ii)所述第二赖氨酸残基、iii)所述第三赖氨酸残基、iv)所述第一和第二赖氨酸残基、v)所述第一和第三赖氨酸残基、vi)所述第二和第三赖氨酸残基、或vii)所述第一、第二和第三赖氨酸残基各自通过将选自以下的分子连接至所述赖氨酸残基的 $\epsilon$ -氨基来修饰:Lys、Ac-Lys、Lys-Lys、Ac-Lys-Lys、Lys-Lys-Lys、Ac-Lys-Lys-Lys、Lys-Lys-Lys-Lys、Ac-Lys-Lys-Lys-Lys、Lys-Lys-Lys-Lys-Lys、Ac-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys、Lys-Gly-Lys、Ac-Lys-Gly-Lys、Lys-Lys-Gly、Ac-Lys-Lys-Gly、Lys-Gly、Ac-Lys-Gly、Lys-Ala-Lys、Ac-Lys-Ala-Lys、Lys-Lys-Ala、Ac-Lys-Lys-Ala、Lys-Ala、Ac-Lys-Ala、Lys-His-Lys、Ac-Lys-His-Lys、Lys-Lys-His、Ac-Lys-Lys-His、Lys-His、Ac-Lys-His、Lys-Arg-Lys、Ac-Lys-Arg-Lys、Lys-Lys-Arg、Ac-Lys-Lys-Arg、Lys-Arg和Ac-Lys-Arg。

[0356] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针包含以下公式或由以下公式组成:  $\text{Ac}-(\text{Ac-Lys-Lys})\text{Lys}_1-$  (与  $\text{Ac}-(\text{Ac-Lys-Lys})\text{Lys-}$  相同), 其中  $\text{Lys}_1$  是第一赖氨酸残基, 其被乙酰化、与本文定义的多肽的N端共价连接, 并且  $(\text{Ac-Lys-Lys})$  是与所述第一赖氨酸残基  $\text{Lys}_1$  的 $\epsilon$ -氨基共价连接的分子。

[0357] 在本公开的一个实施方案中,  $\text{Ac}-(\text{Ac-Lys-Lys})\text{Lys-}$  共价连接至如本文定义的多肽的N端和/或共价连接至所述多肽内的氨基烷基氨基酸残基的侧链氨基。

[0358] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针包含以下公式或由以下公式组成:  $\text{Ac}-(\text{Ac-Lys})\text{Lys}_1-$ 。

[0359] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针包含以下公式或由以下公式组成:  $(\text{Ac-Lys-Lys})\text{Lys}_1-\text{NH}_2$  (与  $(\text{Ac-Lys-Lys})\text{Lys-NH}_2$  相同), 其中  $\text{Lys}_1$  是第一赖氨酸残基, 其在C端被酰胺化 ( $-\text{NH}_2$ ), 并且  $(\text{Ac-Lys-Lys})$  是连接至所述第一赖氨酸残基  $\text{Lys}_1$  的 $\epsilon$ -氨基的分子。在本公开的一个实施方案中,  $(\text{Ac-Lys-Lys})\text{Lys}_1-\text{NH}_2$  连接至本文定义的多肽的C端。

[0360] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针包含选自以下的公式或由选自以下

的公式组成: (AAA) AAA<sub>1</sub>-、(AAA-AAA) AAA<sub>1</sub>-、(AAA-AAA-AAA) AAA<sub>1</sub>-、(AAA-AAA-AAA-AAA) AAA<sub>1</sub>-、(AAA-Gly-AAA) AAA<sub>1</sub>-、(AAA-AAA-Gly) AAA<sub>1</sub>-、(AAA-Gly) AAA<sub>1</sub>-、(AAA-Ala-AAA) AAA<sub>1</sub>-、(AAA-AAA-Ala) AAA<sub>1</sub>-、(AAA-Ala) AAA<sub>1</sub>-、(AAA-His-AAA) AAA<sub>1</sub>-、(AAA-AAA-His) AAA<sub>1</sub>-、(AAA-His) AAA<sub>1</sub>-、(AAA-Arg-AAA) AAA<sub>1</sub>-、(AAA-AAA-Arg) AAA<sub>1</sub>-和 (AAA-Arg) AAA<sub>1</sub>-。在本公开的一个实施方案中,所述第一氨基烷基氨基酸残基(AAA<sub>1</sub>-)是N端乙酰化或C端酰胺化的。

[0361] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针包含选自以下的公式或由选自以下的公式组成: (Lys) Lys<sub>1</sub>-、(Lys-Lys) Lys<sub>1</sub>-、(Lys-Lys-Lys) Lys<sub>1</sub>-、(Lys-Lys-Lys-Lys) Lys<sub>1</sub>-、(Lys-Gly-Lys) Lys<sub>1</sub>-、(Lys-Lys-Gly) Lys<sub>1</sub>-、(Lys-Gly) Lys<sub>1</sub>-、(Lys-Ala-Lys) Lys<sub>1</sub>-、(Lys-Lys-Ala) Lys<sub>1</sub>-、(Lys-Ala) Lys<sub>1</sub>-、(Lys-His-Lys) Lys<sub>1</sub>-、(Lys-Lys-His) Lys<sub>1</sub>-、(Lys-His) Lys<sub>1</sub>-、(Lys-Arg-Lys) Lys<sub>1</sub>-、(Lys-Lys-Arg) Lys<sub>1</sub>-和 (Lys-Arg) Lys<sub>1</sub>-。在本公开的一个实施方案中,所述第一赖氨酸残基(Lys<sub>1</sub>-)是N端乙酰化或C端酰胺化的。

[0362] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针包含选自以下的公式或由选自以下的公式组成: Ac-(Ac-Lys) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Lys) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Lys-Lys) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Lys-Lys-Lys) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Gly-Lys) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Lys-Gly) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Gly) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Ala-Lys) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Lys-Ala) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Ala) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-His-Lys) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Lys-His) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-His) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Arg-Lys) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Lys-Arg) Lys<sub>1</sub>-和 Ac-(Ac-Lys-Arg) Lys<sub>1</sub>-。

[0363] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针包含选自以下的公式或由选自以下的公式组成: (Ac-Lys) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>、(Ac-Lys-Lys) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>、(Ac-Lys-Lys-Lys) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>、(Ac-Lys-Lys-Lys-Lys) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>、(Ac-Lys-Gly-Lys) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>、(Ac-Lys-Lys-Gly) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>、(Ac-Lys-Gly) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>、(Ac-Lys-Ala-Lys) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>、(Ac-Lys-Lys-Ala) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>、(Ac-Lys-Ala) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>、(Ac-Lys-His-Lys) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>、(Ac-Lys-Lys-His) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>、(Ac-Lys-His) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>、(Ac-Lys-Arg-Lys) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>、(Ac-Lys-Lys-Arg) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>和 (Ac-Lys-Arg) Lys<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>。

[0364] 更具体地,在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针包含选自以下的公式或由选自以下的公式组成: Ac-(Ac-Lys) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Lys) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Lys-Lys) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Lys-Lys-Lys) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Gly-Lys) Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Lys-Gly) Lys<sub>1</sub>-和 Ac-(Ac-Lys-Gly) Lys<sub>1</sub>-。

[0365] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针包含以下公式或由以下公式组成: Ac-(Ac-Lys) Lys<sub>2</sub>-Lys<sub>1</sub>-,其中Lys<sub>1</sub>是第一赖氨酸残基,Lys<sub>2</sub>是被乙酰化并且通过肽键与Lys<sub>1</sub>共价连接的第二赖氨酸残基,并且(Ac-Lys)是与所述第二赖氨酸残基Lys<sub>2</sub>的ε-氨基共价连接的分子。

[0366] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针包含以下公式或由以下公式组成: Ac-Lys<sub>2</sub>-(Ac-Lys) Lys<sub>1</sub>-,其中分子(Ac-Lys)与所述第一赖氨酸残基Lys<sub>1</sub>的ε-氨基共价连接。

[0367] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针选自以下: Ac-(Ac-Lys) Lys-Lys-、(Ac-Lys) Lys-Lys-、Ac-(Lys) Lys-Lys-、(Lys) Lys-Lys-、(Ac-Lys) Lys-Lys-NH<sub>2</sub>、(Lys) Lys-Lys-NH<sub>2</sub>、Ac-Lys-(Ac-Lys) Lys-、Lys-(Ac-Lys) Lys-、Ac-Lys-(Lys) Lys-、Lys-(Lys) Lys-Lys-、(Ac-Lys) Lys-NH<sub>2</sub>、Lys-(Lys) Lys-NH<sub>2</sub>、Ac-(Ac-Lys-Lys)-Lys-、(Ac-Lys-Lys)-Lys-、

Ac-(Lys-Lys)-Lys-和(Lys-Lys)-Lys-(Ac-Lys-Lys)-Lys-NH<sub>2</sub>和(Lys-Lys)-Lys-NH<sub>2</sub>。

[0368] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针选自Ac-(Ac-Lys)Lys<sub>2</sub>-、Ac-(Lys)Lys<sub>1</sub>-、(Ac-Lys)Lys-NH<sub>2</sub>、(Lys)Lys-NH<sub>2</sub>和(Lys)Lys<sub>1</sub>-。

[0369] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针选自Ac-(Ac-Lys)Lys<sub>2</sub>-Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Lys)Lys<sub>2</sub>-Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Gly)Lys<sub>2</sub>-Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Lys-Lys)Lys<sub>2</sub>-Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Lys-Lys-Lys)Lys<sub>2</sub>-Lys<sub>1</sub>-、Ac-Lys<sub>2</sub>-(Ac-Lys)-Lys<sub>1</sub>-、Ac-Lys<sub>2</sub>-(Ac-Lys-Lys)-Lys<sub>1</sub>-、Ac-Lys<sub>2</sub>-(Ac-Lys-Gly)-Lys<sub>1</sub>-、Ac-Lys<sub>2</sub>-(Ac-Lys-Lys-Lys)-Lys<sub>1</sub>-、Ac-Lys<sub>2</sub>-(Ac-Lys-Lys-Lys-Lys)-Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys)Lys<sub>2</sub>-(Ac-Lys)-Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys)Lys<sub>2</sub>-(Ac-Lys-Lys)-Lys<sub>1</sub>-和Ac-(Ac-Lys-Lys)Lys<sub>2</sub>-(Ac-Lys-Lys)-Lys<sub>1</sub>-。

[0370] 更具体地,在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针选自Ac-(Ac-Lys)Lys<sub>2</sub>-Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Lys)Lys<sub>2</sub>-Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Gly)Lys<sub>2</sub>-Lys<sub>1</sub>-、Ac-Lys<sub>2</sub>-(Ac-Lys)-Lys<sub>1</sub>-、Ac-Lys<sub>2</sub>-(Ac-Lys-Lys)-Lys<sub>1</sub>-、Ac-Lys<sub>2</sub>-(Ac-Lys-Gly)-Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys)Lys<sub>2</sub>-(Ac-Lys)-Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys)Lys<sub>2</sub>-(Ac-Lys-Lys)-Lys<sub>1</sub>-和Ac-(Ac-Lys-Lys)Lys<sub>2</sub>-(Ac-Lys-Lys)-Lys<sub>1</sub>-。

[0371] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针选自Ac-Lys<sub>3</sub>-Lys<sub>2</sub>-(Ac-Lys)Lys<sub>1</sub>-、Ac-Lys<sub>3</sub>-(Ac-Lys)Lys<sub>2</sub>-Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys)Lys<sub>3</sub>-Lys<sub>2</sub>-Lys<sub>1</sub>-、Ac-Lys<sub>3</sub>-(Ac-Lys)Lys<sub>2</sub>-(Ac-Lys)Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys)Lys<sub>3</sub>-(Ac-Lys)Lys<sub>2</sub>-Lys<sub>1</sub>-和Ac-(Ac-Lys)Lys<sub>3</sub>-Lys<sub>2</sub>-(Ac-Lys)Lys<sub>1</sub>-。

[0372] 在本公开的一个具体实施方案中,分支氨基酸探针选自Ac-(Ac-Lys)Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Lys)Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Lys-Lys)Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Lys-Lys-Lys)Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Gly-Lys)Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Lys-Gly)Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Gly)Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys)Lys<sub>2</sub>-Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Lys)Lys<sub>2</sub>-Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Gly)Lys<sub>2</sub>-Lys<sub>1</sub>-、Ac-Lys<sub>2</sub>-(Ac-Lys)-Lys<sub>1</sub>-、Ac-Lys<sub>2</sub>-(Ac-Lys-Lys)-Lys<sub>1</sub>-、Ac-Lys<sub>2</sub>-(Ac-Lys-Gly)-Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys)Lys<sub>2</sub>-(Ac-Lys)-Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys)Lys<sub>2</sub>-(Ac-Lys-Lys)-Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys-Lys)Lys<sub>2</sub>-(Ac-Lys-Lys)-Lys<sub>1</sub>-、Ac-Lys<sub>3</sub>-Lys<sub>2</sub>-(Ac-Lys)Lys<sub>1</sub>-、Ac-Lys<sub>3</sub>-(Ac-Lys)Lys<sub>2</sub>-Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys)Lys<sub>3</sub>-Lys<sub>2</sub>-Lys<sub>1</sub>-、Ac-Lys<sub>3</sub>-(Ac-Lys)Lys<sub>2</sub>-(Ac-Lys)Lys<sub>1</sub>-、Ac-(Ac-Lys)Lys<sub>3</sub>-(Ac-Lys)Lys<sub>2</sub>-Lys<sub>1</sub>-和Ac-(Ac-Lys)Lys<sub>3</sub>-Lys<sub>2</sub>-(Ac-Lys)Lys<sub>1</sub>-。在一个实施方案中,所述分支氨基酸探针共价连接至本文定义的多肽的N端和/或共价连接至所述多肽内的氨基烷基氨基酸残基的侧链氨基。

[0373] 在本公开的一个具体实施方案中,分支氨基酸探针由2或3个赖氨酸残基(选自Lys和D-Lys)组成。

[0374] 在本公开的一个具体实施方案中,分支氨基酸探针由3个赖氨酸残基组成。在另一个实施方案中,分支氨基酸探针由2个赖氨酸残基组成。

[0375] 在本公开的一个具体实施方案中,分支氨基酸探针由选自Lys和D-Lys的第一和第二赖氨酸残基组成,其中第一和第二赖氨酸残基中的一个或两个通过将选自Lys和D-Lys的一个赖氨酸残基连接至所述第一和/或第二赖氨酸残基的ε-氨基来修饰;其中所述赖氨酸残基中的每一个任选地在α-氨基处被乙酰化。

[0376] 在本公开的一个具体实施方案中,分支氨基酸探针由选自Lys和D-Lys的第一赖氨酸残基组成,其中所述第一赖氨酸残基通过将选自Lys和D-Lys的两个赖氨酸残基连接至所

述第一赖氨酸残基的 $\epsilon$ -氨基来修饰;其中所述赖氨酸残基中的每一个任选地在 $\alpha$ 氨基处被乙酰化。

[0377] 连接BAP和多肽

[0378] 根据本公开,所述一个或多个分支氨基酸探针中的每一个的第一氨基烷基氨基酸残基共价连接至本文定义的多肽或多肽类似物的N端、共价连接至所述多肽或多肽类似物的C端、和/或共价连接至所述多肽或多肽类似物内的氨基烷基氨基酸残基的侧链氨基。

[0379] 将一个或多个分支氨基酸探针连接至本文定义的多肽或多肽类似物产生了多肽/BAP-缀合物,例如多肽类似物/BAP-缀合物。

[0380] 与所述多肽或多肽类似物的N端共价连接的术语是指,分支氨基酸探针的第一氨基烷基氨基酸残基与多肽或多肽类似物的最N端氨基酸残基的 $\alpha$ 氨基共价连接。

[0381] 与所述多肽或多肽类似物的C端共价连接的术语是指,分支氨基酸探针的第一氨基烷基氨基酸残基的 $\alpha$ 氨基与多肽或多肽类似物的最C端氨基酸残基共价连接。

[0382] 此外,应理解,在本公开的一个实施方案中的分支氨基酸探针与所述多肽或多肽类似物内的氨基烷基氨基酸残基的侧链氨基共价连接。

[0383] 在本公开的一个具体实施方案中,所述多肽或多肽类似物序列内的所述氨基烷基氨基酸残基选自鸟氨酸残基和赖氨酸残基。在本公开的一个具体实施方案中,所述肽序列内的所述氨基烷基氨基酸残基是赖氨酸残基。

[0384] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针的第一氨基烷基氨基酸残基共价连接至所述多肽或多肽类似物内的鸟氨酸残基的 $\delta$ -氨基或所述多肽或多肽类似物内的赖氨酸残基的 $\epsilon$ -氨基。

[0385] 在本公开的一个实施方案中,分支氨基酸探针的第一氨基烷基氨基酸残基与所述多肽或多肽类似物内的赖氨酸残基的 $\epsilon$ -氨基共价连接。

[0386] 应当理解,所述肽序列内的氨基烷基氨基酸残基是指,该氨基烷基氨基酸残基本身不构成分支氨基酸探针的一部分,而是存在于多肽或多肽类似物的现有氨基酸序列中的残基。所述氨基烷基氨基酸残基可以位于多肽或多肽类似物的任意位置。

[0387] 根据本公开,包含一个或多个分支氨基酸探针的多肽类似物是指,在一个实施方案中的多肽类似物包含1个分支氨基酸探针,例如2个分支氨基酸探针,例如3个分支氨基酸探针,例如4个分支氨基酸探针,例如5个分支氨基酸探针,例如6个分支氨基酸探针。

[0388] 本公开的多肽类似物可以包含任意数量的分支氨基酸探针,只要它们可以共价连接至肽(所述多肽内的N端、C端和/或一个或多个氨基烷基氨基酸残基)。

[0389] 在本公开的一个实施方案中,多肽类似物包含1个分支氨基酸探针。

[0390] 在本公开的一个实施方案中,多肽类似物包含1个分支氨基酸探针,该分支氨基酸探针与多肽的N端共价结合。

[0391] 在本公开的一个实施方案中,多肽类似物包含1个分支氨基酸探针,该分支氨基酸探针与多肽的C端共价结合。

[0392] 在本公开的一个实施方案中,多肽类似物包含1个分支氨基酸探针,该分支氨基酸探针与所述多肽内的氨基烷基氨基酸残基的侧链氨基共价连接。

[0393] 在本公开的一个实施方案中,多肽类似物包含多于一个(两个或更多个)分支氨基酸探针。在多肽类似物包含多于一个分支氨基酸探针的实施方案中,应理解,多于一个分支

氨基酸探针可以各自是相同(同一)的或不同(不同一)的。

[0394] 在本公开的一个实施方案中,多肽类似物包含2个分支氨基酸探针。

[0395] 在本公开的一个实施方案中,多肽类似物包含2个分支氨基酸探针,其中一个分支氨基酸探针与多肽的N端共价结合,另一个分支氨基酸探针与多肽的C端共价结合。

[0396] 在本公开的一个实施方案中,多肽类似物包含2个分支氨基酸探针,其中一个分支氨基酸探针与多肽的N端共价结合,另一个分支氨基酸探针与所述多肽内的氨基烷基氨基酸残基的侧链氨基共价连接。

[0397] 在本公开的一个实施方案中,多肽类似物包含2个分支氨基酸探针,其中一个分支氨基酸探针与多肽的C端共价结合,另一个分支氨基酸探针与所述多肽内的氨基烷基氨基酸残基的侧链氨基共价连接。

[0398] 在本公开的一个实施方案中,多肽类似物包含2个分支氨基酸探针,其中两个分支氨基酸探针的每一个均与所述多肽内的不同的(或单独的)氨基烷基氨基酸残基的侧链氨基共价连接。

[0399] 在本公开的一个实施方案中,多肽类似物包含3个分支氨基酸探针。

[0400] 在本公开的一个实施方案中,多肽类似物包含3个分支氨基酸探针,其中第一分支氨基酸探针与多肽的N端共价结合,第二分支氨基酸探针与多肽的C端共价结合,第三分支氨基酸探针与所述多肽内的氨基烷基氨基酸残基的侧链氨基共价连接。

[0401] 在本公开的一个实施方案中,多肽类似物包含3个分支氨基酸探针,其中第一分支氨基酸探针与多肽的N端共价结合,第二和第三分支氨基酸探针分别与所述多肽内的不同氨基烷基氨基酸残基的侧链氨基共价连接。

[0402] 在本公开的一个实施方案中,多肽类似物包含3个分支氨基酸探针,其中第一分支氨基酸探针与多肽的C端共价结合,第二和第三分支氨基酸探针分别与所述多肽内的不同氨基烷基氨基酸残基的侧链氨基共价连接。

#### [0403] 治疗方法

[0404] 本公开在一个实施方案中涉及膜联蛋白A1的多肽类似物,所述多肽类似物的缀合形式,以及包含膜联蛋白A1的多肽类似物或其缀合形式的组合物,用作药物和用于治疗缺血性病况和/或炎性病况。

[0405] 本公开的一个方面提供了选自SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25至SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48至SEQ ID NO:70的多肽或多肽类似物,或其功能变体,用作药物。

[0406] 此外,本公开的一个方面涉及选自SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25至SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48至SEQ ID NO:70的多肽或多肽类似物,或其功能变体,用于缺血性病况和/或炎性病况的治疗方法中。

[0407] 在某些实施方案中,提供了选自以下的多肽或多肽类似物:

[0408] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSK (SEQ ID NO:50),

[0409] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKG (SEQ ID NO:51),

[0410] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGG (SEQ ID NO:52),

[0411] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGP (SEQ ID NO:53),

[0412] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPG (SEQ ID NO:54),

[0413] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGS (SEQ ID NO:55),

- [0414] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSA (SEQ ID NO:56) ,
- [0415] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAV (SEQ ID NO:57) ,AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVS (SEQ ID NO:58) ,
- [0416] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSP (SEQ ID NO:59) ,和
- [0417] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPY (SEQ ID NO:60) ,
- [0418] 或其功能变体,
- [0419] 用于治疗缺血性病况和/或炎性病况。
- [0420] 在一个优选实施方案中,多肽或多肽类似物选自:
- [0421] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSK (SEQ ID NO:50) ,
- [0422] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGS (SEQ ID NO:55) ,和
- [0423] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPY (SEQ ID NO:60) ,
- [0424] 或其功能变体,
- [0425] 用于治疗缺血性病况和/或炎性病况。
- [0426] 功能变体在本文其他地方公开。
- [0427] 此外,本公开还涉及选自SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25至SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48至SEQ ID NO:70的多肽或多肽类似物,或其功能变体,用于制备用于治疗缺血性病况和/或炎性病况的药物。
- [0428] 在另一方面,本公开提供了用于治疗、预防或缓解缺血性病况和/或炎性病况的方法。在一个实施方案中,本公开的此类方法包括向有需要的个体施用或释放有效量的本文公开的选自SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25至SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48至SEQ ID NO:70的多肽或多肽类似物或其功能变体,或包含一种或多种此类多肽或多肽类似物的药物组合物的一个或多个步骤。
- [0429] 在一个实施方案中,本文所指的有需要的个体是受益于施用本文所公开的多肽或多肽类似物或包含本公开的所述多肽或多肽类似物的药物组合物的个体。在一个实施方案中,这样的个体患有疾病或病况或有患该疾病或病况的风险。在一个实施方案中,所述个体是任意人类,男性或女性,婴儿、中年或老年人。在一个实施方案中,个体中要治疗或预防的疾病与个体的年龄、个体的整体健康状况、用于治疗个体的药物以及个体是否具有在个体中可能患有病况或已经诱发病况的疾病或病症的既往病史有关。
- [0430] 本文使用的术语“治疗”是指为了对抗病况、疾病或病症而对患者进行的管理和护理。该术语旨在包括针对患者所患的特定病况的全谱治疗,例如施用本公开的多肽类似物,用于缓解或减轻症状或并发症、延缓病况进展、部分抑制临床表现、疾病或病况;治愈或消除病况、疾病或病症;和/或预防或降低患病况、疾病或病症的风险,其中“预防”或“防止”应理解为对患者进行管理和护理,目的是阻止病况、疾病或病症的发展,包括施用活性化合物以防止或降低症状或并发症发作的风险。待治疗的患者优选为哺乳动物,特别是人。然而,对诸如小鼠、大鼠、狗、猫、牛、马、羊和猪等动物的治疗也在本公开的范围内。本公开的待治疗的患者可以是各种年龄的,例如成人、儿童、16岁以下的儿童、6-16岁的儿童、2-16岁的儿童、2个月至6岁的儿童或2个月至5岁的儿童。
- [0431] 如本文所用,“炎症”或“炎症反应或疾病或病况”是指任意炎症反应或疾病,包括但不限于眼部炎症、痛风、痛风性关节炎、类风湿性关节炎、哮喘、再灌注损伤或损害、卒中、

心肌梗塞、脓毒性休克(septic shock)或炎性皮肤病,例如银屑病或湿疹。

[0432] 医学病症

[0433] 在一个方面,本公开提供了如本文所公开的多肽或多肽类似物,用于治疗缺血性病况和/或炎性病况。

[0434] 在本公开的一些实施方案中,所述治疗是预防性的、改善性的或治愈性的。

[0435] 在本公开的一些实施方案中,所述缺血性病况和/或炎性病况是急性、亚急性或慢性的。

[0436] 在本公开的一个实施方案中,提供了本文公开的多肽或多肽类似物,用于治疗哺乳动物的一个或多个器官的组织中的缺血性病况和/或炎性病况。

[0437] 在本公开的一些实施方案中,所述哺乳动物是人(智人)。

[0438] 在本公开的一些实施方案中,所述器官选自肾、肝、脑、心脏、肌肉、骨髓、皮肤、骨骼、肺、呼吸道、脾、外分泌腺、膀胱、内分泌腺、生殖器官包括阴茎管、眼睛、耳朵、血管系统、胃肠道包括小肠、结肠、直肠、肛管和前列腺。

[0439] 在本公开的一些实施方案中,所述缺血性病况是继发性缺血。

[0440] 在本公开的一些实施方案中,所述缺血是继发性缺血,并且其是由于卒中、损伤、感染性休克、全身性低血压、心脏病发作导致的心脏骤停、心律失常、动脉粥样硬化疾病伴随血栓形成、心脏或任意器官血管的栓塞、血管痉挛、主动脉瘤或其他器官的动脉瘤、冠状动脉狭窄、心肌梗塞、心绞痛、心包炎、心肌炎、粘液血症(myxedemia)或心内膜炎引起的。

[0441] 在一个实施方案中,主动脉瘤是胸主动脉瘤或腹主动脉瘤或夹层主动脉瘤。在一个实施方案中,全身性低血压是因心脏病引起的低血压、因全身性疾病(包括感染或过敏反应)引起的低血压、或因一种或多种毒性化合物或毒物或药物引起的低血压。

[0442] 在本公开的一些实施方案中,所述缺血性病况为心肌缺血。

[0443] 在本公开的一些实施方案中,所述缺血性和/或炎性病况与手术相关,例如大型手术(major surgery);或与器官移植相关,例如实体器官移植。

[0444] 在本公开的一些实施方案中,所述缺血性和/或炎性病况选自术后全身炎症反应综合征(SIRS)和术后器官功能障碍;例如术后肾衰竭,包括急性肾损伤(AKI)、肾毒性和/或慢性肾衰竭(CRF)。

[0445] 在本公开的一些实施方案中,所述缺血性和/或炎性病况是再灌注损伤。

[0446] 在本公开的一些实施方案中,所述炎性疾病选自关节病(关节疾病)、类风湿性关节炎(RA)、痛风、胃肠系统炎性疾病和多发性硬化症。

[0447] 在本公开的一些实施方案中,所述缺血性和/或炎性病况是肝脏炎症。在本公开的一个实施方案中,所述炎性疾病是非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。

[0448] 在本公开的一些实施方案中,所述一个或多个器官的组织中的缺血性和/或炎性病况是由心律失常引起的。在本公开的一个实施方案中,所述心律失常是个体的原发性疾病或继发于其他病况,包括急性感染(特别是影响肺部的感染)、肺栓塞、低血压、休克、缺氧血症和贫血。

[0449] 心律失常包括室性或室上性心动过速、房室传导阻滞、窦房结疾病、Wolff-Parkinson-White综合征、Lenegres病、Lev病以及任意涉及心房和心室之间异常心肌连接的综合征。

[0450] 在本公开的一些实施方案中,继发性缺血还可在一系列其他疾病和病况中观察到,包括但不限于糖尿病、高脂血症、血栓闭塞性脉管炎、Takayasu综合征、颞动脉炎、皮肤粘膜淋巴结综合征(川崎病)、心血管梅毒、结缔组织疾病如Raynaud病、phlegmasia coerulea dolens、血管创伤包括插管等医源性创伤、具有空腹LDL-胆固醇、甘油三酯和/或HDL-胆固醇水平升高的病况、腹膜后纤维化、风湿病、系统性红斑狼疮、结节性多动脉炎、硬皮病、多发性肌炎、皮肌炎、类风湿性关节炎、神经肌病性疾病如Duchenne进行性肌营养不良症、Friedreich共济失调和肌强直性营养不良症、过敏反应、血清病、溶血性贫血、过敏和过敏性肉芽肿。在一个实施方案中,本公开的多肽和多肽类似物还可用于治疗或预防所述病况。

[0451] 在本公开的一些实施方案中,待治疗的病况是由癌症或对器官有影响的癌前病变引起的,例如对呼吸系统(包括肺、细支气管、上呼吸道)和/或对心脏和/或对肾脏和/或对胃肠系统有影响,包括急性白血病、慢性粒细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、霍奇金病、淋巴瘤、骨肉瘤、骨髓瘤、任意来源的转移性癌。在本公开的一些实施方案中,本文公开的多肽或多肽类似物用于治疗或预防所述病况。

[0452] 在本公开的一些实施方案中,一个或多个器官的组织中的缺血性和/或炎性病况是由包括电磁辐射在内的物理创伤引起的。

[0453] 本公开的一个方面提供了缺血性病况和/或炎性病况的治疗方法,包括向有需要的个体施用有效量的本文公开的多肽或多肽类似物。

[0454] 手术和移植

[0455] 主要手术干预(包括心胸手术、腹部手术、主动脉和其他主要血管手术)以及器官移植(例如肺或心脏或肺和心脏联合移植、肝移植或肾移植)会引起全身炎症反应(SIR;或全身炎症反应综合征SIRS),并与术后器官功能障碍(包括肾衰竭的发展)有关。

[0456] 肾衰竭是手术干预过程中产生的SIR和血流减少的结果。结果是术后急性肾损伤(AKI),大部分恶化为慢性肾衰竭。目前尚无有效的治疗方式来预防肾衰竭的发展。术后肾衰竭可定义为手术干预后3个月出现肾小球滤过率(GFR)降低25%以上。

[0457] 大型心脏手术(例如修复一个或多个心脏瓣膜、心脏动脉搭桥术(CABG)、主动脉根部或主动脉分支(包括颈总动脉)手术或联合心脏手术(例如瓣膜置换和CABG和/或主动脉根部手术))与肾功能损害(renal impairment)的发展有关,而肾功能损害一旦存在,则与发病率和死亡率的增加有关。

[0458] 在本公开的一些实施方案中,用本文公开的多肽或多肽类似物治疗可降低肾功能损害的程度。例如,这通过减少术后GFR的下降来实现;通过降低术后血清肌酐或胱抑素C的增加程度或AKI标志物NGAL、IL18或KIM-1的尿液排泄的更直接增加来实现;和/或通过降低术后SIR的程度(例如通过降低IL-6和其他促炎标志物的循环水平)来实现。

[0459] 肺移植(LTX)是终末期肺病的终极治疗方式。与LTX相关的主要挑战是捐赠者稀缺、移植肺的急性和慢性排斥以及免疫抑制治疗的副作用,包括慢性肾衰竭(CRF)的发展。

[0460] 尽管新型免疫抑制药物在急性排斥治疗方面取得了良好的进展,导致第一年内急性排斥发作减少、器官损失减少、副作用减少、感染减少以及侵入性监测方法减少,但慢性器官排斥的控制并未得到很大改善,半衰期(即50%患者存活的年数)在过去20年中仅略有改善至约7年。

[0461] 免疫抑制治疗的副作用主要有两大挑战：肾毒性和移植后淋巴增生性疾病(PTLD)，后者可视为避免慢性器官排斥所需的免疫抑制程度的结果-“过多”可避免排斥，但会导致感染和PTLD，而“过少”则会增加患者排斥移植物的风险。尽管在过去30年进行了广泛的研究，但肾毒性和CRF的发展仍然是一个重大问题。在进行LTX后五年，没有患者能保持正常的肾功能，20%的长期幸存者最终也会接受肾移植。

[0462] 钙调磷酸酶抑制剂治疗(他克莫司、环孢菌素A)是成功实体器官移植的免疫抑制治疗策略的基石。使用钙调磷酸酶抑制剂的限制因素是急性和慢性不可逆肾毒性。最近的数据表明，LTX后前14天内肾功能(以GFR减少来衡量)会降低40%，并且这种降低是不可逆的。

[0463] 心脏移植(HTX)是终末期心力衰竭的终极治疗方式。与LTX类似，与HTX相关的主要挑战是捐赠者稀缺、移植心脏的急性和慢性排斥以及免疫抑制治疗的副作用(包括CRF的发展)。与LTX类似，随着时间的推移，保留肾功能的患者数量有限或不存在，并且与LTX类似，移植后两到四周就会出现肾功能的大幅下降。

[0464] LTX和HTX后见到的对肾功能产生的这种显著影响可能并非由钙调神经磷酸酶抑制剂单独治疗引起，而是手术和麻醉创伤与器官缺血以及抗生素、抗病毒、抗真菌和免疫抑制药物的副作用相结合的最终结果。因此，在一个实施方案中，通过使用本公开的多肽或多肽类似物进行药物干预将降低与器官移植(例如LTX和HTX)相关的肾功能损害程度。

[0465] 因此，如上文详细概述，手术(包括器官移植)可能是继发性缺血的原因。

[0466] 因此，在一个实施方案中，本公开涉及本文所公开的多肽或多肽类似物，用于治疗哺乳动物的一个或多个器官的组织中的缺血性和/或炎性病况，其中所述缺血性和/或炎性病况与手术有关。在本公开的一个实施方案中，所述手术是大型手术或大型手术干预。

[0467] 在本公开的一个实施方案中，所述手术选自心胸手术、腹部手术、主动脉和/或其他主要血管的手术、一个或多个心脏瓣膜的修复、心脏动脉搭桥术(CABG)、主动脉根部或主动脉分支(包括颈总动脉)的手术、以及联合心脏手术(例如瓣膜置换和CABG和/或主动脉根部手术)。

[0468] 在本公开的一个实施方案中，所述手术涵盖手术插入植入物、装置、移植物、假体或其他通过手术操作而插入的生物医学化合物或装置。

[0469] 在本公开的一个实施方案中，所述大型手术包括器官移植。因此，在一个实施方案中，本发明涉及本文公开的多肽或多肽类似物，用于治疗哺乳动物的一个或多个器官的组织中的缺血性和/或炎性病况，其中所述缺血性和/或炎性病况与器官移植有关。在本公开的一个实施方案中，所述器官移植是实体器官移植。

[0470] 在本公开的一个实施方案中，所述实体器官移植为心脏移植、肺移植、心肺联合移植、肝移植或肾移植。

[0471] 在另一个实施方案中，本公开涉及本文所公开的多肽或多肽类似物，用于治疗术后全身炎症反应综合征(SIRS)、术后器官功能障碍和/或术后肾衰竭例如急性肾损伤(AKI)、肾毒性和/或慢性肾衰竭(CRF)。

[0472] 在一个实施方案中，本公开涉及如本文所公开的多肽或多肽类似物，用于降低与大型手术(在一个实施方案中是器官移植)相关的肾功能损害程度。

[0473] 再灌注损伤是指在缺血或缺氧一段时间后血液供应恢复到组织时引起的组织损

伤。缺血期间血液中缺少氧气和营养物质会导致一种情形,其中循环恢复通过引发氧化应激而导致炎症和氧化损伤,而非恢复正常功能。

[0474] 再灌注损伤可能发生在手术中,例如器官移植等大型手术干预。这是进行肝脏移植以及心脏手术期间的主要问题。

[0475] 在本公开的一个具体实施方案中,一个或多个器官的组织中的所述缺血性和/或炎性病况与再灌注损伤有关。因此,在一个实施方案中,本公开涉及本文公开的多肽或多肽类似物,用于治疗哺乳动物的一个或多个器官的组织中的缺血性和/或炎性病况,其中所述缺血性和/或炎性病况与再灌注损伤有关。

[0476] 在本发明的一些实施方案中,本公开的多肽、多肽类似物或组合物将在手术和/或器官移植之前和/或期间施用。

[0477] 在本公开的一些实施方案中,本文所述的一个或多个器官的组织中的缺血性和/或炎性病况是由毒素或药物诱导的细胞、组织或器官衰竭引起的。

[0478] 毒素和药物

[0479] 本公开在一个实施方案中涉及如本文所公开的多肽或多肽类似物,用于治疗哺乳动物的一个或多个器官的组织中的缺血性和/或炎性病况,其中所述缺血性和/或炎性病况是由毒素或药物诱导的细胞、组织或器官衰竭引起(或诱导)的。

[0480] 所述药物包括但不限于癌症化疗药物,包括顺铂、卡铂、达卡巴嗪、丙卡巴嗪、六甲蜜胺、司莫司汀、洛莫司汀、卡莫司汀、白消安、噻替派、美法仑、环磷酰胺、苯丁酸氮芥、甲氯乙胺、阿扎替丁、克拉屈滨、阿糖胞苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、硫嘌呤、甲氨蝶呤、硫鸟嘌呤、别嘌呤醇、博来霉素、放线菌素、柔红霉素、多西他赛、多柔比星(阿霉素)、依托泊苷、伊达比星、伊立替康、丝裂霉素、紫杉醇、光神霉素(plicamycin)、拓扑替康、长春花碱、长春新碱、长春瑞滨、阿玛斯林(amasacrine)、门冬酰胺酶、羟基脲、米替坦、米托蒽醌;氨基糖苷类抗生素,包括链霉素、新霉素、卡那霉素、阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素、西索米星和尼替米星(nitilmicin);免疫抑制化合物,如环孢菌素;三环类抗抑郁药、锂盐、双苯丙胺和吩噻嗪衍生物。

[0481] 炎性病况

[0482] 炎症是身体对病原体和损伤的一种局部防御反应。免疫细胞和可溶性因子参与这一过程,中和有害物质并启动组织修复以恢复稳态。丧失这些机制调节可阻止炎症过程的最终消退,导致慢性炎症。慢性炎症与当今的现代医学极为相关,因为它是工业化社会最重要疾病(包括动脉粥样硬化、急性和慢性心力衰竭、癌症、糖尿病和肥胖相关疾病)的发病机制之一。最近对内源性抗炎途径的深入了解已经确定了许多适合药物干预的天然抗炎和消退分子和途径,这将使开发模拟天然炎症消退过程的药物成为可能。这些天然抗炎和消退途径之一是通过FPR2刺激起作用的膜联蛋白A1。

[0483] FPR-2激动剂的免疫调节作用是通过抑制炎性介质和抑制炎性细胞迁移来发挥的。FPR-2激动剂在多种细胞(包括单核细胞、巨噬细胞、T细胞亚型、内皮细胞和上皮细胞)中发挥这些作用。

[0484] 类风湿性关节炎(RA)和痛风等关节疾病的特点是急性发作期,在RA中发作(通常称为突发(flair))通常在慢性症状之上发展,尽管进行了强化药物治疗但仍会发展。痛风中也可以看到类似的模式,主要区别在于大多数痛风患者在发作之间没有症状。在这两种

情况下,中性粒细胞大量浸润到滑膜和关节液中是发作的主要病理特征。其中最重要的促炎效应物包括IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8和COX-2。缓解急性发作以避免慢性炎症的发展或恶化包括激活巨噬细胞以吞噬凋亡的中性粒细胞。

[0485] 因此,在本公开的一个实施方案中,将本文公开的多肽或多肽类似物治疗应用于关节疾病将是有吸引力的,这不仅是为了降低现有疾病恶化的严重程度,因为类风湿性关节炎的发作将产生重大的临床影响。然而,不仅关节疾病与症状的恶化有关。神经退行性疾病(例如多发性硬化症)具有类似突发的发作,其中在本公开的一个实施方案中使用本文公开的多肽或多肽类似物治疗可以减轻症状,并最终就关节疾病而言,降低患者功能水平的整体恶化。

[0486] 本公开在一个实施方案中涉及本文公开的多肽或多肽类似物,用于治疗哺乳动物的一个或多个器官的组织中的炎性病况,其中所述缺血性和/或炎性病况是炎性疾病。

[0487] 在本公开的一个实施方案中,所述炎性疾病是关节炎。在本公开的一个实施方案中,所述炎性疾病选自关节病(关节疾病、关节炎(包括与关节炎相关的疾病)、骨关节炎、类风湿性关节炎;脊柱关节病(例如强直性脊柱炎)、反应性关节炎(包括风湿热后的关节炎)、过敏性紫癜(Henoch-Schonlein purpura)、Reiter病、青少年慢性关节炎(包括Still病)、青少年类风湿性关节炎、青少年强直性脊柱炎、银屑病、骨关节炎、继发于过度活动的骨关节炎、先天性发育不良、股骨骨骺滑脱、Perthes病、关节内骨折、半月板切除术、肥胖、复发性脱位、重复性动作、结晶沉积以及软骨疾病和软骨代谢异常(包括焦磷酸盐关节病)、褐黄病、血色素沉着症、缺血性坏死(包括镰状细胞病)、皮质类固醇或其他药物治疗、Caisson病、脓毒性或感染性关节炎(包括结核性关节炎、脑膜炎性关节炎、淋菌性关节炎、沙门氏菌性关节炎)、感染性心内膜炎、病毒性关节炎、复发性关节血肿以及各种沉积性疾病如痛风、焦磷酸性关节病和急性钙化性关节周炎。

[0488] 在本公开的一个实施方案中,所述炎性疾病为结缔组织疾病;在一个实施方案中,选自系统性红斑狼疮、多发性肌炎/皮肌炎、系统性硬化症、混合性结缔组织病、结节病和原发性干燥综合征(包括干燥性角结膜炎)、风湿性多肌痛以及其他类型的血管炎、晶体沉积病(包括痛风)、焦磷酸关节病和急性钙化性关节周炎。

[0489] 在本公开的一个实施方案中,所述炎性疾病为软组织风湿病,包括滑囊炎、腱鞘炎或腱周炎、肌腱端炎、神经压迫、关节周炎或关节囊炎、肌肉紧张和肌功能障碍。

[0490] 在本公开的一个实施方案中,所述炎性疾病选自血管炎,包括继发于类风湿性关节炎的血管炎、由于细菌感染引起的感染性血管炎,包括螺旋体疾病,如莱姆病、梅毒、立克次体和分枝杆菌感染、真菌、病毒或原生动物感染、继发于超敏反应和白细胞增生性血管炎的非感染性血管炎,包括血清病和过敏性紫癜、药物引起的血管炎、原发性混合性冷球蛋白血症、低补体血症、与其他类型恶性肿瘤相关的血管炎、非感染性血管炎包括Takayasu动脉炎/疾病、巨细胞动脉炎(颞动脉炎和风湿性多肌痛)、Buerger病、结节性多动脉炎、显微镜下多动脉炎、韦格纳肉芽肿、Churg-Strauss综合征以及继发于结缔组织疾病的血管炎,包括系统性红斑狼疮、多发性肌炎/皮肌炎、系统性硬化症、混合性结缔组织病、结节病和原发性干燥综合征。

[0491] 在本公开的一个实施方案中,所述炎性疾病为胃肠系统炎性疾病。所述胃肠道炎性疾病可选自炎性肠病、乳糜泻、麸质敏感性肠病、嗜酸性胃肠炎、肠淋巴管扩张、炎性肠病

(包括Chrohn病和溃疡性结肠炎)、结肠憩室病、放射性肠炎、肠易激综合征、Whipple病、所有类型的口腔炎、唾液腺疾病(例如结节病、涎腺导管阻塞和干燥综合征)、食道炎(例如由于胃食管反流或感染念珠菌、单纯疱疹和巨细胞病毒)、胃部炎性疾病(包括急性和慢性胃炎、幽门螺杆菌感染和Mentriers病)和小肠炎症。

[0492] 在本公开的一个实施方案中,所述炎性疾病是神经退行性疾病,例如具有炎性成分的神经退行性疾病,例如多发性硬化症(MS)。

[0493] 在本公开的一个实施方案中,所述炎性疾病选自皮炎、天疱疮(pemfigus)、大疱性类天疱疮、良性粘膜类天疱疮、疱疹样皮炎、热带口炎性腹泻、系统性淀粉样变性、原发性胆汁性肝硬化、Goodpasture综合征、各种沉积性疾病如痛风、焦磷酸性关节病和急性钙化性关节周炎、胰腺炎、脓毒性椎间盘炎、结核病、恶性肿瘤(如转移、骨髓瘤等)、脊柱肿瘤、强直性脊柱炎、急性椎间盘脱垂、慢性椎间盘疾病/骨关节炎、骨质疏松和骨软化症、Pagets病、甲状旁腺功能亢进、肾性骨病、脊椎滑脱(spondylolisthesis)、脊管狭窄先天性异常(spinal senosis congenital abnormalities)和纤维肌痛。

[0494] 在本公开的一个实施方案中,所述炎性疾病选自上和下呼吸道疾病,例如慢性阻塞性肺病(COPD)、过敏性和非过敏性哮喘、过敏性鼻炎、过敏性和非过敏性结膜炎、过敏性和非过敏性皮炎和肺部炎症。

[0495] 另外的活性成分

[0496] 在本公开的一些实施方案中,本文公开的多肽或多肽类似物组合或包含了一种或多种另外的活性成分(被理解为其他治疗性化合物)或其药学上可接受的衍生物。

[0497] 因此,在一个实施方案中,本公开的治疗方法进一步包括以任意合适的比率同时或顺序地施用一种或多种另外的活性成分的一个或多个步骤。

[0498] 在一个实施方案中,本公开的治疗方法包括以下步骤:其中将本文定义的药物组合物或多肽或多肽类似物与一种或多种另外的活性成分同时、顺序或单独地组合施用。

[0499] 施用和剂量

[0500] 根据本公开,在一个实施方案中,向有需要的个体以药学有效剂量或治疗有效量施用包含选自SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25至SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48至SEQ ID NO:70的多肽或多肽类似物或其功能变体的组合物。

[0501] 在一个实施方案中,本公开的多肽或多肽类似物的治疗有效量是足以治愈、预防、降低风险、缓解或部分抑制给定疾病或病症及其并发症的临床表现的量。对于特定治疗目的有效的量将取决于病症的严重程度和类型以及受试者的体重和整体状态。足以实现此目的的量被定义为“治疗有效量”。

[0502] 在一个实施方案中,组合物的施用剂量为1 $\mu$ g/天至100mg/天;例如从1 $\mu$ g/天至10 $\mu$ g/天,例如10 $\mu$ g/天至100 $\mu$ g/天,例如100 $\mu$ g/天至250 $\mu$ g/天,例如250 $\mu$ g/天至500 $\mu$ g/天,例如500 $\mu$ g/天至750 $\mu$ g/天,例如750 $\mu$ g/天至1mg/天,例如1mg/天至2mg/天,例如2mg/天至5mg/天,或者例如5mg/天至10mg/天,例如10mg/天至20mg/天,例如20mg/天至30mg/天,例如30mg/天至40mg/天,例如40mg/天至50mg/天,例如50mg/天至75mg/天,或者例如75mg/天至100mg/天。

[0503] 在本公开的一个实施方案中,施用组合物的一个单剂量,其可以包括1 $\mu$ g/kg体重至100mg/kg体重,例如1至10 $\mu$ g/kg体重,例如10至100 $\mu$ g/天,例如100至250 $\mu$ g/kg体重,例如

250至500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重,例如500至750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重,例如750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重至1mg/kg体重,例如1mg/kg体重至2mg/kg体重,例如2至5mg/kg体重,例如5至10mg/kg体重,例如10至20mg/kg体重,例如20至30mg/kg体重,例如30至40mg/kg体重,例如40至50mg/kg体重,例如50至75mg/kg体重,或例如75至100mg/kg体重。

[0504] 在一个实施方案中,将本公开的剂量每天施用一次或几次,例如每天1至6次,例如每天1至5次,例如每天1至4次,例如每天1至3次,例如每天1至2次,例如每天2至4次,例如每天2至3次。

[0505] 施用途径

[0506] 应当理解,优选的施用途径将取决于待治疗的受试者的整体状况和年龄、待治疗的病况的性质、体内待治疗的组织的位置和所选的活性成分。

[0507] 在本公开的一个实施方案中,施用途径允许将多肽或多肽类似物引入血流中以最终靶向目标作用部位。

[0508] 在本公开的一个实施方案中,施用途径为任意合适的途径,例如肠内途径(包括口服、经直肠、经鼻、经肺、经颊、舌下、透皮、脑池内和腹腔内施用)和/或肠外途径(包括皮下、肌肉内、鞘内、静脉内和皮内施用)。可以通过常规技术制备适当的剂型。

[0509] 胃肠外施用是任意非口服/肠道途径的施用途径,其中药物避免在肝脏中首过降解。因此,胃肠外施用包括任意注射和输注,例如推注(bolus injection)或持续输注,例如静脉内施用、肌肉内施用或皮下施用。此外,胃肠外施用包括吸入和局部施用。

[0510] 因此,在本公开的一个实施方案中,本文公开的多肽或多肽类似物或组合物局部施用以穿过待给予物质或肽的动物的任意粘膜,例如鼻、阴道、眼、口、生殖道、肺、胃肠道或直肠中的粘膜,例如鼻或口的粘膜,并且因此胃肠外施用还可以包括经颊、舌下、经鼻、经直肠、经阴道和腹膜内施用以及通过吸入或装置的经肺和支气管施用。在一些实施方案中,本文公开的多肽或多肽类似物或组合物局部施用以穿过皮肤。

[0511] 在本公开的一个实施方案中,采用胃肠外施用的静脉内、皮下和肌肉内形式。

[0512] 在本公开的一个实施方案中,本文公开的多肽或多肽类似物或组合物用于局部治疗,即直接引入作用部位。因此,多肽或多肽类似物或组合物可以直接应用于皮肤或粘膜,或者多肽或多肽类似物或组合物可以注射到作用部位,例如注射到患病组织中或注射到直接通向患病组织的末端动脉中。

[0513] 药物制剂

[0514] 在本公开的一个实施方案中,多肽或多肽类似物或其药学上可接受的衍生物以单剂量或多剂量的形式单独施用或与药学上可接受的载体或赋形剂组合施用。本公开的药物组合物或多肽可以与药学上可接受的载体或稀释剂以及任意其他已知佐剂和赋形剂一起按照常规技术配制,例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,20<sup>th</sup> Edition,Gennaro,Ed.,Mack PublishingCo.,Easton,PA,2000中公开的技术。

[0515] 本文中的术语“药学上可接受的衍生物”包括药学上可接受的盐,指对患者无害的盐。此类盐包括药学上可接受的碱式或酸式加成盐以及药学上可接受的金属盐、铵盐和烷基化铵盐。药学上可接受的衍生物还包括药学上可接受的酯、前药或化合物的其他前体,其可以生物代谢为活性化合物,或化合物的晶体形式。

[0516] 药物组合物或药学上可接受的组合物可以专门配制用于通过任意合适的途径施

用,例如肠内途径、口服、经直肠、经鼻、经肺、经颊、舌下、透皮、脑池内、腹膜内和胃肠外(包括皮下、肌内、鞘内、静脉内和皮内)途径。

[0517] 用于口服施用的药物组合物包括固体剂型,例如硬胶囊或软胶囊、片剂、含片(troche)、糖衣丸、丸剂、锭剂(lozenge)、粉末和颗粒。在适当的情况下,它们可以用包衣制备,例如肠包衣,或者可以根据本领域公知的方法配制以提供活性成分的控制释放,例如缓释或延长释放。在相同的固体剂型中,可以组合两种活性成分,以提供一种活性成分的控制释放和另一种活性成分的立即释放。

[0518] 用于口服施用的液体剂型包括溶液、乳剂、水性或油性悬浮液、糖浆和酏剂。

[0519] 用于胃肠外施用的药物组合物包括无菌水性和非水性注射溶液、分散液、悬浮液或乳剂,以及在使用前在无菌注射溶液或分散液中重构的无菌粉末。长效注射制剂也被视为在本公开的范围。其他合适的施用形式包括栓剂、喷雾、软膏、乳膏/洗剂、凝胶、吸入剂、皮肤贴剂、植入物等。

[0520] 在本公开的一个实施方案中,本文公开的多肽或多肽类似物通常用作游离物质或药学衍生物,例如药学上可接受的酯或其盐。后者的实例是:具有游离碱官能团的化合物的酸加成盐,以及具有游离酸官能团的化合物的碱加成盐。术语“药学上可接受的盐”是指本公开使用的多肽或多肽类似物的无毒盐,这些盐通常通过使游离碱与合适的有机或无机酸反应,或通过使酸与合适的有机或无机碱反应来制备。当本公开的多肽或多肽类似物含有游离碱官能团时,通过用药学上可接受的酸的化学当量处理化合物的溶液或悬液以常规方式制备此类盐。当本公开的多肽或多肽类似物含有游离酸官能团时,通过用药学上可接受的碱的化学当量处理化合物的溶液或悬液以常规方式制备此类盐。具有羟基的多肽或多肽类似物的生理学上可接受的盐包括化合物的阴离子形式与合适的阳离子的组合,例如钠离子或铵离子。其他非药学上可接受的盐可用于制备多肽或多肽类似物,它们构成本公开的另一方面。药学上可接受的酸加成盐包括但不限于盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硝酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、异烟酸盐、醋酸盐、三氟醋酸盐、三氯醋酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、泛酸盐、双酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、葡糖醛酸盐、糖酸盐(saccharate)、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐和扑酸盐(即1,1'-亚甲基-双-(2-羟基-3-萘甲酸盐))。

[0521] 在本公开的一个实施方案中,本文公开的多肽或多肽类似物为晶体形式,例如共结晶形式或晶体形式的水合物。

[0522] 术语“前药”是指在体内快速转化以产生上述公式的亲本化合物的肽,例如,通过血液中的水解或通过细胞中的代谢,例如基底神经节的细胞。详细讨论见于T.Higuchi and V Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems," Vol.14 of the A.C.S. Symposium Series and Bioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, 两者均通过引用并入本文。前药的实例包括本公开的化合物的药学上可接受的无毒的酯。本公开的化合物的酯可以根据常规方法制备, "March's Advanced Organic Chemistry, 5<sup>th</sup> Edition". M.B. Smith & J. March, John Wiley & Sons, 2001。

[0523] 在一个实施方案中,对于胃肠外施用,采用本公开的多肽或多肽类似物在无菌水

性溶液、水性丙二醇或芝麻油或花生油中的溶液。水性溶液应在适当的情况下进行适当缓冲,并且液体稀释剂应与例如足够的盐水或葡萄糖进行等渗。水性溶液特别适合静脉内、肌肉内、皮下和腹膜内施用。所采用的无菌水性介质均可通过本领域技术人员已知的标准技术容易地获得。

[0524] 合适的药用载体包括惰性固体稀释剂或填充剂、无菌水性溶液和各种有机溶剂。固体载体的实例为乳糖、白土(terra alba)、蔗糖、环糊精、滑石、明胶、琼脂、果胶、阿拉伯胶、硬脂酸镁、硬脂酸和纤维素的低级烷基醚。液体载体的实例为糖浆、花生油、橄榄油、磷脂、脂肪酸、脂肪酸胺、聚氧乙烯和水。此外,载体或稀释剂可以包括本领域已知的任意缓释材料,例如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯,单独或与蜡混合。通过将本公开的化合物与药学上可接受的载体组合而形成的药物组合物随后以适合于所公开的施用途径的各种剂型容易地施用。可以通过药学领域已知的方法方便地将制剂以单位剂型呈现。

[0525] 适合口服施用的本公开的制剂可以作为离散单位存在,例如胶囊或片剂,每个单位含有预定量的活性成分,并且可以包括合适的赋形剂。此外,口服可用的制剂可以是粉末或颗粒、水性或非水性液体中的溶液或悬浮液、或水包油或油包水液体乳剂的形式。

[0526] 旨在用于口服的组合物可根据任意已知方法制备,并且此类组合物可包含一种或多种选自甜味剂、调味剂、着色剂和防腐剂的试剂,以提供药学上美观且可口的制剂。片剂可包含活性成分与适合制造片剂的无毒的药学上可接受的赋形剂的混合物。这些赋形剂例如可以是:惰性稀释剂,例如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠;造粒剂和崩解剂,例如玉米淀粉或海藻酸;粘合剂,例如淀粉、明胶或阿拉伯胶;以及润滑剂,例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉。片剂可不包衣,或可通过已知技术包衣以延迟在胃肠道中的崩解和吸收,从而提供较长时间的持续作用。例如,可以采用诸如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯之类的延时材料。

[0527] 口服制剂还可以以硬明胶胶囊的形式存在,其中活性成分与惰性固体稀释剂(例如碳酸钙、磷酸钙或高岭土)混合,或者以软明胶胶囊的形式存在,其中活性成分与水或油性介质(例如花生油、液体石蜡或橄榄油)混合。水性悬浮液可含有本公开用途的化合物与适合制造水性悬液的赋形剂的混合物。此类赋形剂是悬浮剂,例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍胶和阿拉伯胶;分散剂或润湿剂可以是天然存在的磷脂,例如卵磷脂,或环氧乙烷与脂肪酸的缩合产物,例如聚氧乙烯硬脂酸酯,或环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物,例如十七烷氧基十六醇,或环氧乙烷与脂肪酸和己糖醇衍生的部分酯的缩合产物,例如聚氧乙烯山梨醇单油酸酯,或环氧乙烷与脂肪酸和己糖醇酸酐衍生的部分酯的缩合产物,例如聚乙烯山梨醇单油酸酯。水性悬浮液还可含有一种或多种着色剂、一种或多种调味剂和一种或多种甜味剂,例如蔗糖或糖精。

[0528] 油性悬液可通过将活性成分悬浮在植物油(例如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油)或矿物油(例如液体石蜡)中来配制。油性悬浮液可含有增稠剂,例如蜂蜡、硬石蜡或鲸蜡醇。可添加甜味剂(例如上述甜味剂)和调味剂以提供可口的口服制剂。可通过添加抗氧化剂(例如抗坏血酸)来保存这些组合物。

[0529] 适合通过添加水制备水性悬液的可分散粉末和颗粒提供了活性化合物与分散剂或润湿剂、悬剂和一种或多种防腐剂的混合物。合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂例如是上文已经提到的那些。还可以存在额外的赋形剂,例如甜味剂、调味剂和着色剂。

[0530] 包含本公开的多肽或多肽类似物的药物组合物也可以是油包水乳剂的形式。油相可以是植物油,例如橄榄油或花生油,或矿物油,例如液体石蜡,或其混合物。合适的乳化剂可以是天然存在的树胶,例如阿拉伯胶或黄蓍胶,天然存在的磷脂,例如大豆、卵磷脂,以及源自脂肪酸和己糖醇酐的酯或部分酯,例如山梨糖醇单油酸酯,以及该部分酯与环氧乙烷的缩合产物,例如聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯。乳剂中还可含有甜味剂和调味剂。

[0531] 糖浆和酞剂可与甜味剂(例如甘油、丙二醇、山梨醇或蔗糖)一起配制。此类制剂还可包含润肤剂、防腐剂和调味剂和着色剂。药物组合物可为无菌可注射水性或油性悬液的形式。该悬液可根据已知方法使用上述合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂配制。无菌可注射制剂也可可为无毒的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬液,例如1,3-丁二醇中的溶液。可使用的可接受的媒介物和溶剂有水、Ringer溶液和等渗氯化钠溶液。此外,无菌固定油可方便地用作溶剂或悬浮介质。为此,可使用合成的单甘油酯或双甘油酯来使用任意温和的固定油。此外,脂肪酸例如油酸还可用于制备注射剂。

[0532] 组合物还可以是栓剂形式,用于经直肠施用本公开的化合物。这些组合物可以通过将本文公开的多肽或多肽类似物与合适的无刺激性赋形剂混合来制备,所述赋形剂在常温下为固体,但在直肠温度下为液体,因此将在直肠中融化以释放药物。此类材料包括例如可可脂和聚乙二醇。

[0533] 本公开的多肽和多肽类似物还可以以脂质体递送系统的形式施用,例如小单层囊泡、大单层囊泡和多层囊泡。脂质体可以由多种磷脂形成,例如但不限于胆固醇、硬脂胺或磷脂酰胆碱。

[0534] 此外,本公开的一些多肽和多肽类似物可与水或者常见的有机溶剂形成溶剂合物。这样的溶剂合物也涵盖在本公开的范围之内。

[0535] 因此,本公开的进一步实施方案提供了一种药物组合物,其包含本文公开的多肽或多肽类似物,或其药学上可接受的盐、溶剂合物或前药,以及一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

## 实施例

[0536] 实施例1

[0537] 膜联蛋白A1 (AnxA1) N端片段的功能评估:单核细胞吞噬作用

[0538] 方法:

[0539] 在全血吞噬测定中评估AnxA1 N端片段。将来自人受试者的全血(45 $\mu$ L)与对照肽Anxa1 2-50(100nM)和测试肽化合物1(100nM)、化合物2(100nM)和化合物3(30nM)或媒介物在96孔板中孵育1小时。将50 $\mu$ L pHrodo大肠杆菌BioParticles缀合物(5 $\mu$ g/孔)添加到孔中,将板在37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>下孵育30分钟。添加150 $\mu$ L 4% PFA,将板在4 $^{\circ}$ C下孵育30分钟。将来自96孔板每个孔的30 $\mu$ L转移到含有500 $\mu$ L RPMI 1640和1 $\mu$ L Vybrant DyeCycle染料的流式细胞管中。将管在37 $^{\circ}$ C和5% CO<sub>2</sub>下孵育30分钟,然后在每个管中添加2.5mL RPMI 1640培养基。

[0540] 在Attune NxT流式细胞仪上获取样品。单核细胞吞噬作用通过pHrodo Green荧光相对于对照样品的增加来确定。

[0541] 对照肽:

- [0542] 对照肽1 (AnxA1 (2-50)) :
- [0543] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVSPYPTFNPSSDV AA (SEQ ID NO:74)
- [0544] 测试肽:
- [0545] 化合物1 (AnxA1 2-29 (V24L)) :
- [0546] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSK (SEQ ID NO:50)
- [0547] 化合物2 (AnxA1 2-34 (V24L)) :
- [0548] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGS (SEQ ID NO:55)
- [0549] 化合物3 (AnxA1 2-39 (V24L)) :
- [0550] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPY (SEQ ID NO:60)
- [0551] 结果:

[0552] 结果如下表1和图1所示。AnxA1 2-50在100nM的浓度下诱导单核细胞吞噬作用。与媒介物相比,AnxA1 2-50诱导的单核细胞吞噬作用几乎增加了2倍。令人惊讶的是,较短的AnxA1 N端片段不仅保留了诱导单核细胞吞噬的能力,而且比AnxA1 2-50诱导的吞噬作用更强(与媒介物相比增加了2.5至3倍)。

[0553] 表1:相对于媒介物的增加倍数

|        |                           | 相对于媒介物的增加倍数 |
|--------|---------------------------|-------------|
|        | Anxa1 2-50                | 1.9         |
| [0554] | 化合物 1 (AnxA1 2-29 (V24L)) | 2.6         |
|        | 化合物 2 (AnxA1 2-34 (V24L)) | 2.8         |
| [0555] | 化合物 3 (AnxA1 2-39 (V24L)) | 2.9         |

[0556] 实施例2

[0557] 膜联蛋白A1 (AnxA1) N端片段的功能评估:中性粒细胞趋化作用方法:

[0558] 在从健康志愿者的血沉棕黄层 (buffy coats) 中分离的多形核白细胞 (PMN) 中,对AnxA1 N端片段进行评估。将PMN悬浮在迁移培养基 (RPMI1640 (ATCC, Cat.No.30-2001) + 0.05% BSA-FAF) 中,浓度为 $5.5 \times 10^6$ 个细胞/mL。

[0559] 向Transwell板的接收孔中添加200 $\mu$ L含有10 $\mu$ M化合物1、2或3的迁移培养基。插入供体板,将75 $\mu$ L细胞悬液添加至上孔中(375,000个细胞/孔)。将板孵育1小时(37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、95%湿度)。通过从板中去除具有细胞的Transwell插入物而终止迁移,然后添加200 $\mu$ L CellTiter Glo试剂至下孔中,来评估迁移细胞的数量。将板在黑暗中(室温)孵育10分钟,然后将200 $\mu$ L转移到白色96孔板(Lumitrac 200)中。使用EnVision 2104(Perkin Elmer)测量发光(曝光时间0.1秒)

[0560] 通过计算与阴性对照(媒介物)相比的倍数变化来估计趋化性反应。

[0561] 测试肽:

[0562] 化合物1 (AnxA1 2-29 (V24L)):

[0563] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSK (SEQ ID NO:50)

[0564] 化合物2 (AnxA1 2-34 (V24L)):

[0565] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGS (SEQ ID NO:55)

[0566] 化合物3 (AnxA1 2-39 (V24L)):

[0567] AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTLKSSKGGPGSAVSPY (SEQ ID NO:60)

[0568] 结果:

[0569] 结果如下表2和图2所示。浓度为10 $\mu$ M时,与媒介物相比,所有三种测试的AnxA1 N端片段均增加了PMN趋化性。化合物1 (AnxA1 2-29 (V24L))的效果最强,与媒介物相比,其诱导趋化性增加了3倍。化合物2 (AnxA1 2-34 (V24L))和化合物3 (AnxA1 2-39 (V24L))分别诱导PMN趋化性增加2倍和1.6倍。

[0570] 表2:相对于媒介物的倍数增加

| [0571] |                           | 相对于媒介物的倍数增加 |
|--------|---------------------------|-------------|
|        | 化合物 1 (AnxA1 2-29 (V24L)) | 3.1         |
|        | 化合物 2 (AnxA1 2-34 (V24L)) | 2.0         |
|        | 化合物 3 (AnxA1 2-39 (V24L)) | 1.6         |

[0572] 实施例3

[0573] AnxA1 N端片段的药理学表征

[0574] 方法:

[0575] 将共表达线粒体apoeaquin和重组人2型甲酰胺受体 (FPR2) 的重组细胞在不含抗生素的培养基中培养18小时,然后进行测试。然后用PBS-EDTA (5mM EDTA) 轻柔冲洗细胞以使细胞脱壁,离心回收细胞,并重悬在测定缓冲液 (DHEM/HAM's F12与HEPES和0.1%无蛋白酶BSA) 中。将细胞重悬于测定缓冲液中后,在室温下用腔肠素h (coelenterazine h, 来自Molecular Probes) 孵育细胞至少4小时,然后进行对受体功效的剂量反应研究。

[0576] 然后将50 $\mu$ l细胞悬液注入96孔板中浓度逐渐增加的50 $\mu$ l测试或对照化合物(溶于PBS/0.5% BSA,最后从1mM储备液稀释),室温下孵育30分钟。使用Hamamatsu功能性药物筛选系统6000 (FDSS6000) 记录产生的光发射。为了标准化各个板之间和实验之间的记录光发射,将100 $\mu$ M毛地黄皂苷 (digitonin) 或20 $\mu$ M ATP添加到一些孔中。

[0577] 激动剂活性以用内部对照化合物获得的最大活性的百分比表示。测试化合物的测试浓度范围为10<sup>-11</sup>至10<sup>-5</sup>M。数据以平均值表示。EC50 (即引起50%最大反应的浓度) 是使用

graph pad软件(版本6.0)进行对数转换后通过最佳拟合分析确定的。

[0578] 对照肽

[0579] 对照肽1 (AnxA1 (2-26)) :

[0580] Ac-Ala-Met-Val-Ser-Glu-Phe-Leu-Lys-Gln-Ala-Trp-Phe-Ile-Glu-Asn-Glu-Glu-Gln-Glu-Tyr-Val-Gln-Thr-Val-Lys-OH (SEQ ID NO:71)

[0581] 对照肽2 (AnxA1 (2-12)) :

[0582] Ac-Ala-Met-Val-Ser-Glu-Phe-Leu-Lys-Gln-Ala-Trp-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:72)

[0583] 对照肽3 (W-肽) :

[0584] Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met (SEQ ID NO:73)

[0585] 测试肽类似物:

[0586] 类似物1 (AnxA1 (2-27)) :

[0587] Ac-Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu Asn Glu Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Val Lys Ser (SEQ ID NO:2)

[0588] 类似物2 (AnxA1 (2-31)) :

[0589] Ac-Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu Asn Glu Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Val Lys Ser Ser Lys Gly Gly (SEQ ID NO:6)

[0590] 类似物3 (AnxA1 (2-35)) :

[0591] Ac-Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu Asn Glu Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Val Lys Ser Ser Lys Gly Gly Pro Gly Ser Ala (SEQ ID NO:10)

[0592] 类似物4 (AnxA1 (2-39)) :

[0593] Ac-Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu Asn Glu Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Val Lys Ser Ser Lys Gly Gly Pro Gly Ser Ala Val Ser Pro Tyr (SEQ ID NO:14)

[0594] 类似物5 (AnxA1 (2-43)) :

[0595] Ac-Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu Asn Glu Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Val Lys Ser Ser Lys Gly Gly Pro Gly Ser Ala Val Ser Pro Tyr Pro Thr Phe Asn (SEQ ID NO:18)

[0596] 类似物6 (AnxA1 (2-47)) :

[0597] Ac-Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu Asn Glu Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Val Lys Ser Ser Lys Gly Gly Pro Gly Ser Ala Val Ser Pro Tyr Pro Thr Phe Asn Pro Ser Ser Asp (SEQ ID NO:21)

[0598] 类似物7 (AnxA1 (2-54)) :

[0599] Ac-Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu Asn Glu Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Val Lys Ser Ser Lys Gly Gly Pro Gly Ser Ala Val Ser Pro Tyr Pro Thr Phe Asn Pro Ser Ser Asp Val Ala Ala Leu His Lys Ala (SEQ ID NO:24)

## 单核细胞吞噬作用

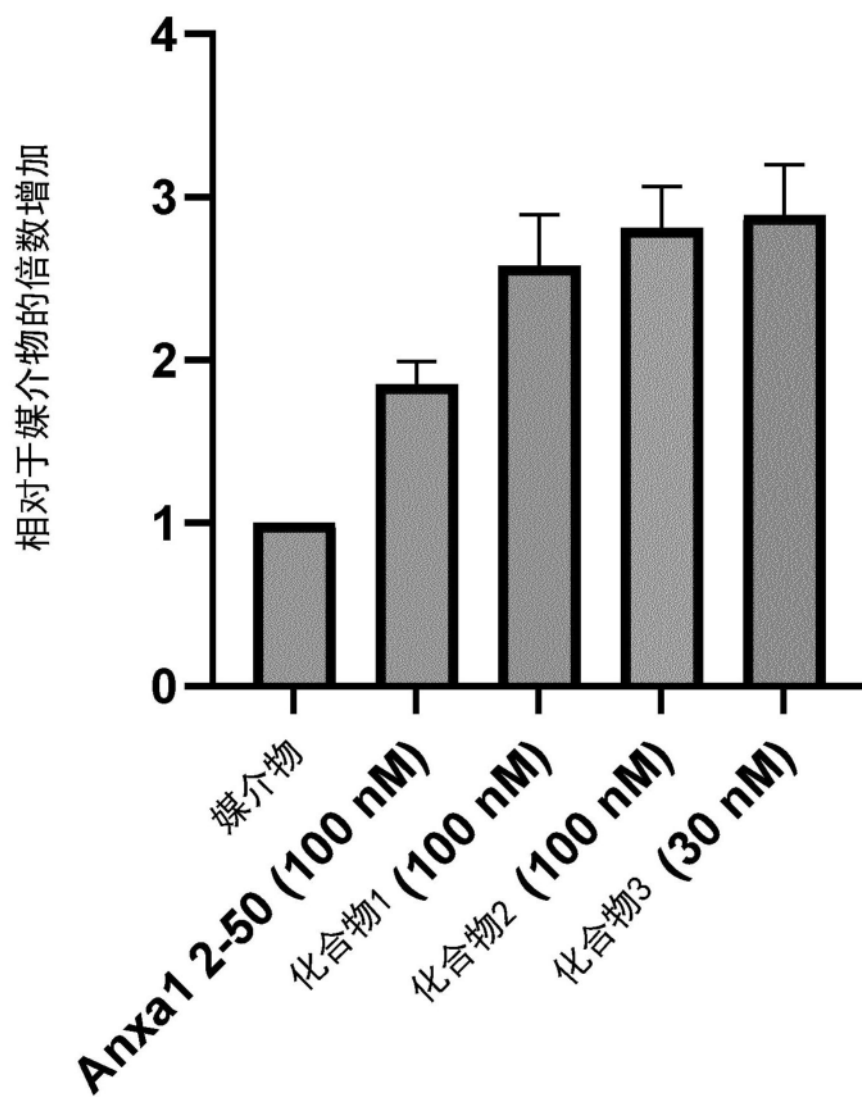


图1

## 中性粒细胞趋化作用

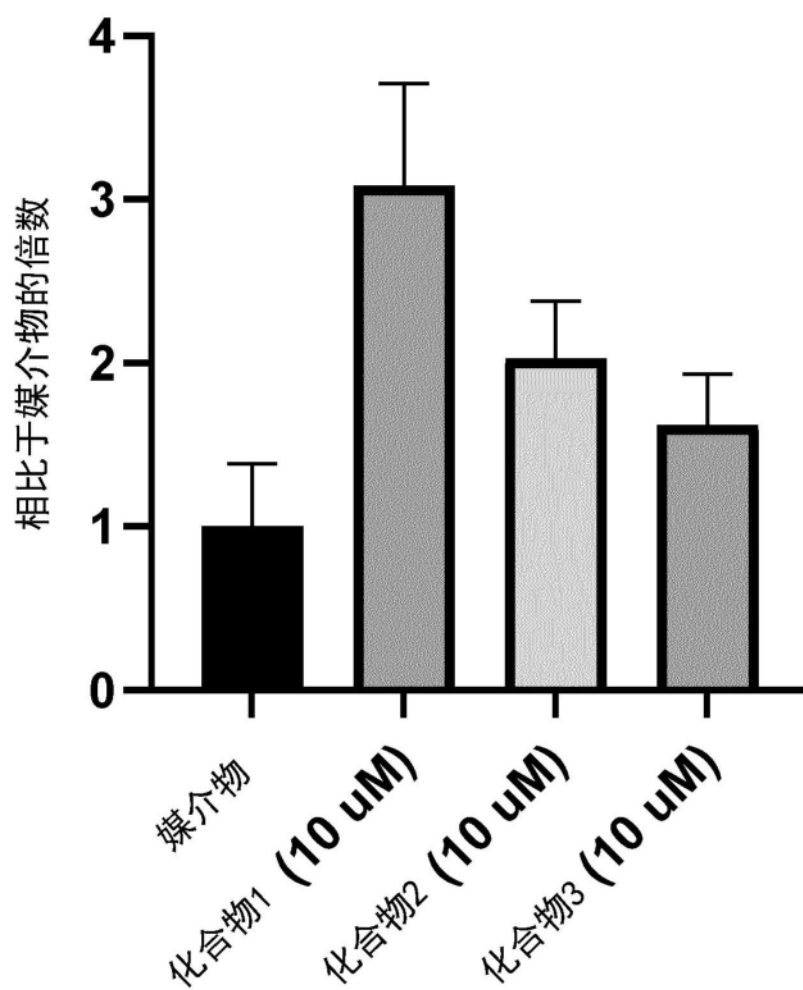


图2