



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118202043 A

(43) 申请公布日 2024. 06. 14

(21) 申请号 202280070606.5

(22) 申请日 2022.10.21

(30) 优先权数据

21204274.1 2021.10.22 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.04.19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/079429 2022.10.21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/067167 EN 2023.04.27

(71) 申请人 英图库尔公司

地址 瑞典隆德

(72) 发明人 A·施米特兴 G·彼得鲁克

(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.

C12N 9/74 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

权利要求书3页 说明书55页
序列表(电子公布) 附图31页

(54) 发明名称

具有多价作用的肽

(57) 摘要

本发明涉及在两个不相邻的内部氨基酸的侧链之间包含至少一个内部共价连接的凝血酶衍生肽。所述肽具有抗炎作用。

1. 一种肽,其包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶的10至23个氨基酸范围内的连续序列,所述连续序列含有至多6个氨基酸取代,其中所述肽:

i) 总长度为10至40个氨基酸之间;

ii) 包含至少一个位于两个不相邻的内部氨基酸的侧链之间的内部共价连接,其中所述氨基酸表示为 X_1 和 X_2 ;和

iii) 至少包含SEQ ID NO:1的凝血酶的氨基酸K247、K248和K252;

条件是,如果所述肽的总长度为24至40个氨基酸之间,则它包含至少两个位于两个不相邻的内部氨基酸的侧链之间的内部共价连接,其中第一内部共价连接的氨基酸表示为 X_1 和 X_2 ,第二内部共价连接的氨基酸表示为 X_3 和 X_4 。

2. 根据权利要求1所述的肽,其中所述肽至少包含SEQ ID NO:1的凝血酶的氨基酸R245、K247、K248和K252。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的肽,其中所述肽的总长度为10至23个氨基酸。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的肽,其中所述肽的总长度为13至23个氨基酸。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的肽,其中所述肽包含以下氨基酸序列或由以下氨基酸序列组成:

$-U-U-(Z)_n-I-Q-K-V-I-D-Q-(Z)_m-$

其中

每个Z单独地是任何常规氨基酸;并且

U是His、Lys或Arg;并且

n为0至10范围内的整数;并且

m为0至5范围内的整数,并且

其中所述氨基酸中的两个已被烯基化氨基酸取代,所述烯基化氨基酸的侧链通过共价连接而连接。

6. 根据权利要求1所述的肽,其中氨基酸 X_1 位于位置n,氨基酸 X_2 位于位置n+3或位置n+4或位置n+5或位置n+6或位置n+7或位置n+8或位置n+9或位置n+10或位置n+11,其中n为2至18范围内的整数。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的肽,条件是,当将所述肽的序列与SEQ ID NO:12的GKY25的序列进行比对时,则:

a) X_1 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Arg11对齐

b) X_1 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Lys14对齐

c) X_2 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Lys14对齐;和

d) X_2 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Lys18对齐;和

e) 当 X_1 与SEQ ID NO:12的Lys18对齐时, X_2 不与Gln22对齐。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的肽,其中所述共价连接是炔键。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的肽,其中 X_1 和 X_2 是烯基化氨基酸,例如两个C-烯基化氨基酸,例如两个 α -取代的烯基氨基酸和/或 α,α -二取代的烯基氨基酸,并且所述共价连接是在所述烯基残基之间形成的烯炔系链。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的肽,其中 X_3 和 X_4 通过内酰胺桥共价连接,任选地,其中所述内酰胺桥在 X_3 的N-端氨基与 X_4 的侧链羧酸之间形成。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_1 和/或 X_2 通过系链连接, 其中所述系链是从C- α 碳开始计算的10个碳原子的烯烃链。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的肽, 其中所述内部烃钉通过连接两个(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸而形成。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的肽, 其中所述肽的长度为14至22个氨基酸之间, 例如13至18个氨基酸之间, 例如15至21个氨基酸之间, 例如16至20个氨基酸之间, 例如17至20个氨基酸之间。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的肽, 其中所述肽还包含在所述肽的末端处或接近所述肽的末端处插入的1至5个带正电荷的氨基酸, 例如1至4个、例如1至3个、例如1至2个、例如2个带正电荷的氨基酸。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的肽, 其中所述肽包含在所述肽的N-端处或接近所述肽的N-端处、例如在选自相对于所述肽的N-端的位置1、2和/或3的位置处插入的2个带正电荷的氨基酸。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的肽, 其中所述肽由SEQ ID NO:1的凝血酶的15至20个连续氨基酸和2至5个另外的N-端氨基酸组成, 其中所述15至20个连续氨基酸中的2个氨基酸已被形成内部烃钉的烯基化氨基酸取代。

17. 根据前述权利要求中任一项所述的肽, 其中所述肽包含如下所示的序列或由如下所示的序列组成:

- i) SEQ ID NO:3
- ii) SEQ ID NO:4
- iii) SEQ ID NO:5
- iv) SEQ ID NO:6
- v) SEQ ID NO:7
- vi) SEQ ID NO:8;
- vii) SEQ ID NO:9;
- viii) SEQ ID NO:10;
- ix) SEQ ID NO:11;
- x) SEQ ID NO:14;
- xi) SEQ ID NO:17;
- xii) SEQ ID NO:18;
- xiii) SEQ ID NO:19;
- xiv) SEQ ID NO:20;
- xv) SEQ ID NO:21;
- xvi) SEQ ID NO:22;
- xvii) SEQ ID NO:23;
- xviii) SEQ ID NO:24;
- xix) SEQ ID NO:25; 或者
- xx) SEQ ID NO:26;

其中 X_1 和 X_2 是通过共价连接而连接的氨基酸, 并且其中 X_3 和 X_4 是通过共价连接而连接的

氨基酸。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的肽, 其中所述肽包含如下所示的序列或由如下所示的序列组成:

- i) SEQ ID NO:3;
- ii) SEQ ID NO:5;
- iii) SEQ ID NO:6; 或者
- iv) SEQ ID NO:7,

其中 X_1 和 X_2 是侧链通过共价连接而连接的氨基酸, 任选地, 其中 X_1 和 X_2 是(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸, 其侧链已经彼此反应以形成烯基系链, 进一步任选地, 其中 X_1 和 X_2 是Ala, 其侧链通过包含一个双键的 C_8 烯基系链彼此共价结合。

19. 根据前述权利要求中任一项所述的肽, 其中所述肽包含如下所示的序列或由如下所示的序列组成:

- i) SEQ ID NO:3;
- ii) SEQ ID NO:5;

其中 X_1 和 X_2 是(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸, 其侧链已经彼此反应以形成烯基系链, 任选地, 其中 X_1 和 X_2 是Ala, 其侧链通过包含一个双键的 C_8 烯基系链彼此共价结合。

20. 根据前述权利要求中任一项所述的肽, 在体外在LPS刺激的血液中将TNF- α 释放减少50%的肽浓度下, 所述肽在新鲜全血中具有至多10%的溶血活性, 优选至多5%的溶血活性。

21. 根据前述权利要求中任一项所述的肽, 用作药物。

22. 根据前述权利要求中任一项所述的肽, 用于治疗 and/或预防有需要的个体中的炎症 and/或感染的方法中。

23. 根据权利要求22所述的肽, 其中所述肽用于治疗或预防选自以下的疾病的方法中: 急性炎症、脓毒症、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、全身炎症反应综合征(SIRS)、慢性阻塞性肺病(COPD)、囊性纤维化、哮喘、过敏性鼻炎及其他类型的鼻炎、血管炎、血栓形成、弥散性血管内凝血(DIC)、胃肠炎和肺部炎症。

具有多价作用的肽

技术领域

[0001] 本发明属于用于治疗炎症和/或感染的肽领域。具体地,本发明提供了具有良好稳定性、高抗炎活性和/或抗微生物活性的肽。

背景技术

[0002] Toll-样受体4 (TLR4) 感知的脂多糖 (LPS) 对于感染的早期应答至关重要,随后的NF κ B激活会导致与脓毒症和ARDS相关的多种生物学效应,包括释放细胞因子、趋化因子以及随后有害的止血障碍,导致凝血因子和其他介导物的消耗。有趣的是,刺突糖蛋白作为SARS-CoV-2的主要细胞外蛋白在体外和动物模型中增强LPS应答,为COVID-19期间观察到的ARDS提供了分子解释 (Petruk等人, JMCB, 2020), 其中不受控制的LPS应答引起过度的局部化炎症,但也会引起严重的对感染的全身性应答。因此,尽管LPS的感知对于初始的宿主防御应答是重要的,但为了避免过度炎症和器官损伤,该分子的清除和控制也至关重要。

[0003] 目前基于抗生素和抗病毒药的治疗仅针对微生物,而不针对伴随的免疫应答的过度激活,例如脓毒症中所观察的情况。在美国这是导致死亡的主要原因之一,每年估计有超过700,000例病例,脓毒性休克患者的死亡率为30-50%。因此,不仅针对目标细菌还针对过度的免疫应答的基于天然的自身先天防御策略的治疗概念可能具有显著的治疗潜力。大约2kDa的凝血酶衍生的C-端肽 (TCP) 已被证明在体外和体内发挥抗内毒素功能。这些较小的肽属于宿主防御肽 (HDP) 的不同家族,其中包括中性粒细胞衍生的 α -防御素和cathelicidin LL-37,它们已知都具有免疫调节活性。包含天然TCP的序列的TCP-25 (SEQ ID NO:12) 已被证明可在体外中和LPS,并在实验动物模型中保护对抗铜绿假单胞菌 (*P.aeruginosa*) 脓毒症和LPS介导的休克,这主要通过减少全身性细胞因子应答来实现 (Kalle等人, PLOS One, 2011)。

[0004] TCP-25与LPS结合,直接与单核细胞和巨噬细胞相互作用,并干扰CD14信号传导和TLR4/MD2二聚化,从而抑制响应于微生物衍生的激动剂和完整细菌的TLR4-和TLR2-诱导的NF- κ B激活 (Saravanan等人, Nat Comm, 2018)。TCP除了与细菌膜和LPS相互作用外,还与CD14的LPS结合沟结合 (Saravanan等人, Nat Comm, 2018)。TCP对LPS和CD14发挥多种相对弱的亲和力 (全部在 μ M范围内) 这一事实,能够调节宿主对感染的应答。TCP与瞬态药物 (transient drug) 共有许多特征,由它们的多价、多靶点、高解离率和 μ M水平的 K_d 值所定义,因此TCP在开发受自然启发的新型抗炎疗法方面引起了人们的兴趣。

[0005] 然而,与许多基于肽的疗法一样,TCP-25会被内源蛋白酶降解 (Puthia等人, 2020)。对于诸如脓毒症和ARDS的需要全身应用或吸入应用的疾病,快速降解的肽需要令人生畏的大剂量和频繁施用。此外,从药理学角度来看,提高与其靶受体CD14的亲和力是有利的,如此可降低所需的有效浓度。最后,由于TCP-25形成寡聚物并在较高浓度下聚集,从药物递送的角度来看改善溶解度是有利的。

发明内容

[0006] 本发明提供了具有多种有利特性的肽,所述特性包括以下一种或多种:

[0007] • 高体内稳定性

[0008] • 在蛋白酶(例如人中性粒细胞弹性蛋白酶(HNE)、假单胞菌弹性蛋白酶(PE)和/或胰蛋白酶)的存在下,具有增加的稳定性

[0009] • 高抗炎活性,例如通过炎症细胞因子例如TNF- α 和/或IL-1 β 的释放减少或NF- κ B活性降低来确定

[0010] • 抗微生物活性,例如针对革兰氏阴性菌和/或革兰氏阳性菌的杀菌活性

[0011] • 在血液中具有低溶血活性

[0012] • 对RBC的低溶血活性

[0013] • 低毒性

[0014] 特别地,本发明的肽在具有高抗炎活性的浓度下在血液中具有低溶血活性。

[0015] 本发明的优选肽具有所有上述特性。高体内稳定性、增加的对蛋白酶的稳定性以及低溶血活性使得本发明的肽特别可用于全身施用。具体地,本发明提供了肽,其在具有高抗炎活性的浓度下对红细胞(RBC)具有低溶血活性。

[0016] 更具体地,本发明的肽基于凝血酶衍生肽(thrombin derived peptide),其结构已被两个不相邻氨基酸之间的共价连接锁定。有趣的是,本发明的肽具有多个(优选全部)上述有利特性。许多线性凝血酶衍生肽都具有抗炎和抗微生物活性,但它们的体内稳定性通常较低。

[0017] 具有稳定化结构的本发明的肽通常包含螺旋结构。它们可具有稳定化的蛋白酶抗性结构,发挥抗微生物活性,并且通常具有改善的抗炎功效。因此,本发明的肽是令人感兴趣的先导抗炎肽模拟物。与天然TCP相比,所述肽通常具有较低的寡聚化倾向。药物的寡聚化是一种众所周知的现象,它会导致聚集、降低功效并增加延迟性免疫反应的风险。因此,本发明的肽通常表现出显著较少的寡聚化,这从药物角度来看是有利的。

[0018] 内源性TCP HVF18在低pH条件下对LPS具有较高的亲和力。本发明的优选肽在N-端具有增加的极性和电荷,例如通过添加阳离子K和R残基。通过采用核磁共振波谱(NMR)、生物物理、质谱、微生物学、细胞和体内研究的组合,本发明表明,与可具有高毒性和降低的抗炎活性的具有较长阳离子延伸的肽对比,电荷增加、特别是电荷增加+2可以产生最佳功效和高治疗指数。

[0019] 肽钉合(stapling of peptides)可以改善其蛋白水解稳定性,然而,令人惊讶的是,某些凝血酶衍生肽的钉合还导致不期望的效果。例如,GKY25在单个位置的钉合会产生具有高溶血活性的肽,这是不希望的。与未钉合的GKY25相比,GKY25在单个位置的钉合进一步导致肽的抗炎作用降低。

[0020] 令人惊奇的是,本发明公开了与较长的肽例如GKY25相比,总长度为10至23个氨基酸、例如13至23个氨基酸的较短的凝血酶衍生肽具有大部分并且通常是全部上述有利特性。

[0021] 此外,本发明公开了长度为24至40个氨基酸的较长的凝血酶衍生肽在至少两个位置处的钉合使得所述肽具有一些上述有利特性。

[0022] 本发明还表明,包含另外的带正电荷的氨基酸的肽具有甚至更好的抗炎作用。

[0023] 此外,本发明的肽还可以具有抗凝血活性。本发明表明,包含另外的带正电荷的氨基酸的肽可以具有甚至更好的抗凝血活性。

[0024] 本发明提供了包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶的10至23个氨基酸范围内的含有至多6个氨基酸取代的连续序列的肽,其中所述肽:

[0025] i) 总长度在10至40个氨基酸之间;

[0026] ii) 在两个不相邻的内部氨基酸的侧链之间包含至少一个内部共价连接,其中所述氨基酸表示为 X_1 和 X_2 ;和

[0027] iii) 至少包含SEQ ID NO:1的凝血酶的氨基酸K247、K248和K252;

[0028] 条件是,如果所述肽的总长度在24至40个氨基酸之间,则它在两个不相邻的内部氨基酸的侧链之间包含至少两个内部共价连接,其中第一内部共价连接的氨基酸表示为 X_1 和 X_2 ,并且第二内部共价连接的氨基酸表示为 X_3 和 X_4 。

附图说明

[0029] 图1:对完整肽和用不同蛋白酶消化不同时间长度的肽进行SDS-PAGE。显示了来自3个独立实验的一张代表图($n=3$)。

[0030] 图2:a:在存在或不存在浓度增加的线性和钉合的GKY25的情况下,用 100ng ml^{-1} 大肠杆菌LPS刺激后20小时,所刺激的THP1-XBlue-CD14报告细胞中的NF- κ B激活和细胞活力。结果以4次实验的平均值 $\pm$ SD($n=4$)表示。显著性使用GraphPad Prism软件通过普通双向ANOVA分析和其后的Tukey多重比较检验来确定。b:在存在或不存在浓度增加的GKY25和sGKY25的情况下,用 100ng ml^{-1} 大肠杆菌LPS刺激后24小时,所刺激的人血液中释放的细胞因子。结果以平均值 $\pm$ SEM表示。每次使用来自不同供体的血液($n=4$)。显著性使用GraphPad Prism软件通过普通双向ANOVA和其后的Tukey多重比较检验来确定。

[0031] 图3:左图:在存在或不存在浓度增加的HVF18和sHVF18的情况下,用 100ng ml^{-1} 大肠杆菌LPS刺激后20小时,所刺激的THP-1单核细胞中的NF- κ B激活和细胞活力。结果以4次实验的平均值 $\pm$ SD($n=4$)表示。显著性使用GraphPad Prism软件通过普通双向ANOVA分析和其后的Tukey多重比较检验来确定。右图:在存在或不存在浓度增加的HVF18和sHVF18的情况下,用 100ng ml^{-1} 大肠杆菌LPS刺激后24小时,所刺激的人血液中释放的细胞因子。结果以平均值 $\pm$ SEM表示。每次使用来自不同供体的血液($n=4$)。显著性使用GraphPad Prism软件通过普通双向ANOVA和其后的Tukey多重比较检验来确定。

[0032] 图4:热图显示了所述肽对红细胞(RBC)或全血的溶血活性。数字表示溶血活性百分比。数据以3次独立实验的平均值表示,每次实验使用来自不同供体的血液进行($n=3$)。A) GKY25和sGKY25, B) HVF18和sHVF18。

[0033] 图5显示了钉合对肽的抗炎活性的影响。a,在存在或不存在NaCl的情况下,通过MST获得的CD14和GKY25、HVF18或sHVF18之间的代表性结合曲线。Kd根据MST曲线计算。数据以6次不同测量的平均值 $\pm$ SD表示($n=6$)。显著性使用GraphPad Prism软件通过普通双向ANOVA和其后的Tukey多重比较检验来确定。

[0034] 图6显示了线性和钉合的HVF18的抗炎活性。a,在存在或不存在 $10\mu\text{M}$ 线性和钉合的HVF18的情况下,用 100ng ml^{-1} 大肠杆菌LPS(LPS_{Ec})、 $1\mu\text{g ml}^{-1}$ 金黄色葡萄球菌LTA(LTA_{Sa})、 $1\mu\text{g ml}^{-1}$ 大肠杆菌PGN(PGN_{EB})、 $1\mu\text{g ml}^{-1}$ 金黄色葡萄球菌PGN(PGN_{Sa})、 $10\mu\text{g ml}^{-1}$ 酿酒酵母酵母聚

糖 (Zym_{sc}) 刺激后20小时,所刺激的THP1-XBlue-CD14报告细胞中的NF- κ B激活和细胞活力。结果以4次实验的平均值 $\pm$ SD (n=4) 表示。显著性使用GraphPad Prism软件通过普通双向ANOVA和其后的Dunnett多重比较检验来确定。

[0035] 图7显示了线性和钉合的HVF18在血液中的抗炎活性。a,用100ng ml⁻¹大肠杆菌LPS与剂量增加的HVF18或sHVF18的混合物刺激后24小时,从所刺激的人血液中释放的细胞因子。b,人血液用100ng ml⁻¹大肠杆菌LPS刺激30分钟,然后在刺激后24小时用剂量增加的HVF18或sHVF18一起孵育,从如此处理后的人血液中释放的细胞因子,结果以平均值 $\pm$ SEM表示。每次使用来自不同供体的血液 (n=4)。显著性使用GraphPad Prism软件通过普通双向ANOVA和其后的Tukey多重比较检验来确定。

[0036] 图8显示了钉合的肽对实验小鼠模型中内毒素反应的影响。a,在NF- κ B报告小鼠中通过IVIS进行的代表性体内炎症成像。将HVF18或sHVF18与LPS混合,然后立即皮下注射到转基因BALB/cTg (NF- κ B-RE-luc) -Xen报告小鼠的背部。在皮下沉积后3-6-24小时使用IVIS Spectrum生物成像系统获得体内成像。条形图显示所测量的从这些小鼠发出的生物发光强度。数据表示为平均值 $\pm$ SEM (每组n=8)。P值使用Mann-Whitney U检验确定。b,C57BL/6小鼠用腹膜内 (i.p.) 施用亚致死剂量的LPS刺激然后用sHVF18 i.p. 处理,8小时和20小时后从所述C57BL/6小鼠收集的血浆释放的细胞因子。数据表示为平均值 $\pm$ SEM (每个圆圈代表一只小鼠)。P值使用Dunnett的多重比较检验和随后的普通单向ANOVA确定。

[0037] 图9显示了线性和钉合的肽对实验小鼠模型中内毒素反应的影响。在NF- κ B报告小鼠中通过IVIS进行代表性体内炎症成像。200 μ g HVF18或sHVF18与25g LPS混合,然后立即皮下注射到转基因BALB/cTg (NF- κ B-RE-luc) -Xen报告小鼠的背部。在皮下沉积后3-6-24小时使用IVIS Spectrum生物成像系统获得体内成像。条形图显示所测量的从这些小鼠发出的生物发光强度。数据表示为平均值 $\pm$ SEM (每组n=5)。P值使用Mann-Whitney U检验确定。b,C57BL/6小鼠用i.p. 给予的亚致死剂量的LPS刺激,然后用i.p. 给予的剂量增加的sHVF18进行治疗,20小时后从所述小鼠收集的血浆释放的细胞因子。数据表示为平均值 $\pm$ SEM (每个圆圈代表一只小鼠)。P值使用Dunnett多重比较检验和随后的普通单向ANOVA确定。

[0038] 图10显示了钉合对HVF18抗菌活性的影响。a,热图显示了通过RDA确定的浓度增加的HVF18和sHVF18的抗菌活性。在不存在和存在NaCl的情况下,对大肠杆菌、铜绿假单胞菌01和金黄色葡萄球菌的活性进行了评估。数据以清除区域 (zone of clearance) 的形式呈现。每个框中的灰度和值代表平均值 (n=4)。b,HVF18和sHVF18在单独或补充有NaCl或25%人血浆的Tris缓冲液中的杀伤作用,通过VCA评估。数据表示为平均值 $\pm$ SEM (n=4)。c,通过VCA评估的sHVF18在Tris缓冲液中对金黄色葡萄球菌的杀伤作用。数据表示为平均值 $\pm$ SEM (n=4)。d-e,HVF18和sHVF18对大肠杆菌、铜绿假单胞菌01和金黄色葡萄球菌 (e) 以及铜绿假单胞菌01和金黄色葡萄球菌的临床分离株 (f) 的MIC值。实验重复4次,结果相似 (n=4)。

[0039] 图11显示了sHVF18及其K和R变体的二级结构的评估。所有肽均在pH 7.4的10mM Tris中从1mM储备液稀释至最终浓度10 μ M。光谱是在25 $^{\circ}$ C下获得的。结果以三个不同实验的平均值表示。

[0040] 图12显示了不同钉合肽的体外溶血特性的评估。直方图显示了不同浓度的sHVF18 K和R变体对红细胞 (a) 或全血 (b) 的溶血活性。数据是四次独立实验 (显示为点) 的平均值 $\pm$ SD。(c) 中报道了GKY25、sGKY25和2sGKY25对全血的溶血活性。数据是两次独立实验的平均

值 $\pm$ SD。在所有图中,虚线代表100 μ M sHVF18的溶血活性,而点线对应于10%的裂解。

[0041] 图13显示了sHVF18及其K和R变体在THP-1-XBlue-CD14报告细胞中的抗炎活性的评估。在存在或不存在浓度增加的K (a) 和R (b) sHVF18变体的情况下,THP-1单核细胞用100ng ml⁻¹大肠杆菌LPS刺激,刺激后20小时在所刺激的THP-1单核细胞中的NF- κ B激活和细胞活力。结果以4次实验的平均值 $\pm$ SD表示(n=4)。使用在LPS存在下的10 μ M sHVF18进行比较。

[0042] 图14显示了钉合肽在人血液中的抗炎活性的评估。在存在或不存在浓度增加的K (a) 和R (b) sHVF18变体或GKY25及其钉合变体 (c) 的情况下,人血液用100ng ml⁻¹大肠杆菌LPS刺激,刺激后24小时从所刺激的人血液释放的细胞因子。结果以平均值 $\pm$ SEM表示。每次使用来自不同供体的血液(n=4)。

[0043] 图15显示了sHVF18及其K和R变体在小鼠内毒素模型中的抗炎活性的评估。C57BL/6小鼠用亚致死剂量的LPS刺激并在30分钟后用10 μ gsHVF18、sKVF18、sKKVF18、sRVF18或sRRVF18处理。20小时后,用异氟烷深度麻醉小鼠,并通过心脏穿刺收集血液。细胞因子释放概况以直方图的形式报告。数据表示为平均值 $\pm$ SEM(n=7,一部分sHVF18和LPS的n=13和未处理的n=2)。P值使用Dunnett多重比较检验和随后的普通单向ANOVA确定。

[0044] 图16显示了sHVF18 K和R变体的抗菌活性评估。热图显示了RDA测定的浓度增加的所述肽的抗微生物活性。在不存在 (a) 和存在 (b) NaCl的情况下,对大肠杆菌、铜绿假单胞菌01 (PA01) 和金黄色葡萄球菌的活性进行了评估。数据以清除区域的形式呈现,单位为mm。每个框中的灰度和值代表平均值(n=4)。

[0045] 图17显示了sHVF18 K和R变体在溶液中的抗菌活性的评估。通过VCA评估sHVF18及其变体在单独 (a) 或补充有NaCl (b) 的pH7.4的10mM Tris中对大肠杆菌、铜绿假单胞菌01 (PA01) 和金黄色葡萄球菌的杀菌效果。数据表示为平均值 $\pm$ SEM(n=4)。

[0046] 图18显示了不同肽对凝血的影响。向人柠檬酸盐血浆中添加如图所示的浓度增加的不同钉合肽后,测定活化部分凝血酶时间(aPTT)和凝血酶原时间(PT)(n=2)。

[0047] 图19显示了不同肽的流体动力学半径(Rh),作为寡聚化的量度。将肽以1mM的终浓度重悬于pH7.4的10mM Tris或pH5.0的10mM NaOAc中。每个样品使用30 μ L用于测量溶液中颗粒的流体动力学半径(单位nm)。对于每个样品,使用多模态模式,用10次子运行(sub-runs)记录3次光谱。每个实验进行3次(n=3)。P值使用单向ANOVA和Tukey多重比较检验确定。**P $\leq$ 0.01,***P $\leq$ 0.0001。

[0048] 图20显示了具有改善的抗炎活性的钉合肽的选择。a,热图显示肽对全血或红细胞(RBC)的溶血活性。对来自4个不同供体的红细胞或血液进行的实验的数据以平均值(n=4)表示。b,热图显示了在存在或不存在浓度增加的不同肽的情况下,人血液用100ng ml⁻¹大肠杆菌LPS刺激,刺激后24小时从所刺激的人血液释放的细胞因子。结果以平均值表示。每次使用来自不同供体的血液(n=4)。c,组合来自(a)和(b)的数据获得的图,肽的溶血活性表示为该肽对所示不同细胞因子的IC₅₀的函数。对于IC₅₀>10的肽,显示了20 μ M时的溶血活性。d,肽的溶血活性与其对TNF- α 的IC₅₀的函数。该图总结了如实施例1和2中所述获得的结果。对于IC₅₀>10 μ M的肽,当确切的IC₅₀未知时,选择显示50 μ M时的溶血活性。

[0049] 图21显示了sKKW13的K和R变体的溶血和抗炎活性。a,热图显示肽对全血的溶血活性。对来自4个不同供体的血液进行的实验的数据以平均值(n=4)表示。b,热图显示了在存

在或不存在浓度增加的不同肽的情况下,人血液用 100ng ml^{-1} 大肠杆菌LPS刺激,刺激后24小时从所刺激的人血液释放的细胞因子。结果以平均值表示。每次使用来自不同供体的血液($n=4$)。

[0050] 图22显示静脉内施用sHVF18改善了猪的脓毒症样病况并阻碍了严重ARDS状态的发展。该图显示了用和不用sHVF18治疗的患有急性肺损伤和ARDS的猪的结果。(a)图显示了实验设置的概述。在机械通气中对猪进行麻醉,并使用动脉管线和swan-Ganz插管进行连续监测。静脉内给予LPS,并且经处理的动物接受sHVF18。在实验过程中连续跟踪血流动力学、生命体征和肺气体交换。(b)显示了治疗猪($n=5$)和未治疗猪($n=5$)的肺气体交换,以 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 比率表示。所有未经治疗的动物均发展轻度至中度ARDS。在未治疗的动物中可见心输出量显著增加(c)、尿输出量显著减少(d)、肌力支持(inotropic support)的需求显著增加(e)以及乳酸盐水平显著增加(f),这表明处于脓毒症样病况的严重阶段,但在接受治疗的动物中则未见到这些情况。(g)健康对照($n=5$) (左)、未经治疗(中) ($n=5$)和经sHVF18治疗(右) ($n=5$)的肺的 $n=15$ 个苏木精和伊红(H&E)组织学样品的代表图像。较大图像中的比例尺为 0.5mm 。调取部分显示了比例尺为 0.2mm 的组织的大部分。(h)组织学累积盲法评分的结果。未治疗组和治疗组之间的统计学显著差异通过双侧学生T检验得到,组内检验使用双侧ANOVA。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$ 。所有值均代表平均值 $\pm$ 标准偏差。

[0051] 图23显示了钉(staple)的位置的计算机分析。(a)HVF18对接在CD14上,N-端GKYGFYT残基经建模以形成GKY25肽。使用MMPBSA计算GKY25与CD14的结合能。所示的氨基酸被戊烯基丙氨酸取代,并添加钉以连接沿肽序列的残基i和i+3。MMPBSA用于计算钉合肽与CD14的结合能。该图显示了所有钉位置处的非钉合和钉合GKY25之间的结合能差异。正值表明结合较差,而负值表明钉合肽的结合更好。(b)通过添加钉来连接残基i和i+4,进行类似的分析。(c和d)对较短的HVF18肽也进行了类似的分析。

发明详述

[0053] 定义

[0054] 如本文所用的术语“氨基酸”是指任何氨基酸,例如任何常规和非常规氨基酸。

[0055] 本文使用的术语“常规氨基酸(canonical amino acid)”是指蛋白氨基酸(proteinogenic amino acid)。优选地,所述蛋白氨基酸是由标准遗传密码编码的20种氨基酸之一。使用IUPAC单字母和三字母代码来命名氨基酸。

[0056] 如本文所用,术语氨基酸的两个侧链之间的“共价连接”是指所述侧链之间的共价键,或者是指所述侧链共价结合至接头的每端,使得连接侧链的所有键都是共价的。

[0057] 如本文所用,术语“烃钉(hydrocarbon staple)”是指连接至氨基酸侧链的烷基或烯基部分。通常,“烃钉”是包含一个或多个双键的 C_{6-16} 烯基部分。

[0058] 如本文所用,与肽内的氨基酸相关的术语“内部”是指氨基酸的位置在肽的一级序列中既不是最N-端(most N-terminal)氨基酸也不是最C-端(most C-terminal)氨基酸。

[0059] 如本文所用,与肽内的氨基酸相关的术语“不相邻”是指两个氨基酸在肽的一级序列中的位置不彼此紧挨。

[0060] 如本文所用,与肽内的氨基酸相关的术语“位置n”是指在一级序列中的位置,其中最N-端的氨基酸中具有位置n。

[0061] 如本文所用,术语“钉合肽(stapled peptide)”是指在两个不相邻的内部氨基酸的侧链之间包含至少一个共价连接的肽。具体地,钉合肽可以包含羟钉。

[0062] 包含内部共价连接的肽

[0063] 本发明提供了包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶的10至23个氨基酸的含有至多6个氨基酸取代的连续序列的肽,其中所述肽:

[0064] i) 具有10至40个氨基酸之间的总长度,优选10至23之间的总长度,更优选13至23之间的总长度;

[0065] ii) 在两个不相邻的内部氨基酸的侧链之间包含至少一个内部共价连接,其中所述氨基酸表示为 X_1 和 X_2 ;和

[0066] iii) 至少包含SEQ ID NO:1的凝血酶的氨基酸K247、K248和K252;

[0067] 条件是,如果肽的总长度在24至40个氨基酸之间,则它在两个不相邻的内部氨基酸的侧链之间包含至少两个内部共价连接,其中第一内部共价连接的氨基酸表示为 X_1 和 X_2 ,第二内部共价连接的氨基酸表示为 X_3 和 X_4 。

[0068] 本发明进一步提供了包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶的10至40个氨基酸的含有至多6个氨基酸取代的连续序列的肽,其中所述肽:

[0069] i) 具有10至40个氨基酸之间的总长度,优选10至23之间的总长度,更优选13至23之间的总长度;

[0070] ii) 在两个不相邻的内部氨基酸的侧链之间包含至少一个内部共价连接,其中所述氨基酸表示为 X_1 和 X_2 ;和

[0071] iii) 至少包含SEQ ID NO:1的凝血酶的氨基酸K247、K248和K252;

[0072] 条件是,如果肽的总长度在24至40个氨基酸之间,则它在两个不相邻的内部氨基酸的侧链之间包含至少两个内部共价连接,其中第一内部共价连接的氨基酸表示为 X_1 和 X_2 ,第二内部共价连接的氨基酸表示为 X_3 和 X_4 。

[0073] 本发明还提供了包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶的氨基酸的含有至多6个氨基酸取代的连续序列或甚至由该连续序列组成的肽,其中所述肽:

[0074] i) 具有10至23个氨基酸之间的总长度;

[0075] ii) 在两个不相邻的内部氨基酸的侧链之间包含至少一个共价连接,其中所述氨基酸在本文中表示为 X_1 和 X_2 ;和

[0076] iii) 至少包含SEQ ID NO:1的凝血酶的氨基酸K247、K248、K252。

[0077] 本发明还提供了包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶的氨基酸的含有至多6个氨基酸取代的连续序列或甚至由该连续序列组成的肽,其中所述肽:

[0078] i) 具有13至23个氨基酸之间的总长度;

[0079] ii) 在两个不相邻的内部氨基酸的侧链之间包含至少一个共价连接,其中所述氨基酸在本文中表示为 X_1 和 X_2 ;和

[0080] iii) 至少包含SEQ ID NO:1的凝血酶的氨基酸K247、K248、K252。

[0081] 在一些实施方案中,本发明的肽至少包含SEQ ID NO:1的凝血酶的氨基酸R245、K247、K248和K252。

[0082] 所述内部共价连接可以是如下文“内部共价连接”部分所述。

[0083] 优选地,所述肽具有上文“发明内容”或下文“肽功能”部分中描述的一种或多种有

利特性。

[0084] 所述肽可用于治疗炎症和/或感染,例如在“治疗方法”部分中所述。

[0085] 凝血酶原的序列在本文中给出为SEQ ID NO:16。凝血酶原可以在ARG²⁷¹处被切割。该切割产生两个片段,称为片段1·2(包含凝血酶原的前271个残基)和中间前凝血酶2(由残基272-579组成)。片段1·2作为激活肽释放,前凝血酶2在ARG³²⁰处切割,产生活性凝血酶。活性凝血酶的序列在本文中给出为SEQ ID NO:1。

[0086] 内部共价连接

[0087] 本发明的肽的一个特征是它们在两个不相邻的内部氨基酸的侧链之间含有共价连接。因此,所述共价连接是所述氨基酸的侧链之间的直接共价键,或者所述侧链通过接头彼此共价连接。换句话说,根据本发明,肽主链中的共价连接不被认为是“两个不相邻的内部氨基酸的侧链之间的共价连接”。

[0088] 较短的肽

[0089] 尽管所述肽可能含有多于一个这样的共价连接,但如果所述肽在10至23个氨基酸之间,则优选的是所述肽在两个不相邻的内部氨基酸之间仅含有一个共价连接。在侧链之间具有内部连接的氨基酸在本文中也表示为X₁和X₂。

[0090] 尽管X₁和X₂在本发明的肽中通过共价连接彼此结合,但X₁和X₂在本文中可以以其游离的、未结合的形式描述。技术人员理解,即使X₁和X₂以它们的未结合形式描述,在本发明的最终肽中,它们将形成相关的共价连接。举例来说,X₁和X₂可各自描述为“(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸”,但在本发明的肽中,戊烯基基团将发生反应(通常通过闭环复分解(ring closing metathesis))以形成由仅具有一个双键的8个碳长的烯基组成的接头。

[0091] 在两个不相邻的内部氨基酸之间包含共价连接的肽也称为“钉合”肽。

[0092] 技术人员已知许多不同的形成钉合肽的方法,并且本发明的肽可包含可用于肽钉合的两个不相邻的内部氨基酸之间的任何类型的共价连接。例如,所述肽可包含Li等人,2020或国际专利申请W02019018499中描述的任何钉,这两篇文献均通过引用整体并入本文。

[0093] 优选地,当氨基酸X₁位于位置n时,则氨基酸X₂位于位置n+3、或位置n+4、或位置n+5、或位置n+6、或位置n+7、或位置n+8、或位置n+9、或位置n+10、或位置n+11,其中n是整数。更优选地,当氨基酸X₁位于位置n时,则氨基酸X₂位于位置n+3、或位置n+4、或位置n+7、或位置n+11,其中n是整数。甚至更优选地,当氨基酸X₁位于位置n时,则氨基酸X₂位于位置n+4或位置n+7,其中n是整数。后一种定位模式尤其可用于支持所述肽的 α -螺旋结构。通常,n是2至18范围内的整数,然而n的选择必须使得X₁不位于极N-端(very N-terminus),更优选地,X₁和X₂都不位于极N-端或极C-端(very C-terminus)。

[0094] 原则上,X₁可以位于肽内除了极N-端之外的任何位置。然而,所述肽内的某些位置可能比其他位置更有利。本发明的肽包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶或来自SEQ ID NO:12的GKY25的连续氨基酸序列。在下文中,氨基酸的位置相对于SEQ ID NO:12的GKY25的氨基酸编号给出。因此,比对后与SEQ ID NO:12的GKY25中的给定氨基酸具有相同位置的任何氨基酸被称为与GKY25的所述氨基酸“对齐”。

[0095] 在一个实施方案中,优选地,在将本发明的肽的序列与SEQ ID NO:12的GKY25的序列比对后,然后

- [0096] a. X_2 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Lys对齐;和
- [0097] b. 当 X_1 与Lys对齐时, X_2 不与Gln对齐。
- [0098] 在一个实施方案中,优选地,在将本发明的肽的序列与SEQ ID NO:12的GKY25的序列比对后,则
- [0099] i) X_1 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Arg11对齐
- [0100] ii) X_1 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Lys14对齐
- [0101] iii) X_2 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Lys14对齐;和
- [0102] iv) X_2 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Lys18对齐;和
- [0103] v) 当 X_1 与SEQ ID NO:12的Lys18对齐时, X_2 不与Gln22对齐。
- [0104] 在一个实施方案中,氨基酸 X_1 位于位置n并且氨基酸 X_2 位于位置n+3,其中n是2至18范围内的整数,并且在本发明的肽的序列与SEQ ID NO:12的GKY25的序列比对后,则
- [0105] i) X_1 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Arg11对齐
- [0106] ii) X_1 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Lys14对齐;和
- [0107] iii) X_2 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Lys14对齐。
- [0108] 在一个实施方案中,氨基酸 X_1 位于位置n并且氨基酸 X_2 位于位置n+4,其中n是2至18范围内的整数,并且在本发明的肽的序列与SEQ ID NO:12的GKY25的序列比对后,则
- [0109] i) X_1 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Arg11对齐
- [0110] ii) X_1 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Leu12对齐
- [0111] iii) X_1 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Lys14对齐
- [0112] iv) X_2 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Lys14对齐;
- [0113] v) X_1 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Lys18对齐;和
- [0114] vi) X_2 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Lys18对齐。
- [0115] 在一个优选的实施方案中,氨基酸 X_1 位于位置n并且氨基酸 X_2 位于位置n+3,其中n是2至18范围内的整数,并且其中当本发明的肽的序列与SEQ ID NO:12的GKY25的序列比对时,则 X_1 和 X_2 对应于SEQ ID NO:12的Val19和Leu12;或者
- [0116] Phe10和Lys13;或者
- [0117] Leu12和Trp15;或者
- [0118] Lys13和Ile16;或者
- [0119] Ile16和Val19;或者
- [0120] Gln17和Ile20;或者
- [0121] Lys18和Asp21;或者
- [0122] Val19和Gln22;或者
- [0123] Ile20和Phe23;或者
- [0124] Asp21和Gly24;或者
- [0125] Gln22和Glu25。
- [0126] 在另一个优选实施方案中,氨基酸 X_1 位于位置n,氨基酸 X_2 位于位置n+4,其中n为2至18范围内的整数,其中当本发明的肽的序列与SEQ ID NO:12的GKY25的序列比对时,则 X_1 和 X_2 对应于SEQ ID NO:12的
- [0127] Val19和Lys13;或者

[0128] Lys13和Gln17;或者

[0129] Trp15和Val19;或者

[0130] Ile16和Ile20;或者

[0131] Gln17和Asp21;或者

[0132] Val19和Phe23;或者

[0133] Ile20和Gly24;或者

[0134] Asp21和Glu18。

[0135] 在一个非常优选的实施方案中,氨基酸 X_1 位于位置 n 并且氨基酸 X_2 位于位置 $n+4$,其中 n 是2至18范围内的整数,其中当本发明的肽的序列与SEQ ID NO:12的GKY25的序列比对时,则 X_1 和 X_2 分别对应于Gln17和Asp21。

[0136] 在一个实施方案中, X_1 和 X_2 在反应形成共价连接之前是常规氨基酸。

[0137] 例如, X_1 和 X_2 在反应形成共价连接之前可以选自以下组成的组:

[0138] i) X_1 是Lys并且 X_2 选自Asp、Glu、Lys、Cys和Tyr组成的组;

[0139] ii) X_1 是Cys并且 X_2 选自Cys、Lys和Met组成的组;

[0140] iii) X_1 是Asp并且 X_2 是Lys;

[0141] iv) X_1 是Glu并且 X_2 选自Lys和Glu组成的组;

[0142] v) X_1 是Tyr并且 X_2 选自Lys、Phe和Trp组成的组;

[0143] vi) X_1 是Met并且 X_2 选自Met和Cys组成的组;

[0144] vii) X_1 是His并且 X_2 是His;

[0145] viii) X_1 是Phe并且 X_2 选自Phe、Tyr、Ala和Trp组成的组;

[0146] ix) X_1 是Ala并且 X_2 是Phe或Tyr;

[0147] x) X_1 是Trp并且 X_2 选自Trp、Phe和Tyr组成的组。

[0148] 在一个实施方案中, X_1 和 X_2 在反应形成共价连接之前可以如下:

[0149] X_1 是Lys并且 X_2 是Asp、Glu、Cys或Lys,或反之亦然。

[0150] X_1 和 X_2 是Cys。

[0151] 所述共价连接可以通过常规氨基酸的侧链之间的直接反应形成,并且可以通过交联接头(cross linker)形成。当 X_1 和 X_2 是Cys时,共价连接可以是二硫桥或者可以通过交联接头形成,其中交联接头例如是双烷基化剂,例如包含至少两个(溴甲基)取代基的接头。

[0152] 在一个优选的实施方案中, X_1 和 X_2 是衍生的常规氨基酸。在形成共价连接的反应之前, X_1 和/或 X_2 可以例如选自Ser衍生物和Ala衍生物组成的组。

[0153] 在一个实施方案中,共价连接是通过连接两个非常规氨基酸形成的。例如,共价连接可通过连接两个非常规氨基酸形成,所述非常规氨基酸已取代来自凝血酶的所述连续序列的两个天然氨基酸。

[0154] 在一个实施方案中,共价连接是烃钉。

[0155] 在一个优选的实施方案中, X_1 和 X_2 在反应形成共价连接之前是烯基化的氨基酸,例如两个C-烯基化的氨基酸,例如两个 α -取代的烯基氨基酸和/或 α,α -二取代的烯基氨基酸,并且所述共价连接是在所述烯基残基之间形成的烯烃系链(olefin tether)。

[0156] 所述烯基化氨基酸可以是凝血酶的天然氨基酸,其已被烯基化。或者,所述烯基化氨基酸可以是取代凝血酶的天然氨基酸的氨基酸。

[0157] 在一个优选的实施方案中,反应形成共价连接之前的 X_1 和 X_2 可单独选自烯基化Ala、烯基化Leu、烯基化Met、烯基化Ser、烯基化Tyr、烯基化Lys、烯基化Arg和烯基化Phe组成的组。在这种情况下,所述共价连接是在所述烯基残基之间形成的烯烃系链。

[0158] 在一个优选的实施方案中, X_1 和 X_2 中的一个在反应形成共价连接之前可以是烯基化的Ala,另一个可以选自烯基化Ala、烯基化Leu、烯基化Met、烯基化Ser、烯基化Tyr、烯基化Lys、烯基化Arg和烯基化Phe组成的组。在这种情况下,所述共价连接是在所述烯基残基之间形成的烯烃系链。

[0159] 在一个优选的实施方案中,其中 X_1 和 X_2 是 α -烯基烯炔封端的氨基酸和/或 α,α -二取代的烯基烯炔封端的氨基酸。

[0160] 在一个优选的实施方案中,反应形成共价连接之前的 X_1 和 X_2 可以是烯基化丙氨酸,优选 α -取代的烯基或 α,α -二取代的烯基化丙氨酸。在这种情况下,所述共价连接是在所述烯基残基之间形成的烯烃系链。

[0161] 在一个优选的实施方案中, X_1 和 X_2 在反应形成共价连接之前可以是烯基化Ser,例如O-烯基化的Ser。

[0162] 所述烯基化氨基酸在烯基链中包含2至10个碳,例如2、3、4、5、6、7、8、9或10个碳,优选4、5或6个碳。所述烯基化氨基酸可含有一个或多个双键,然而优选仅含有一个双键。进一步优选地,双键位于烯基的自由端。位于两个烯基残基的自由端的两个双键可以通过RCM反应形成烯烃系链。

[0163] 因此,优选地, X_1 和 X_2 是氨基酸,其通过在所述烯基残基之间形成的烯烃系链连接。所述烯烃系链可以是 C_{6-16} 烯基、例如 C_{8-14} 烯基、例如 C_8 或 C_{14} 烯基系链。所述系链可以含有一个或多个双键,优选一个双键。

[0164] 在一个优选的实施方案中, X_1 和 X_2 在反应形成共价连接之前可以是 α,α -二取代的S-或R-戊烯基丙氨酸(S5或R5)或S-或R-辛烯基丙氨酸(S8或R8)丙氨酸。因此,内部炔钉可以通过连接两个 α,α -二取代的S-或R-戊烯基丙氨酸(S5或R5)或S-或R-辛烯基丙氨酸(S8或R8)丙氨酸来形成。

[0165] 在一个优选的实施方案中, X_1 和 X_2 在反应形成共价连接之前可以是(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸。因此,内部炔钉可以通过连接两个(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸来形成。

[0166] 在一个优选的实施方案中,共价键是通过闭环形成的,例如通过闭环复分解(ring closing metathesis,RCM)。

[0167] 在一个优选的实施方案中, X_1 和 X_2 中的一个在反应形成共价连接之前可以是非常规的叠氮基封端的氨基酸,而另一个可以是非常规的炔基(yne)封端的氨基酸。

[0168] 较长的肽

[0169] 优选的是,本发明的24个氨基酸或更长的肽包含至少两个钉。换句话说,优选地,本发明的24个氨基酸或更长(例如24至40个氨基酸)的肽在两个不相邻的内部氨基酸的侧链之间包含至少两个内部共价连接,其中第一内部共价连接的氨基酸表示为 X_1 和 X_2 ,如上所述,第二内部共价连接的氨基酸表示为 X_3 和 X_4 。

[0170] 还优选的是,包含SEQ ID NO:12的GKY25的4个最N-端氨基酸的肽还包含至少两个钉,其中第一内部共价连接的氨基酸表示为 X_1 和 X_2 ,如上所述,第二个内部共价连接的氨基酸表示为 X_3 和 X_4 。

[0171] X_3 和 X_4 可以是如上文“较短的肽”部分中所述。优选地,与 X_1 和 X_2 相比, X_3 和 X_4 更靠近N-端。特别地, X_3 和 X_4 可以被定位使得 X_3 位于所述前4个氨基酸之一处。如果肽包含SEQ ID NO:12的GKY25的4个最N-端氨基酸,则优选地, X_3 位于对应于SEQ ID NO:12的GKY25的4个最N-端氨基酸之一的位置处。

[0172] 在一些实施方案中,氨基酸 X_3 位于位置n,并且氨基酸 X_4 位于位置n+3、或位置n+4、或位置n+5,其中n是整数。在优选的实施方案中,氨基酸 X_3 位于位置n,并且氨基酸 X_4 位于位置n+4,其中n是1至18范围内的整数,优选1至10范围内的整数,更优选在1至5的范围内的整数。因此,虽然优选的是 X_1 不位于极N-端,但 X_3 也可以很好地位于极N-端。

[0173] 如果 X_3 位于极N-端,则钉可以在N-端-NH₂基团和氨基酸的侧链之间形成,优选地是Glu或Asp的侧链,更优选地是Glu的侧链。

[0174] 在某些实施方案中,氨基酸 X_3 位于肽的极N-端。在优选的实施方案中,氨基酸 X_3 位于极N-端并且氨基酸 X_4 位于位置n+4。在非常优选的实施方案中,当将本发明的肽的序列与SEQ ID NO:12的GKY25的序列比对时,则 X_3 和 X_4 对应于SEQ ID NO:12的GKY25的Gly1和Phe5,其中Phe5被Glu或Asp、优选被Glu取代。 X_3 和 X_4 的后一种定位模式尤其可用于保护或掩蔽所述肽的蛋白酶位点。

[0175] X_3 和 X_4 的共价连接可以例如是在羧酸部分和胺之间形成的酰胺键。在一些实施方案中,羧酸部分是谷氨酸侧链。在一些实施方案中,胺是氨基酸侧链。在其他实施方案中,胺是肽主链的N-端胺基团。在一些实施方案中, X_3 和 X_4 的共价连接是在所述相应氨基酸的N-端胺基团和侧链羧酸之间形成的内酰胺桥。

[0176] 在优选的实施方案中,SEQ ID NO:12的GKY25的Phe5被Glu5取代。在此类实施方案中, X_3 和 X_4 对应于SEQ ID NO:14的Gly1和Glu5。

[0177] 肽的特性

[0178] 本发明的肽可以具有一种或多种以下特性。

[0179] 本发明表明,包含单一钉的钉合的较长凝血酶衍生肽,例如GKY25,具有一些不太期望的特性。因此,含有单一钉的GKY25在血液中具有高溶血活性和低抗炎活性,因此排除了体内使用。

[0180] 相反,钉合的较短凝血酶衍生肽,例如钉合的HVF18,在血液中具有相对较低的溶血活性和较高的抗炎活性。

[0181] 此外,双钉合的较长凝血酶衍生肽,例如具有两个钉的GKY25,与单一钉合的GKY25相比在血液中具有较低的溶血活性,与非钉合的GKY25相比具有较高的稳定性。

[0182] 较短的肽

[0183] 因此,优选地,本发明的肽具有适当的长度。因此,优选地,本发明的肽具有10至23个氨基酸之间的长度,例如13至18个氨基酸之间,例如12至22个氨基酸之间,例如14至22个氨基酸之间,例如15至21个氨基酸之间,例如16至20个氨基酸之间,例如17至20个氨基酸之间。

[0184] 具体地,所述肽可以具有18至20个氨基酸的长度,例如18或19个氨基酸。

[0185] 所述肽的长度表示所述肽的总长度。因此,即使所述肽可以缀合至一个或多个另外的部分,所述肽优选不包含多于所示数量的氨基酸。

[0186] 此外,还优选的是,本发明的肽包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶连续氨基酸序

列,其具有合适的长度。因此,优选地,本发明的肽包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶连续氨基酸序列或由其组成,所述连续序列的范围为10至23个氨基酸,例如13至23个氨基酸之间,例如13至18个氨基酸之间,例如14至22个氨基酸之间,例如15至21个氨基酸之间,例如16至20个氨基酸之间,例如17至20个氨基酸之间,优选17至18个氨基酸之间,更优选18至19个氨基酸之间。

[0187] 本发明的肽包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶连续氨基酸序列或甚至由其组成,其中至多6个氨基酸可以被交换。换句话说,所述肽可包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶连续氨基酸序列或由其组成,然而,所述连续序列内的1至6个氨基酸可被另一氨基酸取代。然而,重要的是,所述肽至少包含SEQ ID NO:1的凝血酶的氨基酸K247、K248、K252。换句话说,所述氨基酸不应被取代。

[0188] 在一些实施方案中,所述肽至少包含SEQ ID NO:1的凝血酶的氨基酸R245、K247、K248和K252。

[0189] 本发明的肽可以特别具有10至23个氨基酸之间的总长度,并且包含来自SEQ ID NO:12的GKY25连续氨基酸序列或甚至由其组成,其中至多6个氨基酸可以被交换。换言之,所述肽可包含来自SEQ ID NO:12的GKY25连续氨基酸序列或由其组成,然而,所述连续序列内的1至6个氨基酸可被另一氨基酸取代。然而,重要的是,所述肽至少包含SEQ ID NO:12的GKY25的氨基酸K13、K14和K18。换句话说,所述氨基酸不应被取代。

[0190] 在一些实施方案中,所述肽至少包含SEQ ID NO:12的GKY25的氨基酸R11、K13、K14和K18。

[0191] 本发明的肽可以优选地包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶的16至21个氨基酸范围内、更优选17至18个氨基酸范围内的连续氨基酸序列,或甚至由其组成。

[0192] 所述连续序列可包含至多6个氨基酸取代。例如,与凝血酶连续序列相比,所述肽可包含至少2个氨基酸取代,例如3个氨基酸取代,例如4个氨基酸取代,例如5个氨基酸取代。优选地,所述连续序列可包含至多4个氨基酸取代,甚至更优选地,所述连续序列可包含至多2个氨基酸取代。所述取代中的一个或多个可以是保守取代,例如1、2、3或4个氨基酸取代可以是保守取代。

[0193] 在一个非常优选的实施方案中,所述肽包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶连续氨基酸序列或甚至由其组成,其中一个氨基酸已被氨基酸 X_1 (例如,在“内部共价连接”部分描述的任何 X_1) 取代,并且另一个氨基酸已被 X_2 (例如“内部共价连接”部分描述的任何 X_2) 取代。所述被取代的氨基酸优选地如“内部共价连接”部分针对氨基酸 X_1 和 X_2 所述彼此相对定位。

[0194] 此外,除了SEQ ID NO:1的所述连续序列之外,本发明的肽还可包含一个或多个另外的氨基酸。优选地,所述肽可以含有至多4个另外的氨基酸,例如至多3个另外的氨基酸,例如2个另外的氨基酸。所述另外的氨基酸可以是例如下文“带正电荷的氨基酸”部分描述的任何氨基酸。

[0195] 在一个实施方案中,本发明的肽包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶的17至18个氨基酸范围内的含有至多2个氨基酸取代的连续氨基酸序列或由其组成,其中所述肽可以包含至多4个另外的氨基酸。

[0196] 在一个实施方案中,本发明的肽包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶的17至18个氨基

酸范围内的连续氨基酸序列或由其组成,所述连续序列含有一个氨基酸被取代为氨基酸X₁以及一个氨基酸被取代为氨基酸X₂,其中所述肽可包含至多4个另外的氨基酸。

[0197] 因此,在一个实施方案中,本发明的肽由SEQ ID NO:1的凝血酶的15至20个范围内的连续氨基酸和2至5个、优选2个另外的N-端氨基酸组成,其中所述连续氨基酸中的2个氨基酸已用X₁和X₂取代,其中X₁和X₂是形成内部羟钉的烯基化氨基酸。

[0198] 在一个实施方案中,本发明的肽由SEQ ID NO:1的凝血酶的16至18个范围内的连续氨基酸和2至5个另外的N-端氨基酸、优选2个另外的N-端氨基酸组成,其中所述连续氨基酸中的2个氨基酸已被X₁和X₂取代,其中X₁和X₂是形成内部羟钉的烯基化氨基酸。

[0199] 在一个实施方案中,本发明的肽由SEQ ID NO:1的凝血酶的17个连续氨基酸以及2至3个另外的N-端氨基酸组成,其中所述连续氨基酸中的2个氨基酸已被X₁和X₂取代,其中X₁和X₂是形成内部羟钉的烯基化氨基酸。

[0200] 所述另外的N-端氨基酸优选是带正电荷的氨基酸,例如Lys或Arg。

[0201] 本发明的肽还可包含与所述肽缀合的一个或多个部分。所述部分可以任选地通过接头连接至所述肽。所述一个或多个缀合部分可以例如选自烷基、芳基、杂芳基、烯基、脂肪酸、聚乙二醇(PEG)、糖和多糖组成的组。

[0202] 较长的肽

[0203] 然而,本发明的肽也可以是较长的。在一些实施方案中,本发明的肽具有24至40个氨基酸之间的长度,例如25至35个氨基酸之间,例如25至30个氨基酸之间,例如28至34个氨基酸之间的长度。

[0204] 具体地,所述肽可以具有24至28个氨基酸的长度,例如25或26个氨基酸的长度。

[0205] 本发明的24个氨基酸或更长的肽包含至少两个钉。

[0206] 本发明的长度为24至40个氨基酸的肽包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶的连续氨基酸序列。因此,优选地,本发明的较长肽包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶的连续氨基酸序列或由其组成,所述连续序列在24至40个氨基酸的范围内,例如25至35个氨基酸之间,例如25至30个氨基酸之间,例如28至34个氨基酸之间,优选24至28个氨基酸之间,甚至更优选25至26个氨基酸之间。

[0207] 本发明的较长肽可以如上文“肽的特性-较短的肽”部分中所定义。

[0208] 因此,本发明的较长肽包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶的连续氨基酸序列或者甚至由其组成,其中至多6个氨基酸可以被交换。然而,重要的是,所述肽至少包含SEQ ID NO:1的凝血酶的氨基酸K247、K248和K252。换句话说,所述氨基酸不应被取代。在一些实施方案中,本发明的较长肽包含SEQ ID NO:1的凝血酶的R245、K247、K248和K252。

[0209] 在一个非常优选的实施方案中,本发明的较长肽包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶的连续氨基酸序列或甚至由其组成,其中一个氨基酸已被氨基酸X₁(例如“内部共价连接”部分中描述的任意X₁)取代,并且另一个氨基酸已被X₂(例如“内部共价连接”部分中描述的任意X₂)取代,并且另一个氨基酸已被X₃(例如“内部共价连接”部分中描述的任意X₃)取代,并且另一个氨基酸已被X₄(例如“内部共价连接”部分中描述的任意X₄)取代。所述被取代的氨基酸优选地如“内部共价连接”部分中针对氨基酸X₁和X₂以及X₃和X₄所述相对于彼此定位。

[0210] 带正电荷的氨基酸

[0211] 有趣的是,本发明显示,插入一个或多个带正电荷的氨基酸可以显著增强所述肽的抗炎作用。

[0212] 因此,在优选的实施方案中,本发明的肽可以包含在所述肽的末端或接近末端处插入的1至5个之间、例如1至4个之间、例如1至3个之间、例如1至2个之间、例如2个带正电荷的氨基酸。

[0213] 特别地,所述带正电荷的氨基酸可以在N-端处或接近N-端处插入,例如在选自相对于所述肽的N-端的位置1、2、3、4和/或5的位置处插入。

[0214] 在一个优选的实施方案中,所述带正电荷的氨基酸在N-端插入。

[0215] 在一个实施方案中,本发明的肽包含在N-端处或接近N-端处插入的2个带正电荷的氨基酸,例如在选自相对于肽的N-端的位置1、2和/或3的位置处插入。

[0216] 所述带正电荷的氨基酸可以优选选自精氨酸、赖氨酸和组氨酸组成的组。优选地,所述带正电荷的氨基酸是精氨酸和/或赖氨酸,甚至更优选地,其中所述带正电荷的氨基酸是赖氨酸。

[0217] 肽序列

[0218] 在本发明的一些实施方案中,所述肽可以具有本节中描述的肽序列之一。所述肽除了具有本节描述的序列之外,优选所述肽还:

[0219] • 包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶的10至23个氨基酸范围内、优选13至23个氨基酸范围内的连续序列

[0220] • 具有10至40个氨基酸之间的总长度

[0221] • 至少包含SEQ ID NO:1的凝血酶的氨基酸K247、K248和K252,更优选至少包含SEQ ID NO:1的凝血酶的氨基酸R245、K247、K248和K252;

[0222] 条件是,如果所述肽的总长度在24至40个氨基酸之间,则它在两个不相邻的内部氨基酸的侧链之间包含至少两个内部共价连接。

[0223] 较短的肽

[0224] 在本发明的一些实施方案中,所述肽可以具有本节中描述的肽序列之一。所述肽除了具有本节中描述的序列之外,优选所述肽还:

[0225] • 包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶的10至23个氨基酸范围内、优选13至23个氨基酸范围内的连续序列

[0226] • 具有10至23个氨基酸之间,优选13至23个氨基酸之间的总长度

[0227] • 至少包含SEQ ID NO:1的凝血酶的氨基酸K247、K248和K252,更优选地至少包含SEQ ID NO:1的凝血酶的氨基酸R245、K247、K248和K252。

[0228] 在本发明的一些实施方案中,所述肽可以具有本节中描述的肽序列之一。所述肽除了具有本节中描述的序列之外,优选所述肽还:

[0229] • 包含来自SEQ ID NO:12的GKY25的10至23个氨基酸范围内、优选13至23个氨基酸范围内的连续序列

[0230] • 具有10至23个氨基酸之间,优选13至23个氨基酸之间的总长度

[0231] • 至少包含SEQ ID NO:12的GKY25的氨基酸K13、K14和K18,更优选至少包含SEQ ID NO:12的GKY25的氨基酸R11、K13、K14和K18。

[0232] 本节序列中的 X_1 和 X_2 可以例如如上文“内部共价连接”部分中所述。

- [0233] 本节序列中的U可以例如是His、Arg或Lys,优选是Arg或Lys。
- [0234] 本节序列中的Z可以单独为任何常规氨基酸。在优选的实施方案中,序列的大部分或甚至全部的Z选择为对应于SEQ ID NO:12的GKY25的氨基酸。
- [0235] 在一个实施方案中,本发明的肽包含序列:
- [0236] -K-K-Z-Z-X₁-K-Z-Z-X₂-Z
- [0237] 其中
- [0238] Z是任何常规氨基酸;和
- [0239] X₁和X₂是侧链通过共价连接连接的氨基酸。
- [0240] 在一个实施方案中,本发明的肽包含以下氨基酸序列或由以下氨基酸序列组成:
- [0241] -U-U-(Z)_n-I-Q-K-V-I-D-Q-(Z)_m-
- [0242] 其中
- [0243] 所述肽的总长度在10至23个氨基酸之间;和
- [0244] 每个Z单独地是任何常规氨基酸;和
- [0245] U是His、Lys或Arg;和
- [0246] n为0至10范围内的整数;和
- [0247] m为0至5范围内的整数,并且
- [0248] 其中所述氨基酸的两个已被取代为侧链通过共价连接连接的烯基化氨基酸。
- [0249] 在一个实施方案中,本发明的肽包含以下序列或由以下序列组成:
- [0250] U-U-(Z)_n-K-K-Z-Z-X₁-K-Z-Z-X₂-Z,
- [0251] 或序列:U-U-Z-Z-R-Z-K-K-Z-Z-X₁-K-Z-Z-X₂-Z
- [0252] 其中
- [0253] Z是任何常规氨基酸;
- [0254] U是His、Lys或Arg;
- [0255] n是0到10范围内的整数;并且
- [0256] X₁和X₂是侧链通过共价连接连接的氨基酸。
- [0257] 在一个实施方案中,本发明的肽包含以下序列或由以下序列组成:
- [0258] U-V-F-R-L-K-K-W-I-X₁-K-V-I-X₂-Z-F-G-Z
- [0259] 其中
- [0260] Z是任何常规氨基酸;
- [0261] U是His、Lys或Arg;
- [0262] X₁和X₂是侧链通过共价连接连接的氨基酸。
- [0263] 在一个实施方案中,本发明的肽包含以下序列或由以下序列组成:
- [0264] V-F-R-L-K-K-W-I-X₁-K-V-I-X₂-Q-F-G-E
- [0265] 其中
- [0266] X₁和X₂是侧链通过共价连接连接的氨基酸。
- [0267] 在一个实施方案中,肽包含以下序列或由以下序列组成:
- [0268] U-U-V-F-R-L-K-K-W-I-X₁-K-V-I-X₂-Z-F-G-Z
- [0269] 其中
- [0270] Z是任何常规氨基酸;

- [0271] U是His、Lys或Arg;和
- [0272] X_1 和 X_2 是侧链通过共价连接连接的氨基酸。
- [0273] 在一个实施方案中,所述肽包含以下序列或由以下序列组成:
- [0274] U-U-V-F-R-L-K-K-W-I- X_1 -K-V-I- X_2 -Q-F-G-E
- [0275] 其中
- [0276] U是His、Lys或Arg;和
- [0277] X_1 和 X_2 是侧链通过共价连接连接的氨基酸。
- [0278] 在本发明的一个实施方案中,所述肽包含如下所示的序列或由如下所示的序列组成:
- [0279] i) SEQ ID NO:3
- [0280] ii) SEQ ID NO:4
- [0281] iii) SEQ ID NO:5
- [0282] iv) SEQ ID NO:6
- [0283] v) SEQ ID NO:7
- [0284] vi) SEQ ID NO:8;
- [0285] vii) SEQ ID NO:9;
- [0286] viii) SEQ ID NO:10;
- [0287] ix) SEQ ID NO:11
- [0288] x) SEQ ID NO:17;
- [0289] xi) SEQ ID NO:18;
- [0290] xii) SEQ ID NO:19;
- [0291] xiii) SEQ ID NO:20;
- [0292] xiv) SEQ ID NO:21;
- [0293] xv) SEQ ID NO:22;
- [0294] xvi) SEQ ID NO:23;
- [0295] xvii) SEQ ID NO:24;或者
- [0296] xviii) SEQ ID NO:25;
- [0297] 其中 X_1 和 X_2 是侧链通过共价连接连接的氨基酸。
- [0298] 在本发明的一个实施方案中,所述肽包含如下所示的序列或由如下所示的序列组成:
- [0299] i) SEQ ID NO:3
- [0300] ii) SEQ ID NO:4
- [0301] iii) SEQ ID NO:5
- [0302] iv) SEQ ID NO:8;或者
- [0303] v) SEQ ID NO:9
- [0304] 其中 X_1 和 X_2 是侧链通过共价连接连接的氨基酸。
- [0305] 在一个实施方案中,所述肽包含如下所示的序列或由如下所示的序列组成:
- [0306] i) SEQ ID NO:3
- [0307] ii) SEQ ID NO:4

- [0308] iii)SEQ ID NO:5
- [0309] iv)SEQ ID NO:8;或者
- [0310] v)SEQ ID NO:9
- [0311] 其中 X_1 和 X_2 是(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸,其侧链已彼此反应形成烯基系链。
- [0312] 在一个实施方案中,所述肽包含如下所示的序列或由如下所示的序列组成:
- [0313] i)SEQ ID NO:3
- [0314] ii)SEQ ID NO:4
- [0315] iii)SEQ ID NO:5
- [0316] iv)SEQ ID NO:8;或者
- [0317] v)SEQ ID NO:9
- [0318] 其中 X_1 和 X_2 是Ala,其侧链通过包含一个双键的 C_8 烯基系链彼此共价连接。
- [0319] 在一个实施方案中,所述肽包含如下所示的序列或由如下所示的序列组成:
- [0320] i)SEQ ID NO:3
- [0321] ii)SEQ ID NO:5
- [0322] iii)SEQ ID NO:6;或者
- [0323] iv)SEQ ID NO:7
- [0324] 其中 X_1 和 X_2 是侧链通过共价连接连接的氨基酸。
- [0325] 在一个实施方案中,所述肽包含如下所示的序列或由如下所示的序列组成:
- [0326] v)SEQ ID NO:3
- [0327] vi)SEQ ID NO:5
- [0328] vii)SEQ ID NO:6;或者
- [0329] viii)SEQ ID NO:7
- [0330] 其中 X_1 和 X_2 是(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸,其侧链已彼此反应形成烯基系链。
- [0331] 在一个实施方案中,所述肽包含如下所示的序列或由如下所示的序列组成:
- [0332] ix)SEQ ID NO:3
- [0333] x)SEQ ID NO:5
- [0334] xi)SEQ ID NO:6;或者
- [0335] xii)SEQ ID NO:7
- [0336] 其中 X_1 和 X_2 是Ala,其侧链通过包含一个双键的 C_8 烯基系链彼此共价连接。
- [0337] 在一个实施方案中,所述肽包含如下所示的序列或由如下所示的序列组成:
- [0338] i)SEQ ID NO:3
- [0339] ii)SEQ ID NO:5;或者
- [0340] 其中 X_1 和 X_2 是侧链通过共价连接连接的氨基酸。
- [0341] 在一个实施方案中,所述肽包含如下所示的序列或由如下所示的序列组成:
- [0342] i)SEQ ID NO:3
- [0343] ii)SEQ ID NO:5;或者
- [0344] 其中 X_1 和 X_2 是(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸,其侧链已彼此反应形成烯基系链。
- [0345] 在一个实施方案中,所述肽包含如下所示的序列或由如下所示的序列组成:
- [0346] iii)SEQ ID NO:3

[0347] iv) SEQ ID NO:5;或者

[0348] 其中 X_1 和 X_2 是Ala,其侧链通过包含一个双键的 C_8 烯基系链彼此共价连接。

[0349] 较长的肽

[0350] 在本发明的一些实施方案中,本发明的肽是较长的肽,其包含至少两个钉和来自SEQ ID NO:1的凝血酶的24至40个之间的氨基酸,并且可以具有本文在本节中描述的肽序列之一。所述肽除了具有本节中描述的序列之外,优选所述肽还:

[0351] • 包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶的24至40个氨基酸范围内、优选25至30个氨基酸范围内的连续序列

[0352] • 具有24至40个氨基酸之间,优选25至30个氨基酸之间的总长度

[0353] • 至少包含SEQ ID NO:1的氨基酸K247、K248和K252,优选至少包含SEQ ID NO:1的凝血酶的氨基酸R245、K247、K248和K252。

[0354] 在本发明的一些实施方案中,本发明的肽是包含至少两个钉的较长肽。所述肽除了具有本节中描述的序列之外,优选所述肽还:

[0355] • 包含来自SEQ ID NO:12的GKY25的24至25个氨基酸范围内的连续序列

[0356] • 具有24至40个氨基酸之间,优选25至30个氨基酸之间的总长度

[0357] • 至少包含SEQ ID NO:12的GKY25的氨基酸K13、K14和K18,优选至少包含SEQ ID NO:12的GKY25的氨基酸R11、K13、K14和K18。

[0358] 在一个优选的实施方案中,本发明的较长肽包含如下所示的序列或由如下所示的序列组成:

[0359] i) SEQ ID NO:14;或者

[0360] ii) SEQ ID NO:26

[0361] 其中 X_1 和 X_2 是侧链通过共价连接连接的氨基酸;进一步地,其中 X_3 和 X_4 是侧链通过共价连接连接的氨基酸。本节的序列中的 X_1 、 X_2 、 X_3 和 X_4 可以例如如上文“内部共价连接”部分中所描述的。优选地, X_1 和 X_2 是(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸,其侧链已彼此反应形成烯基系链,并且 X_3 和 X_4 分别是Gly和Glu,它们已彼此反应形成内酰胺桥。

[0362] 肽功能

[0363] 如上所述,所述肽可以具有一种或多种以下功能。

[0364] 高体内和/或体外稳定性

[0365] 优选地,所述肽具有高体内稳定性。因此,当在相同条件下进行测试时,与除了氨基酸 X_1 和 X_2 被交换为缺乏共价连接的其他氨基酸之外具有相同序列的肽相比,本发明的肽优选地具有增加的体内和/或体外稳定性。

[0366] 体内稳定性可以例如通过测定施用肽后一段时间内在小鼠中的抗炎活性来确定。如果在例如24小时后仍保持显著的抗炎活性,则所述肽具有高体内稳定性。

[0367] 具体地,所述肽的抗炎作用可以优选在全身施用肽后在体内维持24小时。

[0368] 体内稳定性可以例如如下文实施例1中所述来测定。

[0369] 增加的蛋白酶抗性

[0370] 优选地,本发明的肽具有增加的蛋白酶抗性。因此,与除了氨基酸 X_1 和 X_2 被交换为缺乏共价连接的其他氨基酸之外具有相同序列的肽相比,所述肽可以对一种或多种蛋白酶具有增加的抗性。

[0371] 优选地,在蛋白酶例如人中性粒细胞弹性蛋白酶(HNE)、假单胞菌弹性蛋白酶(PE)和/或胰蛋白酶的存在下,当在相同条件下测试时,与除了氨基酸 X_1 和 X_2 被交换为缺乏共价连接的其他氨基酸之外具有相同序列的肽相比,本发明的肽具有增加的稳定性。

[0372] 所述对蛋白酶的抗性可以例如如下文实施例1中所述来测定。

[0373] 高抗炎活性

[0374] 优选地,本发明的肽具有高抗炎活性。甚至更优选地,本发明的肽具有抗微生物活性和抗炎活性两者。

[0375] 抗炎活性可以以不同的方式测定,然而,特别可以通过以受控方式诱导炎症并测定炎症是否减轻来测定。例如,炎症可以通过使报告细胞或血液样品在体外与LPS接触或通过向动物施用LPS来诱导。例如,炎症可以通过测量一种或多种促炎细胞因子的水平或通过测定NF- κ B活性来确定。

[0376] 因此,优选的是,本发明的肽在一种或多种内毒素(例如LPS)的存在下减少促炎细胞因子的分泌。具体地,优选所述肽减少包含一种或多种内毒素(例如LPS)的血液中的促炎细胞因子的体内分泌。

[0377] 所述促炎细胞因子可例如选自由以下组成的组:肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 β (IL-1 β)、白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素10(IL-10)、干扰素(IFN- γ)和/或单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)。优选地,所述炎性细胞因子是TNF- α 和/或IL-1 β 。

[0378] 优选地,本发明的肽在tol1样受体(TLR)-激动剂例如脂多糖(LPS)、脂磷壁酸(LTA)、金黄色葡萄球菌肽聚糖(SA-PGN)和/或酵母聚糖的存在下降低NF- κ B活化。

[0379] 优选地,当在相同条件下测试时,与在除了氨基酸 X_1 和 X_2 被交换为缺乏共价连接的其他氨基酸之外具有相同序列的肽存在下的水平相比,浓度为10 μ M的本发明的肽在LPS存在下在新鲜血液中孵育后,将TNF- α 和/或IL-1 β 的分泌减少至少50%,例如至少60%,例如至少70%。

[0380] 在一个实施方案中,在小于10 μ M的浓度、例如小于7 μ M、例如在1至10 μ M范围内、例如在1至7 μ M范围内的浓度,本发明的肽能够将LPS刺激的血液中TNF- α 的释放减少50%。

[0381] 抗炎活性可以通过下文实施例1和2中描述的方法之一进行测试。

[0382] 抗微生物活性

[0383] 本发明的肽优选具有抗微生物活性。尽管本发明的这些肽与其他凝血酶衍生肽相比可以不具有改善的抗微生物活性,但优选的是它们具有至少一些抗微生物活性以及增加的抗炎活性。

[0384] 因此,本发明的肽可以具有针对革兰氏阴性和/或革兰氏阳性细菌的杀菌活性。有趣的是,本发明的肽已被证明对革兰氏阴性细菌有效。不受理论的束缚,该效果被认为是通过所述肽与LPS和/或其他膜结构的结合介导的。本发明的肽也被证明对革兰氏阳性细菌有效。不受理论的束缚,该效果被认为是由LTA和/或其他膜结构的结合介导的。

[0385] 因此,所述肽可以具有杀菌活性,这通过所述肽能够破坏细菌膜从而杀伤细菌来介导。

[0386] 特别地,优选的是,本发明的肽对选自金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和大肠杆菌的一种或多种细菌具有杀菌作用。优选地,所述肽对所有上述细菌具有杀菌作用。

[0387] 抗微生物活性或杀菌活性可以例如通过径向扩散测定或通过活菌计数测定来测

定。所述测定可以例如如下文实施例1和2中所述进行。

[0388] 血液中的低溶血活性

[0389] 非常优选的是,本发明的肽在血液中具有低溶血活性。具有高溶血活性的肽可能有毒,因此不太适合全身施用。

[0390] 一般来说,至多10%的溶血活性是可以接受的。因此,优选地,本发明的肽的溶血活性小于10%,特别地,本发明的肽在新鲜全血中的溶血活性优选小于10%。

[0391] 更优选地,本发明的肽的溶血活性在具有有效抗炎活性的肽浓度下小于10%。在一个优选的实施方案中,本发明的肽在使抗炎活性降低50%的肽浓度下具有小于10%的溶血活性。所述抗炎活性优选地测定为LPS刺激的血液中的TNF- α 释放。

[0392] 因此,优选地,本发明的肽在能够将LPS刺激的血液中的TNF- α 释放减少50%的肽浓度下的溶血活性小于10%。

[0393] 在一个实施方案中,本发明的肽在能够将LPS刺激的血液中的TNF- α 释放减少50%的肽浓度下的溶血活性小于5%。

[0394] LPS刺激的血液中TNF- α 的释放优选可以如下文实施例1或2中所述测定。

[0395] 在一些实施方案中,当50 μ M的所述肽在新鲜全血中孵育时,溶血活性为至多5%,例如至多4%,例如至多3%,例如至多2%。

[0396] 在一些实施方案中,当20 μ M的所述肽在25%新鲜全血中孵育时,溶血活性为至多5%,例如至多4%。

[0397] 溶血活性优选通过以下确定:将新鲜血液与本发明的肽一起孵育并确定溶血情况,然后与通过使用去污剂(如Tween-20)孵育新鲜血液而制备的对照在新鲜血液中的溶血情况进行比较。优选地,溶血活性以与对照相比的溶血百分比形式提供。

[0398] 溶血活性尤其可以如下文实施例1和2中所述来测定。

[0399] 低毒性

[0400] 本发明的肽优选还具有低毒性,以允许肽的全身施用。

[0401] 结构

[0402] 本发明的肽优选在水性溶液中具有基本上 α 螺旋的二级结构。所述基本上 α 螺旋的二级结构优选在结合靶分子例如分化簇14(CD14)后能够保持。

[0403] 水性溶液中的 α 螺旋二级结构优选通过圆二色光谱测定。

[0404] 此外,所述肽优选具有低的寡聚化。流体动力学半径是寡聚化的指标,因此本发明的肽优选具有低的流体动力学半径。优选地,本发明的肽在pH7.4下具有小于150nm和/或在pH5下小于100nm的流体动力学半径。在一些实施方案中,优选地,本发明的肽在pH7.4下具有小于100nm和/或pH5下小于80nm的流体动力学半径。

[0405] 所述流体动力学半径优选通过动态光散射测定,如本文下面实施例4中所述。

[0406] 抗凝血活性

[0407] 本发明的肽还可以具有抗凝血活性。因此,优选地,本发明的肽具有增加血液形成凝块的时间的能力。特别地,优选的是所述肽能够增加内在凝血途径的凝血时间。所述凝血时间可以优选地通过确定“活化部分凝血活酶凝血时间”(aPTT)来确定。优选地,本发明的肽在60 μ M的浓度下使通过aPPT测定的凝血时间增加至少100%。在一些实施方案中,本发明的肽在40 μ M肽浓度下使通过aPPT测定的凝血时间增加至少90%。将所述凝血时间的增加与

不存在肽的情况下的凝血时间进行比较。

[0408] 特别地,所述凝血时间可通过aPTT测定,如本文下文实施例3中所述。

[0409] 对纯化红细胞的降低的溶血活性

[0410] 本发明的肽优选在具有有效抗炎活性的肽浓度下对纯化RBC具有低溶血活性。因此,优选地,本发明的肽在与LPS刺激的血液中TNF- α 释放和/或IL- β 释放的IC₅₀相对应的浓度下对纯化红细胞(RBC)的溶血活性小于75%,更优选小于65%,例如小于60%。所述对纯化RBC的溶血活性优选可以如实施例1中溶血测定部分中的描述来测定。

[0411] 治疗方法

[0412] 本发明的肽可用于治疗各种临床病况。因此,本发明提供了本文公开的肽用作药物。

[0413] 具体地,本发明的肽可以用于在有需要的个体中治疗和/或预防炎症的方法中。所述方法通常包括向所述个体施用治疗有效量的肽。

[0414] 本发明的肽还可用于在有需要的个体中治疗和/或预防感染的方法中。

[0415] 具体地,本发明的肽可用于在有需要的个体中联合治疗或预防炎症和感染,例如用于治疗与感染相关的炎症。

[0416] 所述肽可以通过任何有用的方式施用,然而,所述肽尤其可用于全身施用,例如胃肠外施用。例如,所述肽可以用于皮下或静脉内施用。所述肽还可以通过肺部施用,例如通过吸入来施用。其他施用途径包括气管内(intratracheal)和腹膜内施用。

[0417] 待治疗的个体可以是任何有需要的个体,例如人类。

[0418] 用本发明的肽治疗的感染可以是微生物感染,例如选自细菌、真菌、病毒和原生动物的微生物感染。因此,例如所述肽可以用于治疗细菌感染、真菌感染或病毒感染或治疗与此类感染相关的病况。

[0419] 因此,所述个体可遭受细菌感染。所述细菌感染可以是急性或慢性细菌感染。用本发明的肽治疗的病况的非限制性实例包括急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、肺炎或脓毒症。

[0420] 在一个实施方案中,本发明的肽用于治疗炎性疾病。所述炎性疾病可以例如选自急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、全身炎症反应综合征(SIRS)、严重急性呼吸综合征(SARS)、胃肠炎和肺部炎症(pulmonary inflammation),例如肺炎(pneumonitis)或肺组织的炎症(inflammation of the lung tissue)。

[0421] 用本发明的肽治疗的感染可以是任何感染性细菌的感染。例如,所述细菌可以是革兰氏阴性菌或革兰氏阳性菌。因此,所述细菌可以例如是选自以下的属:葡萄球菌(*Staphylococcus*)、肠球菌(*Enterococcus*)、链球菌(*Streptococcus*)、棒状杆菌(*Corynebacterium*)、埃希氏菌(*Escherichia*)、克雷伯氏菌(*Klebsiella*)、寡养单胞菌(*Stenotrophomonas*)、志贺氏菌(*Shigella*)、莫拉氏菌(*Moraxella*)、不动杆菌(*Acinetobacter*)、嗜血杆菌(*Haemophilus*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)和柠檬酸杆菌(*Citrobacter*)。

[0422] 在一个实施方案中,待治疗的个体具有增加的内毒素水平,例如增加的LPS、LTA、酵母聚糖和/或SA-PGN水平。所述个体在一种或多种体液中可具有增加的内毒素水平。所述体液可以例如选自血液、血清、唾液、鼻咽拭子样品和支气管肺泡灌洗(BAL)样品组成的组。所述内毒素可以尤其是LPS。所述增加的LPS水平可以是至少50pg/ml的水平,例如至少

50pg/ml的LPS血清水平。

[0423] 所述个体还可患有病毒感染,例如含有刺突糖蛋白的病毒(本文也称为“S蛋白病毒”)的感染,例如冠状病毒科的病毒的感染,例如选自由以下组成的组的病毒的感染:

[0424] PorCov-HKU15,

[0425] SARS-CoV,

[0426] HCoV NL63

[0427] HKU1,

[0428] MERS-CoV

[0429] SARS-CoV 2,和

[0430] MERS-CoV。

[0431] 本发明的肽可以单独施用或与其他治疗剂组合施用,所述其他治疗剂例如是抗生素、抗炎剂或防腐剂(antiseptic agent)例如抗细菌剂、抗真菌剂、抗病毒剂和抗寄生虫剂。

[0432] 本发明涉及人类和其他哺乳动物,例如马、狗、猫、牛、猪、骆驼等。因此,本发明的肽可用于人类治疗和兽医应用。适合这种治疗的对象可以通过公认感染标志来识别,例如发热、脉搏、生物体培养等。可用所述分子治疗的感染包括由微生物引起或归因于微生物的感染。微生物的实例包括细菌(例如革兰氏阳性或革兰氏阴性)、真菌(例如酵母和霉菌)、寄生虫(例如原生动物、线虫、绦虫和吸虫)、病毒和朊病毒及其混合物。这些类别中的具体生物体是公知的(参见例如Davis等人, Microbiology, 3rd edition, Harper&Row, 1980)。

[0433] 在本发明的一个实施方案中,本文公开的肽用于治疗或预防疾病、病况或适应症,其例如可以是下述疾病、病况或适应症中的任一种。

[0434] 伴有或不伴有感染性成分的急性全身性炎性疾病,如全身炎症反应综合征(SIRS)、ARDS、脓毒症、严重脓毒症、尿脓毒症和脓毒症休克。其他侵袭性感染和炎性疾病包括脑膜炎、关节炎、中毒性休克综合征、憩室炎、阑尾炎、胰腺炎、胆囊炎、结肠炎、肺炎、尿路感染和腹膜炎。

[0435] 慢性炎性疾病和/或感染性疾病,包括囊性纤维化、COPD和其他肺部疾病、包括慢性胃溃疡在内的胃肠道疾病。

[0436] 炎性病征和凝血病征,包括血栓形成(thrombosis)或弥散性血管内凝血(DIC)。此外,与血管炎相关的炎性疾病以及包括过敏性鼻炎和哮喘在内的过敏。

[0437] 炎症与卒中、体外循环过程例如ECMO、心肺转流或离体肺灌注过程相关但不限于这些。

[0438] 与卒中、体外循环过程例如ECMO、心肺转流或离体肺灌注过程相关但不限于与这些相关的过度接触激活和/或凝血。

[0439] 过度炎症与抗微生物治疗相结合。

[0440] 例如,本发明的肽可用于治疗或预防急性炎症、脓毒症、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、全身炎症反应综合征(SIRS)、慢性阻塞性肺病(COPD)、囊性纤维化、哮喘、过敏性鼻炎和其他类型的鼻炎、血管炎、血栓形成和/或弥散性血管内凝血(DIC)。

[0441] 在一个实施方案中,本发明的肽表现出抗炎和抗凝血活性,并且可以用于炎症和

凝血的伴随治疗或预防。此类肽可尤其适合于治疗和预防需要联合抑制炎症和凝血过程两者的病况,例如ARDS、脓毒症、慢性阻塞性肺病(COPD)、血栓形成、DIC和急性呼吸窘迫综合征(ARDS)。此外,与过度炎症和凝血变化相关的其他疾病可受益于所述肽的治疗,例如囊性纤维化、哮喘、过敏性鼻炎和其他类型的鼻炎以及血管炎。

[0442] 肽的制备

[0443] 生产肽的方法是本领域公知的。

[0444] 肽可以通过本领域公知的重组方法产生(参见例如Sambrook&Russell, 2000, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第三版, Cold Spring Harbor, 纽约)。

[0445] 或者, 肽可以化学合成, 例如通过酰胺键连接多个氨基酸。通常, 肽是通过一个氨基酸的羧基与另一个氨基酸的氨基的缩合反应来化学合成的。保护基团策略可用于防止与各种氨基酸侧链发生不希望的副反应。

[0446] 公知的液相或固相肽合成技术是技术人员已知的(例如标准的f-Boc或Fmoc固相肽合成)。

[0447] 两个不相邻的内部氨基酸的侧链的共价连接可以通过技术人员已知的任何方法引入, 例如通过Li等人, 2020描述的任何方法。

[0448] 当 X_1 和 X_2 是烯基化氨基酸, 例如烯烃封端的氨基酸时, 则可以使用闭环复分解(RCM), 例如通过钌催化的闭环复分解或通过使用1,2-二氯乙烷中的Grubbs第一代催化剂的RCM, 以引入炔基。RCM可以在溶液中或在固体支持物上进行, 多种方法描述于Li等人, 2020以及实施例1中。

[0449] 类似地, 当 X_3 和 X_4 是烯基化氨基酸, 例如烯烃封端的氨基酸时, 则可以使用闭环复分解(RCM), 例如通过钌催化的闭环复分解或通过使用1,2-二氯乙烷中的Grubbs第一代催化剂的RCM, 以引入炔基。RCM可以在溶液中或在固体支持物上进行, 多种方法描述于Li等人, 2020以及实施例1中。

[0450] 当 X_3 是N-端氨基酸和/或包含胺基团的氨基酸并且 X_4 是包含羧酸侧链的氨基酸时, 则共价连接可以是所述胺和所述羧酸之间的酰胺键。换句话说, 共价连接可以是所述胺和羧酸之间的酰胺键, 即内酰胺桥。这种环化可以在固相上进行。

[0451] 本发明的肽还可以从专门生产定制肽的公司订购, 例如AmbioPharm Inc. (美国)。

实施例

[0452] 实施例1

[0453] 材料和方法

[0454] 肽

[0455] 肽GKY25 (GKYGFYTHVFRLKKWIKVIDQFGE) (SEQ ID NO:12)、HVF18 (HVFRLKKWIKVIDQFGE) (SEQ ID NO:2) 以及它们各自的钉合形式表示为sGKY25 (GKYGFYTHVFRLKKWIXKVIXQFGE) (SEQ ID NO:13)、2sGKY25 (cyclo[GKYGE] YTHVFRLKKWIXKVIXQFGE) (SEQ ID NO:14) 和sHVF18 (HVFRLKKWIXKVIXQFGE) (SEQ ID NO:3), 由AmbioPharm, Inc. (美国) 合成。简而言之, 使用标准的9-芴甲氧基羰基(Fmoc)固相肽合成(SPSS)。为了获得炔基化的肽, 将带有烯烃的(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸插入到SEQ ID NO:3和13中相应肽序列的特定位置处(由X表示)。烯烃复分解反应使用1,2-二氯乙烷中的

Grubbs第一代催化剂在固体支持物上进行。将产物肽从树脂上切下并通过RP-HPLC进一步纯化。肽以醋酸盐形式提供,并通过MALDI-TOF MS确认纯度(>95%)。使用固相条件,通过形成酰胺键,即所述肽的Gly1的N-端胺和Glu5的羧酸侧链之间的内酰胺桥,进行2sGKY25的环化。

[0456] 生物材料

[0457] 在获得书面知情同意后,从健康供体采集静脉血。采集后,全血或其部分例如血浆和血清立即使用或保存在-80°C。血液的使用得到了瑞典隆德的隆德大学伦理委员会的批准(许可号:DNR2015/801)。

[0458] 圆二色光谱

[0459] 通过圆二色性(CD)评估GKY25、HVF18及其各自的钉合版本在具有和不具有来自大肠杆菌0111:B4的脂多糖(LPS, Sigma-Aldrich, USA)的情况下的二级结构。将所述肽在pH7.4的10mM Tris中稀释至10 μ M,并与100 μ g mL⁻¹LPS在37°C下孵育30分钟。使用设置在25°C的配备Jasco CDF-426S Peltier的Jasco J-810分光旋光计(Jasco, USA)进行测量。在190-260nm之间(扫描速度:20nm min⁻¹)记录光谱,是在0.2cm石英比色皿(Hellma, GmbH&Co, 德国)中的5次测量的平均值。从每个光谱中减去基线(10mM Tris pH7.4 $\pm$ 100 μ g mL⁻¹LPS),并将最终信号转换为平均残基椭圆率 θ (mdeg cm² dmol⁻¹),如Morrisette等人报道。

[0460] 在另一组实验中,将线性和钉合版本的HVF18与25%或50% TFE或含100 μ g mL⁻¹LPS的水混合,然后按上述方法获取光谱。

[0461] RP-HPLC

[0462] 将HVF18及其钉合版本(2.5 μ g)注入反相C18柱(Phenomenex Kinetex 50 $\times$ 2.1mm 2.6 μ M, 100Å 孔径,加利福尼亚州,USA),采用Agilent 1260Infinity系统,遵循Petruk等人Biomolecules (2020) 报告的方案。简而言之,使用含有0.25% TFA的MilliQ溶液的95%缓冲液A和含有0.25% TFA的乙腈溶液的5%缓冲液B对柱进行平衡。在上柱之前,将肽与缓冲液A(1:3)预混合5分钟。

[0463] 如下所述,将肽用不同的蛋白酶消化不同的时长,然后注射到反相C18柱中。如上所述进行分析。对来自两种不同消化的样品进行了分析。

[0464] 肽的体外蛋白水解

[0465] 将肽以1mM的浓度重悬于不含内毒素的水中。然后,将20 μ g GKY25和sGKY25或14.7 μ g HVF18和sHVF18与0.2 μ g人中性粒细胞弹性蛋白酶(HNE, Calbiochem®, Merk KGaA, Darmstadt, 德国)、铜绿假单胞菌弹性蛋白酶(PE, Calbiochem®, Merk KGaA, Darmstadt, 德国)、来自金黄色葡萄球菌V8的谷氨酰-C内肽酶(EC 3.4.2.11.9) (BioCol GmbH, Michendorf, 德国)或胰蛋白酶(Try, Promega, Madison, WI, USA)在20 μ L终体积中孵育不同的时间长度(0-18小时)。孵育结束时,通过Tricine SDS-PAGE和质谱(对于GKY25、sGKY25、HVF18和sHVF18)以及RP-HPLC(对于HVF18和sHVF18)评估消化情况。所有消化均在三个独立实验中进行。

[0466] SDS-PAGE

[0467] 2 μ g肽加载到来自Invitrogen(USA)的10-20%的Novex Tricine预制胶。在100V下运行进行了100分钟。使用考马斯亮蓝(Invitrogen, USA)对凝胶进行染色。使用Gel Doc

Imager (Bio-Rad Laboratories, USA) 获取图像。对来自三个独立消化的样品进行了分析。

[0468] NMR光谱

[0469] 在配备QCI冷冻探针和脉冲场梯度的700MHz Bruker Avance III HD光谱仪 (Swedish NMR Centre, 哥德堡, 瑞典) 上进行。通过将1.6mM sHVF18溶解在pH4.5的补充有10% D₂O、200μM DSS、0.02vol% NaN₃的50% 2,2,2-三氟乙醇 (TFE) 中来制备样品。¹H谱是在298K从样品中获取的。基于¹H谱和TOCSY谱 (80ms混合时间), 获得了一系列TOCSY (40和80ms混合时间)、NOESY (100和150ms混合时间)、ROESY (100和150ms混合时间)、DQF-COSY、¹³C-编辑的HSQC、¹⁵N-SOFAST-HMQC、¹³C HSQCTOCSY和¹³C-HMBC光谱。在两个维度上利用平方余弦变迹和零填充, 使用nmrPipe来处理光谱。使用CCPNMR v2.4分析和分配光谱。使用NOESY和TOCSY谱的组合来识别旋转系统, 其中NOESY交叉峰用于分配残基间连接。

[0470] NF-κB激活测定

[0471] 在THP1-XBlue-CD14报告细胞 (InvivoGen, 圣地亚哥, USA) 上测试了四种肽的抗炎活性。简言之, 将180,000个细胞/孔接种于96孔板中的酚红RPMI培养基中, 该培养基补充有10% (v/v) 热灭活FBS和1% (v/v) 抗生素-抗霉菌溶液 (AA)。然后添加100ng mL⁻¹ LPS (Sigma, USA) 以及添加和不添加不同浓度 (1-20μM) 的肽。根据制造商的说明 (InvivoGen, 圣地亚哥, USA) 孵育20小时后测定NF-κB活化, 即通过将20μL上清液与180μL SEAP检测试剂 (Quanti-Blue™, Invivo-Gen) 混合, 然后在600nm处测量吸光度。显示的数据是从至少四次独立实验获得的平均值±SEM, 每次独立实验均一式三份进行。在另一组实验中, 在存在或不存在10μM线性和钉合的HVF18的情况下, 用100ng mL⁻¹ 大肠杆菌LPS、1μg mL⁻¹ 金黄色葡萄球菌LTA、1μg mL⁻¹ 大肠杆菌PGN、1μg mL⁻¹ 金黄色葡萄球菌PGN、10μg mL⁻¹ 酿酒酵母酵母聚糖来刺激细胞。实验如上所述进行。如前所述评估NF-κB的激活。

[0472] 溶血测定

[0473] 将来自健康供体的新鲜静脉血收集在乐比卢定 (Lepirudine) 管 (50μg mL⁻¹) 中。然后将50μL血液转移至含有150μL肽的圆底96孔板, 所述肽预先在不含酚红的RPMI-1640-GlutaMAX-I (Gibco) 中稀释。以1:4稀释的血液作为对照。将50μL血液与150μL 5% Tween-20混合作为阳性对照。在37°C和5% CO₂下孵育1小时后, 将板在800g下离心, 将每个样品150μL转移至平底96孔板中并测量450nm处的吸光度。溶血百分比按照以下公式计算:

$$[0474] \quad \frac{450 \text{ nm 吸光度 (样品-对照)}}{450 \text{ nm 吸光度 (阳性对照-对照)}} \times 100$$

[0475] 为了评价肽对红细胞的溶血作用, 如上所述收集血液并在250g下离心10分钟。然后弃去血浆, 用10mM Tris pH7.4中的150mM NaCl洗涤红细胞3次。接下来, 用盐水Tris缓冲液将沉淀稀释100倍。将100μL该溶液添加到圆底96孔板中, 该板中含有100μL预先在盐水Tris缓冲液中稀释的肽。在37°C和5% CO₂下孵育1小时后, 将板离心并测量450nm处的吸光度, 然后使用上述公式确定红细胞的裂解百分比。

[0476] CD14表达和纯化

[0477] 人His-标签CD14 (hCD14-his) 在昆虫细胞中产生并按照先前报道进行纯化²³。

[0478] 微量热泳 (microscale thermophoresis)

[0479] NanoTemper Monolith NT.115装置 (Nano Temper Technologies, 德国) 用于进行微量热泳 (MST)。根据制造商的方案, 使用Monolith NT蛋白标记试剂盒RED-NHS (Nano

Temper Technologies,德国) 标记687 μ L (20 μ M) 重组hCD14。将hCD14 (5 μ L, 21nM) 与浓度增加 (0.03-1000 μ M) 的GKY25、HVF18及其钉合版本以1:1的比例在含或不含150mM NaCl的10mM Tris pH7.4中孵育。然后,将样品装入标准玻璃毛细管 (Monolith NT Capillaries, Nano Temper Technologies) 中,进行MST分析 (发光二极管和红外激光的设置80%)。显示的结果是六次测量的平均值 $\pm$ SD。

[0480] 全血测定

[0481] 在存在乐比卢定 (50 μ g mL⁻¹) 的情况下从健康供体采集新鲜静脉血。将血液在RPMI-1640-GlutaMAX-I (Gibco) 中按1:4稀释,并将1mL该溶液转移至24孔板中,并在添加浓度增加的GKY25、HVF18以及他们的钉合版本后立即用100ng mL⁻¹LPS进行刺激。在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂中孵育24小时后,将板以1000g离心5分钟,然后收集上清液并在分析前储存在-80 $^{\circ}$ C。该实验进行至少4次,每次使用来自不同供体的血液。为了评估肽的愈合特性,用100ng mL⁻¹LPS刺激血液,并在37 $^{\circ}$ C下孵育30分钟后,用剂量增加的四肽进行处理。在最后一组实验中,通过将血液暴露于浓度增加的GKY25、HVF18及其钉合版本30分钟,来评估肽的预防性抗炎活性。然后用100ng mL⁻¹的LPS刺激血液。

[0482] 细胞因子测定

[0483] 使用从血液实验中获得的血浆来评估细胞因子的释放。根据制造商的说明,使用针对TNF- α 和IL-1 β 的人炎症 DuoSet[®] ELISA试剂盒 (R&D Systems)。在450nm波长处测量吸光度。显示的数据是从至少四次独立实验获得的平均值 $\pm$ SEM,每次独立实验均一式两份进行。

[0484] 根据制造商的说明,使用小鼠炎症试剂盒 (Becton Dickinson AB) 评估鼠血浆中的TNF- α 、IFN- γ 、MCP-1、IL-10和IL-6水平。

[0485] 小鼠炎症模型

[0486] 在BALB/c tg (NF- κ B-RE-Luc) -Xen报告小鼠 (Taconic, 10-12周龄) 中研究了HVF18和sHVF18的免疫调节作用。将肽 (每只小鼠50 μ g) 与大肠杆菌LPS (每只小鼠25 μ g) 以200 μ L终体积同时皮下注射。对小鼠 (每个治疗组8只小鼠) 的背部仔细剃毛并清洁。注射后,立即将动物转移到单独通风的笼子中,并在3小时后成像。我们使用体内成像系统 (IVIS Spectrum, PerkinElmer Life Sciences) 来测定NF- κ B激活。使用Living Image 4.0软件 (PerkinElmer Life Sciences) 检测并量化小鼠的生物发光。IVIS成像前15分钟,腹膜内给予小鼠100 μ L D-荧光素 (150mg/kg体重)。

[0487] 体内LPS模型

[0488] 将大肠杆菌0111:B4 LPS重悬于10mM Tris pH7.4中。然后将亚致死剂量 (6mg/kg 体重) 腹膜内 (i.p.) 注射到雄性C57BL/6小鼠 (11-12周, 22 $\pm$ 5g) 中。三十分钟后,向小鼠 i.p. 注射每只小鼠10、20、50、100或500 μ g sHVF18 (在10mM NaOAc pH5中)。LPS攻击后8小时和20小时后,用异氟烷深度麻醉小鼠,通过心脏穿刺收集血液并储存在-80 $^{\circ}$ C直至进一步分析。

[0489] 细菌细胞培养

[0490] 将大肠杆菌ATCC 25922、金黄色葡萄球菌ATCC 29213、铜绿假单胞菌01以及8个金黄色葡萄球菌临床分离株和7个铜绿假单胞菌临床分离株的1个菌落接种到5mL Todd-Hewitt (TH) 培养基中,37 $^{\circ}$ C下摇动过夜。次日,细菌细胞培养物在新鲜TH培养基中按1:50稀

释,并使其生长至对数中期。然后,将细菌在3500g下离心10分钟,洗涤并随后重悬于10mM Tris pH7.4中,终浓度为 2×10^9 菌落形成单位(CFU) mL^{-1} 。

[0491] 径向扩散测定(radial diffusion assay,RDA)

[0492] 如上所述培养和制备细菌。然后将所述微生物(4×10^6 CFU)添加到15mL底层琼脂糖凝胶中,该凝胶由0.03% (w/v) TSB、1% (w/v) 低电内渗型琼脂糖(Sigma-Aldrich)和0.02% (v/v) Tween20(Sigma-Aldrich)组成。将底层凝胶倒入直径144毫米的培养皿中。琼脂糖凝固后,打4mm直径的孔,向每个孔添加所需浓度的6 μL 肽溶液。将板在37°C下孵育3小时以允许肽扩散。然后用15mL熔化的覆盖凝胶(含6%TSB和1%低电内渗型琼脂糖的蒸馏 H_2O)覆盖底层凝胶。肽的活性以清除区域到孔的直径(不包括4mm孔)表示。所有实验进行至少4次。

[0493] 活菌计数测定(VCA)

[0494] 如上所述培养和制备细菌。接下来,将细菌悬浮液以1:1000的比例稀释在10mM Tris pH7.4中,浓度为 2×10^6 CFU mL^{-1} 。将细菌(50 μL)与在10mM Tris pH7.4(含或不含150mM NaCl或25%人柠檬酸盐血浆)中的不同浓度的GKY25、sGKY25、HVF18和sHVF18(1-20 μM) 在37°C下孵育2小时。孵育结束时,将样品的连续稀释物接种于TH琼脂平板上,在37°C下孵育过夜,并计算CFU。将用相应缓冲液处理的细菌用作对照。所有实验进行至少4次。显示的数据为平均值 $\pm$ SEM。

[0495] 活/死测定

[0496] 如前所述,通过LIVE/DEAD BacLight™细菌活力试剂盒(Invitrogen,Molecular Probes,Carlsbad,CA,USA)评估细菌膜的渗透性²⁴。简言之,按照VCA的方法制备细菌悬浮液。然后分别用在10mM Tris(pH7.4)中的1 μM 或5 μM HVF18及其钉合版本分别处理金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌01悬浮液(50 μL)。缓冲液用作阴性对照。2小时后,按照制造商的方案所报告的,针对每mL细菌悬浮液,将样品与1 μL 的染料混合物混合,并在室温下在黑暗中孵育15分钟。孵育结束时,将5 μL 染色的细菌悬浮液置于载玻片和18-mm方形盖玻片之间。我们使用Zeiss AxioScope A.1荧光显微镜检查了来自三个独立样品制备物的封片样品的10个视场(1 $\times$ 1mm)(物镜:Zeiss EC Plan-Neofluar 100/1.3油;相机:Zeiss AxioCam MRm;采集软件:Zeiss Zen 2.6(蓝色版)。

[0497] 透射电子显微镜

[0498] 通过透射电子显微镜(TEM)(Jeol Jem 1230;Jeol,日本)结合负染色,进一步评估了肽对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌01膜的影响。具体而言,将来自VCA的5 μL 细菌悬浮液吸附到碳涂层网格(铜网,400)上60s,并用7 μL 2%乙酸双氧铀染色30s。通过低气压下的辉光放电,使网格具有亲水性。对来自三个独立实验的在网格(间距62 μm)上的封片样品的10个视场(放大倍数'4200)进行了分析。

[0499] MIC和MBC测定

[0500] 根据Wiegand等人报告的方案,确定最小抑制浓度(MIC)。如上所述培养和稀释细菌。接下来,将细菌进一步以1:1000稀释在 $2 \times \text{BBL}^{\text{TM}}$ Mueller Hinton II(MH)阳离子调节肉汤(Becton,Dickinson and Company,Sparks,USA)中。将细菌(50 μL)添加到含有50 μL $2 \times \text{MH}$ 肉汤(对照)或含有浓度范围为2.5-320 μM 的肽(HVF18或sHVF18)的 $2 \times \text{MH}$ 肉汤的96孔圆底聚苯乙烯平板(Corning INC,Kennebunk,USA)中。然后将板在37°C下孵育24小时。将MIC确

认为未观察到可见细菌生长的最低浓度。MIC分析后,使用同一平板确定最小杀菌浓度(MBC)。为此,使用移液器吸头重新悬浮每种条件的样品,并将10 μ L液滴铺在THA板上,并在37°C下孵育过夜。将MBC以未观察到细菌菌落形成的浓度固定。

[0501] 结果

[0502] 具有改进的蛋白水解稳定性的双作用肽的设计

[0503] 凝血酶C-端肽GKY25具有经过验证的针对细菌感染和相关的TLR驱动的炎症两者的双重作用。增加肽稳定性的一种方法是肽羟钉合,这是一种通过侧链共价羟桥稳定肽二级结构的修饰。钉合已应用于其他肽,尽管钉合的效果难以预期。通过用(S)-2-(4'戊烯基)-丙氨酸取代某些氨基酸,将羟钉部分引入到GKY25(GKYGFYTHVFRLKKWIKVIDQFGE)的序列中。钉合位置是根据表1中总结的GKY25的信息决定的。

[0504] 表1

[0505]	GKY25 (SEQ ID NO: 12)	氨基酸用粗体和下划线标记:
	<u>GKYGFYTHVFRLKKWIKVIDQFGE</u>	进化上保守的
	<u>GKYGFYTHVFRLKKWIKVIDQFGE</u>	带正电荷, 对于 LPS 结合很重要
	<u>GKYGFYTHVFRLKKWIKVIDQFGE</u>	疏水性, 可能对于与 CD14 的相互作用很重要
	<u>GKYGFYTHVFRLKKWIKVIDQFGE</u>	与 CD14 中的 K87 相互作用
	<u>GKYGFYTHVFRLKKWIKVIDQFGE</u>	优选用于钉合

[0506] 此外,位于中心的赖氨酸残基(K13、K14和K18,本节中的数字参考GKY25序列(SEQ ID NO:12)))可能对于GKY25的抗微生物活性很重要。此外,H8在pH5.5下的质子化通过破坏膜而增加了GKY25对革兰氏阴性大肠杆菌的抗菌活性。GKY25与LPS结合,CD14的LPS结合疏水口袋以及负责LPS和CD14相互作用的残基已在表1中标出。研究表明,在CD14中K14与K87交联,并且计算机对接研究表明,C-端残基Q17、K18、D21、Q22和E25暴露于溶剂。NMR研究确定了LPS结合构象(PDB代码5z5x),其中C-端 α 螺旋从I16开始。与LPS的相互作用由疏水性残基和带正电荷的残基H8、R11、K13和K14介导。如果忽略可具有上述活性之一的GKY25的氨基酸,则保留氨基酸Q17、D21、Q22和E25。由于Q22和E25接近末端,因此在Q17和D21的位置引入钉合。

[0507] 使用圆二色性(CD)分析了钉合GKY25(本文表示为sGKY25)与其天然版本相比的螺旋度。LPS存在下的GKY25谱用作阳性对照。sGKY25呈 α -螺旋结构,与LPS结合时螺旋度含量(content of the helicity)与GKY25相当。对于sGKY25和LPS, α -螺旋含量保持不变。为了确认钉合增加了肽的蛋白水解稳定性,我们将其暴露于各种蛋白酶不同的时长,然后使用SDS-PAGE对其进行分析。如图1a所示,钉合增强了在HNE存在下GKY25的稳定性长达6小时。针对胰蛋白酶的稳定性也有所提高。事实上,消化6小时后仍然可以检测到完整的sGKY25。有趣的是,尽管序列中存在切割位点,但没有一个肽易于被V8消化。为了了解与天然形式相比从消化的sGKY25释放了哪些区域,我们采用了LC-MS/MS。如所预期,线性肽在消化30分钟后已释放出多种片段。另一方面,钉合为sGKY25提供了部分保护。在分析的时间点,用PE消化后几乎没有发现对应于sGKY25 C-端部分的片段,而用HNE消化后没有发现这样的片段。

这并不意外,因为已知GKY25的N-端部分更灵活且更容易蛋白水解。GKY25的钉合产生特别针对红细胞(RBC)的溶血性更强的结构(图4a),然而sGKY25在全血中也具有显著的溶血活性(图4a)。即使浓度为50 μ M,sGKY25在全血中的溶血活性也高于10%,这通常是可接受的溶血活性的上限。

[0508] 当在用LPS刺激的THP-1细胞上测试抗炎活性时,sGKY25显示出相对于线性肽的显著改善,但在较高浓度下也显示出高毒性(图2a)。在更生理的条件下,即在血液中,钉合的sGKY25肽完全不能阻断由LPS诱导的炎症(图2b)。

[0509] 钉合的HVF18(sHVF18)的螺旋度通过CD和在疏水环境(如RP-HPLC的特征)中得到证实。与线性HVF18(8.03分钟)相比,sHVF18显示出更长的保留时间(9.42分钟),因为功能性结合表面随着锁定而增加。随后我们通过SDS-PAGE(图1b)、HPLC和LC-MS/MS测试了对蛋白酶切割的抗性。钉合可将使用HNE和PE时HVF18的稳定性提高长达18小时。针对胰蛋白酶的稳定性也有所提高。事实上,即使在18小时后,仍然可以检测到完整的sHVF18。与线性和钉合的GKY25相似,HVF18变体不易受到V8消化的影响。LC-MS/MS结果证实HVF18的钉合赋予肽完全的蛋白水解保护。通过将肽暴露于升高的温度并通过CD分析二级结构,进一步测试了sHVF18的螺旋稳定性。发现即使在暴露于80 $^{\circ}$ C之后,sHVF18仍然呈现 α 螺旋光谱,即在208和222nm处具有两个特征最小值。值得注意的是,如果与sGKY25相比,sHVF18显示出较低的溶血活性(比较图4b与图4a)。特别是,与sGKY25相比,sHVF18在全血中表现出显著较低的溶血活性。

[0510] 通过核磁共振(NMR)确认了钉合插入在正确位置。将sHVF18溶解在50% TFE中,已知这会增加二级结构,然后收集TOCSY、NOESY、ROESY、 13 C-HSQC和 15 N-SOFAST-HMQC光谱。使用CCPNMR套件中的DANGLE二面角和化学位移指数(CSI)模块进行二级结构估计,估计sHVF18包含由残基7至14组成的 α -螺旋。

[0511] 对sHVF18进行了详细的核磁共振(NMR)研究。将肽溶解在50% TFE中。TOCSY、NOESY、ROESY、 13 C-HSQC和 15 N-SOFAST-HMQC谱是在50% TFE中的sHVF18上收集的。TOCSY、NOESY和ROESY谱显示出良好分散的峰,可以在TOCSY谱中容易地识别氨基酸类型。NOESY和ROESY谱显示许多HN-H α 和HN-HN交叉峰,从而可以容易地对肽进行按顺序分配。 13 C HSQC谱显示出良好分散的峰。在 15 N SOFAST-HMQC谱中可以检测到对应于酰胺主链原子的16个交叉峰以及8Trp和15Gln的侧链交叉峰。 15 N HMQC和 13 C HSQC谱表明,sHVF18样品在这些条件下具有明确的构象状态。多个HN-HN(I,i+2)和HN-H α (I,i+2/3)的存在表明存在明确的二级结构。完成分配,并且可以识别97%的可行的 1 H共振。使用CCPNMR套件中的DANGLE二面角估计和化学位移指数(CSI)模块进行二级结构估计,估计sHVF18包含由残基7至14组成的 α 螺旋,这也与NOE图一致。由于钉的芳香性,在NOESY光谱中容易看到钉合的接头,并且根据TOCSY光谱,可以确认钉的存在。该结构整体形成具有由残基Val12-Leu5和Lys11-Gly17组成的两个 α -螺旋的L形结构。N-端和C-端 α -螺旋在结构上是明确的,然而两个 α -螺旋相对于彼此的方向存在相对较高的可变性。当将TFE中的sHVF18结构与LPS存在下的HVF18进行比较时,可以观察到类似的L形三级结构,主链RMSD为2.2 $\text{\AA}$ 。主要差异可见于HVF18的N-端部分,在此未观察到sHVF18中的 α -螺旋。然而,如CD分析所示,这可能是由于TFE诱导sHVF18形成的结构比LPS诱导HVF18形成的结构更螺旋。在sHVF18中,sHVF18的N-端部分似乎比HVF18中更加有序。HVF18中的C-端 α -螺旋范围是残基Ile9-Gly17,其比sHVF18长两个氨基酸。从sHVF18

结构整体来看,钉似乎破坏了 α -螺旋。更详细地观察了针对sHVF18获得的NOE,并将这些与HVF18整体结构中的距离进行比较,残基5Leu、7Lys、8Trp、9Ile和11Lys的NOE距离与HVF18结构整体不一致,这显示了sHVF18和HVF18之间的结构差异。

[0512] 钉合对肽抗炎活性的影响

[0513] 使用微量热泳(MST)来测定 K_d 。即使在盐存在下,sHVF18对CD14的 K_d 也显著降低(图5)。在存在浓度增加的线性和钉合HVF18的情况下,用LPS刺激THP1-XBlue-CD14报告细胞,并评估NF- κ B活化。图3清楚地表明,sHVF18的抗炎活性显著提高。此外,对于其他TLR激动剂,例如来自金黄色葡萄球菌的LTA和PGN、来自大肠杆菌的PGN和来自酿酒酵母的酵母聚糖(图6a),也是如此。在THP-1细胞中,观察到与其线性形式相比,sHVF18对LPS诱导的NF- κ B/AP-1激活有更强的抑制作用(图3)。将25%新鲜静脉人血液与钉合的HVF18或线性HVF18一起孵育,同时用LPS刺激24小时。我们发现sHVF18有效地并以剂量依赖性方式减少TNF- α 和IL-1 β 的分泌,特别是当在用LPS刺激之前添加肽或一起添加LPS和肽时(图3和图7a)。sHVF18的抑制较低,但当血液首先用LPS刺激30分钟然后用剂量增加的肽处理时仍然显著(图7b)。

[0514] 钉合肽对实验小鼠模型中内毒素应答的影响

[0515] 在第一组实验中,探讨了sHVF18是否可以抑制NF- κ B报告小鼠中LPS诱导的局部炎症。皮下注射等量的钉合肽或线性肽,同时添加LPS,然后测量随时间推移的NF- κ B激活(图8a和图9)。与体外数据一致,sHVF18在50 μ g时就表现出很强的抗炎活性,而其线性对应物则没有效果(图8a和图9)。事实上,需要更高浓度的HVF18(200 μ g)。此外,随着时间的推移,线性肽的活性变得不那么稳定,对LPS诱导的促炎作用的抑制减弱。在第二组实验中,在内毒素诱导的休克小鼠模型中评估了sHVF18的活性。对C57BL/6小鼠i.p.注射亚致死剂量的LPS,30分钟后用剂量增加的sHVF18进行治疗。20小时后,处死小鼠,分析血液样品中的细胞因子水平(图9b)。观察到,在20、50和100 μ g sHVF18时,促炎细胞因子例如TNF- α 、IL-6、IFN- γ 和MCP-1显著减少(图9b)。有趣的是,500 μ g的sHVF18完全不能降低细胞因子水平。接下来,使用较短的8小时时间点,研究了50和100 μ g sHVF18的效果(图8b)。对于两种浓度的sHVF18,观察到细胞因子水平的较小但仍然显著的降低。

[0516] 钉合对肽抗菌活性的影响

[0517] 通过使用径向扩散测定(RDA),注意到sHVF18以相同的方式具有活性,与条件(即不加或不加氯化钠)无关,而线性肽在不加盐的实验中显示出更好的细菌杀伤作用。事实上,在存在NaCl的情况下观察到活性降低(图10a)。测试溶液中的抗微生物活性,发现sHVF18对所有评估的菌株都比HVF18更具杀菌力(图10b,左图)。此外,它对金黄色葡萄球菌表现出显著的亲和力,在浓度低于1 μ M时将其杀伤(图10c)。由于本研究的一个目标是使用sHVF18作为全身药物,因此还在更复杂的情况下(例如在盐或人血浆存在的情况下)评估了肽的活性(图10b,中图和右图)。两种肽的抗微生物活性随着培养基复杂性的增加而降低,但sHVF18仍然显示出比其线性形式更强的杀伤作用(图10b,中图和右图)。

[0518] sHVF18的抗微生物活性在标准最小抑制浓度(MIC)测定中得到进一步证实(图10d,10e)。与VCA中一样,sHVF18对革兰氏阳性菌表现出更强的活性。

[0519] 综上所述,这些结果表明,与其线性形式相比,sHVF18保留了对革兰氏阴性菌的抗菌活性。此外,它变得更加具有活性,对革兰氏阳性菌更具选择性。最后,杀伤作用是通过细

菌膜的透化和破坏来介导的。

[0520] 实施例2

[0521] 材料和方法

[0522] 肽

[0523] 肽GKY25 (GKYGFYTHVFRLKKWIQKVIDQFGE) (SEQ ID NO:12)、sGKY25 (GKYGFYTHVFRLKKWIXKVIXQFGE) (SEQ ID NO:13)、2sGKY25 (ciclo[GKYGE] YTHVFRLKKWIXKVIXQFGE) (SEQ ID NO:14)、sHVF18 (HVFRLKKWIXKVIXQFGE) (SEQ ID NO:3)、sKVF18 (KVFLKKWIXKVIXQFGE) (SEQ ID NO:4)、sKKVF18 (SEQ ID NO:5)、sKKKVF18 (SEQ ID NO:6)、sKKKKVF18 (SEQ ID NO:7)、sRVF18 (RVFLKKWIXKVIXQFGE) (SEQ ID NO:8)、sRRVF18 (SEQ ID NO:9)、sRRRVF18 (SEQ ID NO:10)和sRRRRVF18 (SEQ ID NO:11)由AmbioPharm, Inc. (USA)合成并纯化,如对sHVF18所报道的那样。肽以醋酸盐形式提供,并通过MALDI-TOF MS确认纯度(>95%)。

[0524] 圆二色光谱

[0525] 通过圆二色性(CD)评估所有钉合肽的二级结构。将肽在pH7.4的10mM Tris中稀释至10 μ M,并通过配备Jasco CDF-426S Peltier的Jasco J-810分光旋光计(Jasco,USA)测量光谱,温度设置为25°C,如对sHVF18所报道的那样。显示的数据是从三个独立实验获得的平均值。

[0526] NF- κ B激活测定

[0527] 所有钉合肽的抗炎活性均在THP1-XBlue-CD14报告细胞(InvivoGen,圣地亚哥,USA)上进行了测试。该实验按照对sHVF18报告的那样进行,不同之处在于每种肽的最终浓度在1-10 μ M之间。显示的数据是从四次独立实验获得的平均值 $\pm$ SEM,每次独立实验均一式三份进行。

[0528] 溶血测定

[0529] 如对sHVF18所报道的,测试了钉合肽对红细胞或全血的溶血作用。显示的数据是从至少四次独立实验获得的平均值 $\pm$ SEM,每次独立实验均一式三份进行。每次实验使用来自不同供体的血液。

[0530] 全血测定

[0531] 不同钉合肽在血液中的抗炎作用按照对sHVF18所报道的那样进行。每次实验使用来自不同供体的血液。

[0532] 细胞因子测定

[0533] 使用从血液实验中获得的血浆来评估细胞因子的释放。根据制造商的说明,使用针对TNF- α 和IL-1 β 的人炎症DuoSet[®] ELISA试剂盒(R&DSYSTEMS)。在450nm波长处测量吸光度。显示的数据是从四次独立实验获得的平均值 $\pm$ SEM。对于2sGKY25,显示的数据是从两次独立实验获得的平均值 $\pm$ SEM。

[0534] 根据制造商的说明,使用小鼠炎症试剂盒(Becton Dickinson AB)评估鼠血浆中的TNF- α 、IFN- γ 、MCP-1、IL-10和IL-6水平。

[0535] LPS体内模型

[0536] 将大肠杆菌0111:B4 LPS重悬于pH7.4的10mM Tris中。然后将亚致死剂量(6mg/kg体重)腹膜内(i.p.)注射到雄性C57BL/6小鼠(11-12周,22 $\pm$ 5g)中。三十分钟后,向小鼠

i.p.注射每只小鼠10 μ g sHVF18、sKVF18、sKKVF18、sRVF18或sRRVF18(在pH5的10mM NaOAc中)。对于未治疗的小鼠,之前注射100 μ L pH7.4的10mM Tris,30分钟后注射100 μ L 10mM pH5的NaOAc。在LPS攻击后20小时后,用异氟烷深度麻醉小鼠,通过心脏穿刺收集血液并储存在-80 $^{\circ}$ C直至进一步分析。

[0537] 抗菌活性

[0538] 与sHVF18一样,通过径向扩散测定(RDA)或活菌计数测定(VCA),测定不同钉合肽对大肠杆菌ATCC 25922、金黄色葡萄球菌ATCC 29213和铜绿假单胞菌01的抗菌活性,不同之处在于每种肽对RDA和VCA的最高测试浓度分别为20 μ M和10 μ M。

[0539] 结果

[0540] 钉合肽的结构和溶血活性分析

[0541] 如实施例1所示,HVF18的钉合增加了其针对蛋白水解的稳定性,并大大提高了其抗炎活性(体外和体内),从而保留了其抗微生物活性,但使其主要针对革兰氏阳性菌,同时具有低溶血活性。制备了sHVF18的不同变体,其中N-端His残基被1至4个Lys或Arg残基替换。此外,制备了钉合GKY25的另一种变体(2sGKY25),其具有2个钉合区域,其中一个变体与sGKY25中的C-端区域相同,但在N-端区域有一个额外的钉。由于如实施例1中所述,sGKY25未能阻断在如人血液的复杂环境中LPS诱导的炎症(参见图2b),所以使用双钉的目的是评估2sGKY25是否能够表现出任何抗炎活性。

[0542] 通过圆二色性(CD)评估sHVF18及其变体的二级结构。在图11中,可以观察到sHVF18的K和R变体具有更明确的 α -螺旋结构,其中两个最小值,一个在208nm,一个在222nm。比较这些肽对红细胞(RBC)和全血的溶血活性(分别为图12a和12b)。结果发现所有肽对红细胞均发生溶血。K和R残基的量的差异在这方面没有导致任何差异(图12a)。当在全血中进行相同的分析时,观察到当阳性残基的数量为3或4时,与数量为1或2个相比,K和R变体的溶血活性显著增加(图12b)。在分析2sGKY25在全血中的溶血活性时,注意到溶血活性略低于sGKY25,但绝对高于sHVF18(图12c-参见虚线)。图12中的点线表示10%的溶血活性。总体上,优选的是肽具有低于10%的溶血活性。

[0543] 钉合肽的体外和体内抗炎活性评价

[0544] 首先在THP-1-XBlue-CD14报告细胞中评估了钉合肽抵抗LPS诱导的炎症的能力。带K的HVF18的变体的数据报告在图13a中,带R的变体的数据报告在图13b中。当以10 μ M作为最终浓度进行测试时,所有肽都显示出比原始sHVF18有所改善的活性。相对于10 μ M sHVF18,具有3和4个K或R的变体分别在2和5 μ M时已经表现出甚至更好的活性。然后,我们在更生理的环境下即25%的全血中评估抗炎活性。在存在或不存在不同肽的情况下用LPS刺激血液,然后通过ELISA定量血浆中TNF- α 和IL-1 β 的释放(图14a和14b)。令人惊讶的是,在这里,具有3和4个K或R的肽的活性低于具有1或2个带正电荷残基的肽。特别是具有2个K或R的肽显示出改善的效果。特别是,发现这些肽显著减少TNF- α 释放,即使在1-2 μ M的极低浓度下也是如此,而在5-10 μ M肽时,TNF- α 释放几乎完全被消除。还发现,这些肽在2-5 μ M时显著降低了IL-1 β 的释放。我们还在用LPS刺激的血液中测试了双钉合GKY25相对于其线性和单钉合版本的活性(图14c)。发现与GKY25相比,在N-端区域闭合GKY25能更好地抑制LPS诱导的TNF- α 和IL-1 β 释放,但与sHVF18的变体相比需要更高的剂量。

[0545] 在用LPS刺激的小鼠中比较了10 μ g的具有1和2个K或R的sHVF18变体的活性。我们

发现,在用肽治疗的小鼠中,所有肽都能降低不同细胞因子的水平。2个K和R的变体显示出对细胞因子减少的最强作用(图15)。

[0546] 钉合肽的体外抗菌活性评价

[0547] 抗微生物肽的活性与其特定序列特征密切相关。因此,测定了在钉合的sHVF18变体中添加K和R对其抗大肠杆菌、铜绿假单胞菌01和金黄色葡萄球菌的活性的影响。在不存在NaCl的情况下(图16a)和在存在150mM NaCl的情况下(图16b)测量了清除区域。发现整体上,具有较低正净电荷的肽在不含盐的介质中更活跃,反之亦然。此外,与原始sHVF18相比,sHVF18 K和R变体清除不含NaCl的板上的细菌的能力整体上在较低浓度下更好。在含有NaCl的板上(这与体内情况更相当),特别是K数量增加的变体显示出显著改善的抗微生物活性。还研究了肽在不存在(图17a)和存在(图17b)氯化钠的溶液中的杀菌活性。在这里可以看出,与原始sHVF18相比,具有K和R的sHVF18变体对所有细菌菌株都具有更高的活性,特别是在存在盐的情况下。此外,随着肽的净电荷的增加,活性也更高。

[0548] 结论

[0549] 实施例1和2中研究的不同线性肽和钉合肽的总体结果总结于表2和图20d中。结果表明,在诸如人血液的复杂环境中,钉合肽的抗炎活性显著提高。特别是,具有2个R或K的sHVF18变体显示出优异的结果。另一方面,当用3和4个R或K取代His时,抗炎作用低于具有1和2个R或K的变体,这可能是由于这些肽的毒性较高,如溶血结果所示。这些结果表明,可插入肽结构中的带正电荷的残基具有最佳数量,在本例中对应于两个K或R残基。这两种变体都显示出更高的治疗指数,即治疗浓度和引起毒性的剂量之间有更大差异。关于抗微生物活性的保留,观察到与原始sHVF18相比,用一个或多个Lys或Arg残基取代His增强了这些变体的杀菌效果,特别是在盐存在的情况下。

[0550] 表2:线性肽和钉合肽的溶血、抗炎和抗微生物活性的比较。

[0551]

	抗炎活性		溶血活性		抗菌活性 (Log的减少)							
					金黄色葡萄球菌		铜绿假单胞菌		大肠杆菌			
	使LPS刺激的血液中的 TNF-α 释放减少50%的肽浓度	肽 (μM)	裂解的RBC %	全血中 裂解的RBC %	RDA (mm)	VCA (log10)	RDA (mm)	VCA (log10)	RDA (mm)	VCA (log10)	RDA (mm)	VCA (log10)
GKY25		3.7±2.1	7.5±1.1	<1	0.2	>6	2.5	2	2.4	1		
sGKY25		>10	96.0±5.8*	10.6±5.5*	0.2	>6	1.4	2	2.9	1		
2sGKY25		8±2.3	49.1±13.6	<1	nd	nd	nd	nd	nd	nd		
HVF18		>10	28.5±3.0*	<1*	0	0	0.7	0	0	0		
sHVF18		4.3±1.8	35.4±5.9	<1	0.8	1	1.3	0	2.4	0		
sKVF18		1.9±0.6	51.4±4.9	<1	0	>6	0.4	0	1.0	0		
sKKVF18		1.0±0.3	27.8±3.0	<1	nd	>6	nd	0	nd	0		
sKKKKVF18		2.3±0.6	47.1±8.1	<1	1.3	>6	2.1	2	2.5	1		
sKKKKKVF18		1.9±0.5	39.1±5.4	<1	1.7	>6	2.9	6	3.2	1		
sRVF18		2.3±0.6	53.6±3.8	<1	0.7	>6	1.0	1	2.7	0		
sRRVF18		1.6±0.8	49.1±4.9	<1	0.6	>6	1.0	1	2.5	0		
sRRRVF18		2.6±0.7	61.5±6.2	<1	1.2	>6	2.2	6	2.4	1		
sRRRRVF18		2.3±0.9	64.9±11.4	<1	1.1	>6	1.8	6	2.0	1		

- [0552] *对于IC₅₀>10μM的肽,如果确切的IC₅₀未知,则选择显示50μM时的溶血活性。
- [0553] 实施例3-肽的抗凝血特性
- [0554] 材料和方法
- [0555] 凝血测定
- [0556] 使用凝血计 (Amelung, Lemgo, 德国) 测量所有凝血时间。所有实验均使用新鲜收集的
人柠檬酸盐血浆。为了测量活化部分凝血活酶时间 (aPTT), 将100μL含高岭土的溶液
(Dapttin, Technoclone) 和血浆-肽混合物在37℃下孵育200s, 然后通过添加100μL 30mM新
鲜CaCl₂溶液来启动凝块形成。通过将100μL凝血试剂添加到100μL预温 (37℃ 60秒) 血浆-
肽混合物中来记录凝血酶原凝血时间 (PT, 凝血活酶试剂 (Trinity Biotech))。
- [0557] 结果

[0558] 肽的抗凝血特性的评价

[0559] 在凝血测定中测试了肽sHVF18、sKVF18、sKKVF18、sRVF18和sRRVF18。下面的序列概述中提供了这些肽的序列。结果如图18所示。

[0560] 通过LPS和细菌诱导的接触激活过度激活凝血级联会导致脓毒症和脓毒性休克期间观察到的有害影响。因此,我们研究了本发明的肽对凝血途径的可能影响。对肽对活化部分凝血活酶时间(aPTT)和凝血酶原时间(PT)的影响的分析表明,尽管所有肽变体都在体外剂量依赖性地抑制人血浆中凝血的内在途径的激活(aPTT),但RR和KK变体sHVF18特别有效(图18,上图)。相比之下,通过测量凝血酶原时间(PT)监测的外在凝血途径在任何测试剂量下均不受影响(图18,下图)。

[0561] 结论

[0562] 凝血的激活、纤维蛋白溶解的抑制以及凝血抑制剂的消耗导致促凝血状态,从而导致纤维蛋白沉积在微血管系统中,如在ARDS和脓毒症中所观察的,这些疾病可与弥散性血管内凝血(DIC)并发。结果,微血管血栓形成促进了器官功能障碍。此外,过度的接触激活会导致促炎肽缓激肽(bradykinin)的释放,并随后诱导炎症反应,从而导致低血压和血管渗漏等严重并发症。因此,在生物学相关背景下可调节包括炎症和凝血在内的多种途径(如对sHVF18所证明的)的肽,特别是KK和RR变体,对于开发未来用于这些途径过度激活(例如见于ARDS、脓毒症和其他全身炎症性疾病)的患者的基于肽的治疗方法具有重要意义。此外,由于接触系统的激活发生在多种非感染性疾病中,因此通过肽进行干扰可对涉及凝血功能障碍的其他病症有益。

[0563] 实施例4-肽的寡聚化

[0564] 材料与方法

[0565] 动态光散射(DLS)

[0566] 使用配备温控室(25°C)的DynaPro读板仪(WYATT Technology)测量溶液中颗粒的流体动力学半径。将肽(HVF18、sHVF18、sKVF18、sKKVF18、sRVF18和sRRVF18,序列在下面的序列概述中提供)重悬在pH7.4的10mM Tris中或pH5的10mM NaOAc中,终浓度为1mM,然后立即进行分析。每个样品30μL用于分析。每次测量一式三份进行,使用10次子运行。使用Dynamics 7.19软件分析流体动力学半径。结果表示为从三个独立实验获得的平均值±DS。

[0567] 结果

[0568] 肽的寡聚化

[0569] 结果如图19所示。肽的寡聚化通常被认为是一个缺点,因为它通常与毒性和免疫原性以及活性降低有关。TCP-25和HVF18寡聚化。测定了钉合对肽的寡聚化的影响。将肽溶解在pH7.4的10mM Tris或pH5的10mM NaOAc中后,立即通过动态光散射(DLS)评估溶液中颗粒的流体动力学半径的大小(nm)。我们先前报道过,在酸性pH下,TCP-25的寡聚化被抑制。此外,在该pH下,肽完全是非结构化的(unstructured)。HVF18的颗粒在pH7.4时比在pH5时更大。sHVF18在两种pH下均显示出与HVF18相比颗粒尺寸显著减小。当分析sHVF18的K和R变体的流体动力学半径时,颗粒的尺寸甚至更小并且完全独立于pH,这表明钉合和正电荷都使肽不易发生寡聚化。有趣的是,K和R变体之间以及序列中这些带正电荷的氨基酸的数量均没有观察到显著差异。

[0570] 实施例5

[0571] 材料和方法

[0572] 肽

[0573] 肽sHVF18 (HVFRLKKWIXKVIXQFGE) (SEQ ID NO:3)、其较短版本(表示为sVFR17、sFRL16、sRLK15、sLKK14、sKKW13)、sKKW13的变体(表示为sKKK14、sKKK15、sRKK14、sRRK15)、双钉合GKY25(cyclo(GKYGFY)THVFRLKKWIXKVIXQFGE)表示为2sGKY25,由AmbioPharm, Inc. (USA)合成。简而言之,使用标准的9-苄氧基羰基(Fmoc)固相肽合成(SPSS)。为了获得烃钉合的肽,将带有(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸的烯烃插入到SEQ ID NO:3和13中相应肽序列的特定位置处(由X表示)。烯烃复分解反应使用在1,2-二氯乙烷中的Grubbs第一代催化剂在固体支持物上进行。将产物肽从树脂上切下并通过RP-HPLC进一步纯化。肽以醋酸盐形式提供,并通过MALDI-TOF MS确认纯度(>95%)。

[0574] 溶血测定

[0575] 如对sHVF18的报道,测试了钉合肽对红细胞和/或全血的溶血作用。显示的数据是从至少四次独立实验获得的平均值±SEM,每次独立实验均一式三份进行。每次实验使用来自不同供体的血液。

[0576] 全血测定

[0577] 不同钉合肽在血液中的抗炎作用如对sHVF18所报道地进行。每次实验使用来自不同供体的血液。

[0578] 细胞因子测定

[0579] 使用从血液实验中获得的血浆来评估细胞因子的释放。根据制造商的说明,使用针对TNF- α 和IL-1 β 的人炎症 DuoSet[®] ELISA试剂盒(R&D Systems)。在450nm波长处测量吸光度。显示的数据是从四次独立实验获得的平均值±SEM。

[0580] 猪ARDS模型

[0581] 动物准备:将农场饲养的雌性和雄性成年野生型美国约克夏猪(yorkshire pig) (Sus scrofa domesticus)纳入该研究。将动物分为治疗组或非治疗组。总共10头平均体重为45kg的猪使用氯胺酮(Ketaminol[®] vet.100mg/mL;Farmaceutici Gellini S.p.A, Aprilia,意大利;20mg kg⁻¹)和赛拉嗪(Rompun[®] vet.20mg mL⁻¹;Bayer AG,Leverkusen,德国;2mg kg⁻¹)预先给药。将导尿管插入膀胱。将外周静脉(IV)线置于耳垂,并使用氯胺酮(Ketaminol[®] vet,MSD Animal Health Sweden,Stockholm,瑞典)、咪达唑仑(Midazolam Panpharma[®],Panpharma Nordics AS,Oslo,挪威)和芬太尼(Leptanal[®],Piramal Critical Care B.V.,Voorschoten,荷兰)输液维持全身麻醉。使用Siemens-Elema呼吸机(Servo 900C,Siemens,Solna,瑞典)通过7.5尺寸气管插管产生机械通气。根据制造商的说明,使用具有“恒流”流动模式开关的流量控制通气(VCV),降低峰值压力。为了实现1:2的I:E比率,吸气时间设置为25%,暂停时间为10%,并调整通气量以将二氧化碳水平(PaCO₂)维持在33-41mmHg之间。潮气量(Vt)保持在6-8mL kg⁻¹。使用方程(a)确定动态柔量(dynamic compliance)。

[0582]
$$(A)C_{\text{dyn}} = \frac{V_T}{(\text{峰值压力} - \text{PEEP})}$$

[0583] 此外,将动脉线(Secalon-T[™],Merit Medical Ireland Ltd,Galway,爱尔兰)插入

右颈总动脉。将肺动脉导管 (Swan-Ganz CCOmbo V and Introfex, Edwards Lifesciences Services GmbH, Unterschleissheim, 德国) 置于右颈内静脉中。

[0584] 用脂多糖诱导ARDS: 为了根据柏林标准 (Force等人) 诱导ARDS, 静脉内使用大肠杆菌LPS (0111:B4, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, 德国)。在施用前, 将LPS稀释在盐水溶液中 ($2\mu\text{g kg}^{-1}\text{min}^{-1}$)。LPS施用的结果是, 所有动物都发展了血流动力学不稳定, 并且需要持续的肌力支持, 以去甲肾上腺素 ($40\mu\text{g mL}^{-1}$, $0.05\text{--}2\mu\text{g kg}^{-1}\text{min}^{-1}$; Pfizer AB, Sollentuna, 瑞典) 和多巴酚丁胺 (2mg mL^{-1} , $2.5\text{--}5\mu\text{g kg}^{-1}\text{min}^{-1}$; Hameln Pharma Plus GmbH, Hameln, 德国) 输注的形式提供。使用林格氏醋酸盐 (Baxter Medical AB, Kista, 瑞典) 来补偿液体损失。根据柏林定义 (Force等人), 基于测定的 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 比率来定义不同的ARDS阶段: 轻度ARDS的比率在201-300mmHg之间, 中度ARDS的比率在101-200mmHg之间, 严重ARDS的比率为 $\leq 100\text{mmHg}$ 。当在15分钟间隔内进行的两次单独的动脉血气测量结果落在柏林定义的 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 范围内时, 将ARDS状态视为已确诊。

[0585] sHVF18治疗: 在治疗组中, 每只动物在30分钟内接受两次静脉内肽溶液剂量 (12毫克, 50毫升), 通过上腔静脉的中心静脉导管施用。

[0586] 动脉血气分析: 每30分钟采集动脉血并用ABL 90FLEX血气分析仪 (Radiometer Medical ApS, Brønshøj, 丹麦) 进行分析。根据临床标准, 将测量值相对于 37°C 的血液温度进行标准化。

[0587] 血流动力学测量: 密切观察动物, 在ARDS诱导开始之前以及此后每30分钟, 使用Swan-Ganz导管和动脉线进行热稀释来测量和记录血流动力学参数。记录的参数有心率 (HR)、收缩血压 (SBP)、舒张血压 (DBP)、平均动脉压 (MAP)、中心静脉压 (CVP)、心输出量 (CO)、收缩肺压 (SPP)、舒张肺压 (DPP)、平均肺压 (MPP)、肺动脉楔压 (PAWP)、全身血管阻力 (SVR) 和肺血管阻力 (PVR)。

[0588] 组织病理学分析: 确认ARDS后, 对右下叶进行活检。立即将活检组织转移到10%中性缓冲福尔马林溶液 (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 中, 并在 4°C 下固定过夜。在石蜡包埋 (Histolab) 之前, 用分级乙醇系列 (溶液获自Histolab Products AB, Gothenburg, 瑞典) 和澄清溶液 (Sigma Aldrich) 处理福尔马林固定的组织。切割 $4\mu\text{m}$ 的切片并转移至SuperFrost Plus显微镜载玻片 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, 美国)。将切片在室温下干燥过夜。脱石蜡后, 切片用苏木精和伊红 (均来自Merck Millipore, Darmstadt, 德国) 染色, 然后在连续分级的乙醇和二甲苯溶液 (Histolab) 中脱水。染色的切片最后用Pertex溶液 (Histolab) 封片。使用Olympus CKX53显微镜 (Olympus, Shinjuku, 东京, 日本) 获取明场图像。由三名盲评员根据以下五个参数对每只动物的图像的肺损伤进行独立评分: 肺泡腔和间质空间中免疫细胞的数量、蛋白质碎片的出现、肺泡间隔增厚和结构变化的表现、以及最后是出血、透明膜的表现或其他损伤加剧的迹象。基于每个标准从0到6分, 进行评分。评分表示为每个样品的特征评分的总和的平均值。

[0589] 结果

[0590] sHVF18的较短变体的溶血和抗炎活性分析

[0591] 如实施例1所示, HVF18的钉合增加了其针对蛋白水解的稳定性, 并大大提高了其抗炎活性 (体外和体内), 从而保留了其抗微生物活性, 但使其主要针对革兰氏阳性菌, 同时

具有低溶血活性。制备了sHVF18的较短变体,以评估活性肽可以有多小。双钉合的GKY25(2sGKY25),即一个位于C-端区域(如sGKY25),一个位于N-端区域,用于比较。

[0592] 生成不同钉合肽的文库,然后筛选其溶血作用(图20a)与抗炎活性(图20b)。报告的所有肽对红细胞的溶血活性百分比(其作为在LPS刺激的血液中具有TNF- α 和IL-1 β 的IC₅₀所需的相同肽的浓度的函数)表明,sHVF18特别有前途(图20c)。

[0593] sKKW13变体的溶血和抗炎活性分析

[0594] sLKK14和sKKW13均显示出低溶血活性(图20a),但sLKK14一旦在溶液中就易于寡聚化并同时丧失其免疫调节作用,而sKKW13则不然(图20b)。因此,我们假设向sKKW13添加一或两个K和R残基可以提高其抗炎活性。我们首先比较了这些新肽与原始肽以及sHVF18对全血的溶血活性(图21a)。K和R变体表现出更高的溶血活性。然后我们测试了它们减少LPS刺激的血液中细胞因子产生的能力(图21b)。所有K和R变体的活性均低于sHVF18,并且与sKKW13相比没有获得大的改进。

[0595] sHVF18对猪ARDS模型的影响

[0596] 我们进一步研究了sHVF18在已建立的临床前ARDS猪模型中的治疗效果。通过静脉注射大肠杆菌LPS诱导ARDS(研究概览如图22a所示)。所有猪在施用LPS后均发展血流动力学不稳定,需要用去甲肾上腺素进行肌力支持(肌力支持是指使用多巴酚丁胺和去甲肾上腺素的药剂,临床目的是维持血流动力学稳定)。这种血流动力学不稳定性,以及在实验过程中治疗和未治疗的猪之间的差异,通过PaO₂/FiO₂比率(图22b)、心输出量(图22c)、尿输出量(图22d)、去甲肾上腺素(NA,图22e)和乳酸盐水平(图22f)显示。

[0597] 总体而言,与未治疗动物相比,静脉施用sHVF18后,所治疗的动物的血流动力学稳定,并且需要的肌力支持显著减少。所治疗的动物在PaO₂/FiO₂比率方面的恶化程度不及未接受治疗的动物,并且根据血气(根据ARDS的柏林定义),五只所治疗的动物中仅有一只有轻度ARDS。

[0598] 在实验结束时,从右下叶采集肺组织样品,并与五只健康对照猪的肺组织样品进行比较。取自健康对照的肺活检的组织学分析显示正常,没有异常(图22G,左图)。在实验结束时从治疗和未治疗的动物采集的所有活检均显示免疫细胞浸润和弥漫性肺泡损伤迹象,包括肺泡毛细血管屏障增厚并有肺泡内出血,但在治疗猪中较少(图22g,中图和右图)。除了肺组织学的主观分析之外,还由三名独立观察者对所有猪进行盲法评分。观察到与健康对照相比,未治疗组的累积肺损伤评分显著增加,这是通过LPS施用引起急性肺损伤后多种肺损伤迹象的原因。在经治疗的猪和未经治疗的猪之间观察到显著差异(图22h),其中经治疗的猪的肺损伤迹象较少。

[0599] 实施例6

[0600] 材料和方法

[0601] 肽钉位置的计算机分析

[0602] 使用ClusPro网络服务器(Kozakov等人,2017)将HVF18的NMR结构(PDB:5Z5X)(Saravanan等人,2018)与人CD14的模型结构进行了对接。获得了与Saravanan等人,2018所述类似的结果,所述肽与CD14的N-端结合。选择得分最高的对接姿态的结构作为建模GKY25的模板。使用Modeller 9.21版对N-端GKYGFYT残基进行建模,并选择具有最低离散优化蛋白能量评分的模型(Shen等人,2006)。如Jo等人,2008中所述,使用CHARMM-GUI Solution

Builder,将GKY25-CD14复合物与TIP3P水和NaCl盐一起溶解。按照标准CHARMM-GUI方案(Lee等人,2016)进行最陡下降能量最小化和125ps平衡模拟,对蛋白和肽的主链原子施加位置约束。提取平衡后的最终快照,并使用分子力学Poisson-Boltzmann表面积(MMPBSA)方法计算GKY25和CD14之间的结合能(Kumari等人.,2014)。通过将位置i和i+3处的残基突变为丙氨酸并使用CHARMM-GUI Solution Builder将它们与两个戊烯片段连接,将疏水性钉添加到GKY25肽中(Jo等人,2008)。然后对与CD14结合的钉合GKY25进行与上述相同的溶解、最小化和平衡程序,之后使用MMPBSA测定它们的结合能。进行类似的方案以在位置i和i+4处添加钉。然后计算与非钉合GKY25的结合能差异。还在较短的HVF18肽上进行了肽钉位置的类似分析。

[0603] 结果

[0604] 具有改进的蛋白水解稳定性的双作用肽的设计

[0605] 我们然后对肽钉位置进行了计算机分析,由此沿着GKY25的序列添加了连接残基i和i+3或残基i和i+4的短疏水性戊烯基-丙氨酸钉。为了确定添加该钉对与CD14结合的影响,我们随后计算了未钉合和钉合形式的肽之间的结合能差异,结果如图23所示。我们发现,在较长的GKY25肽的大多数位置上添加钉,特别是在肽的N-端区域添加钉,会导致较差的结合,如正结合能差异所示(参见图23A和图23B中的结果)。亲和力降低可能是由肽和CD14之间的钉扰动性相互作用引起的。一些钉改善了与CD14的结合。对于i-i+3配置,这些包括I16-V19、V19-Q22、I20-D23和D21-G24,而对于i-i+4构型,这些包括V9-K13和Q17-D21。除了Q17-D21钉之外,所有导致更有利于与CD14结合的钉都包含疏水残基,这对于与LPS的相互作用可能很重要。

[0606] 相比之下,对于较短的HVF18肽,在大多数稳定物中观察到亲和力提高(参见图23C和图23D)。对于i-i+3构型,至少以下钉导致亲和力提高:V2-L5、F3-K6、L5-W8、K6-I9、I9-V12、Q10-I13、K11-D14、V12-Q15、I13-F16、D14-G17和Q15-E18。对于i-i+4构型,至少以下钉导致亲和力提高:V2-K6、K6-Q10、W8-V12、I9-I13、Q10-D14、V12-F16、I13-G17和D14-E18。对于导致结合提高的钉,Q10-D14(相当于GKY25中的Q17-D21)具有最负的结合能差异之一。

[0607] 参考文献

[0608] Force,A.D.T.et al.Acute respiratory distress syndrome:the Berlin Definition.JAMA 307,2526-2533(2012) .

[0609] Jo,S.,Kim,T.,Iyer,V.&Im,W.CHARMM-GUI:AWeb-Based Graphical User Interface for CHARMM.J.Comput.Chem.29,1859-1865(2008) .

[0610] Kalle,M.et al.Host defense peptides of thrombin modulate inflammation and coagulation in endotoxin-mediated shock and Pseudomonas aeruginosa sepsis.PLoS One 7,e51313(2012) .

[0611] Kozakov,D.et al.The ClusPro web server for protein-protein docking.Nat.Protoc.12,255-278(2017) .

[0612] Kumari,R.,Kumar,R.&Lynn,A.G-mmpbsa-A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSAcalculations.J.Chem.Inf.Model.54,1951-1962(2014) .

[0613] Lee,J.et al.CHARMM-GUI Input Generator for NAMD,GROMACS,AMBER,OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force

Field.J.Chem.Theory Comput.12,405-413(2016) .

[0614] Li,X.,et al.Stapled Helical Peptides Bearing Different Anchoring Residues,Chem.Rev.2020,120,10079-10144

[0615] Morrisett,J.D.,et al.Interaction of an apolipoprotein(apoLP-alanine) with phosphatidylcholine.Biochemistry 12,1290-1299(1973) .

[0616] Papareddy,P.et al.Proteolysis of human thrombin generates novel host defense peptides.PLoS Pathog 6,e1000857(2010) .

[0617] Petruk,G.,et al.SARS-CoV-2 Spike protein binds to bacterial lipopolysaccharide and boosts proinflammatory activity.Journal of Molecular Cell Biology,12(12)916-932(2020) .

[0618] Petruk,G.,et al.,Concentration-and pH-dependent oligomerization of the thrombin-derived C-terminal peptide TCP-25.Biomolecules,10(11),1572 (2020) .

[0619] Puthia,M.et al.A dual-action peptide-containing hydrogel targets wound infection and inflammation.Sci Transl Med 12(2020) .

[0620] Puthia,M.,et al.A dual-action peptide-containing hydrogel targets wound infection and inflammation.Science translational medicine,12(524) (2020) .

[0621] Saravanan,R.,et al.Structural basis for endotoxin neutralisation and anti-inflammatory activity of thrombin-derived C-terminal peptides.Nature communications,9(1),1-14(2018) .

[0622] Shen,M.,Devos,D.,Melo,F.&Sali,A.A composite score for predicting errors in protein structure models.Protein Sci.15,1653-1666(2006) .

[0623] Shi,X.E.et al.Hydrogen exchange-mass spectrometry measures stapled peptide conformational dynamics and predicts pharmacokinetic properties.Anal Chem 85,11185-11188(2013) .

[0624] Stromdahl,A.C.et al.Peptide-coated polyurethane material reduces wound infection and inflammation.Acta Biomater(2021) .

[0625] IVEGSDAEIGMSPWQVMLFRKSPQELLCGASLISDRWVLTAAHCLLYPPWDKNFTENDLLVRIGKHSRT
RYERNIEKISMLEKIYIHPRYNWRENLDRLALMKLKKPVAFSDYIHPVCLPDRETAASLLQAGYKGRVTGWGNLKE
TWTANVGKGQPSVLQVVNLPIVERPVCKDSTRIRITDNMFCAGYKPDEGKRGDACEGDSGGPFVMKSPFNNRWYQMG
IVSWGEGCDRDGKYGFYTHVFRLLKKWIKVIDQFGE

[0626] 缩写:

[0627] AMP:抗微生物肽;AMR:抗微生物抗性;CD:圆二色性;PAMP:病原体相关分子模式;
TCP-25:25个氨基酸的凝血酶C-端肽;TEM:透射电子显微镜;TLR:To11样受体。

[0628] 序列概述

[0629]

SEQ ID NO	描述	序列
1	凝血酶 (肽 GKY25 以粗体 表示)	IVEGSDAEIGMSPWQVMLFRKSPQELLCG ASLISDRWVLTA AHCLLYPPWDKNFTEND LLVRIGKHSRTRYERNIEKISMLEKIYIHPR YNWRENLD RDIALMKLKKPVAFSDYIHPV CLPDRETAASLLQAGYKGRVTGWGNLKE TWTANVGKGQPSVLQVVNLPIVERPVCKD STRIRITDNMFCAGYKPDEGKRGDACEGD SGGPFVMKSPFN NRWYQMGIVSWGEGCD RDGKYGFYTHVFRLKKWIKVIDQFGE
2	HVF18	HVFRLKKWIKVIDQFGE
3	sHVF18	HVFRLKKWIX ₁ KVIX ₂ QFGE
4	sKVF18	KVFRLKKWIX ₁ KVIX ₂ QFGE
5	sKKVF18	KKVFRLKKWIX ₁ KVIX ₂ QFGE
6	sKKKVF18	KKKVFRLKKWIX ₁ KVIX ₂ QFGE

[0630]

7	sKKKKVF18	KKKKVFRLKKWIX ₁ KVIX ₂ QFGE
8	sRVF18	RVFRLKKWIX ₁ KVIX ₂ QFGE
9	sRRVF18	RRVFRLKKWIX ₁ KVIX ₂ QFGE
10	sRRRVF18	RRRVFRLKKWIX ₁ KVIX ₂ QFGE
11	sRRRRVF18	RRRRVFRLKKWIX ₁ KVIX ₂ QFGE
12	GKY25	GKYGFYTHVFRLKKWIKVIDQFGE
13	sGKY25	GKYGFYTHVFRLKKWIX ₁ KVIX ₂ QFGE
14	2sGKY25	cyclo[GKYGE]YTHVFRLKKWIX ₁ KVIX ₂ QFGE
15	FYT21	FYTHVFRLKKWIKVIDQFGE
16	凝血酶原(肽GKY25以粗体表示, 肽原以下划线表示)	<u>MAHVRGLQLPGCLALAALCSLVHSQHVEL</u> <u>APQQARSLLRVRRANTFLEEVKGNLER</u> ECVEETCSYEEAFEALESSTATDVFWAKYT ACETARTPRDKLAACLEGNCAEGLGTNYR GHVNITRSGIECQLWRSRYPHKPEINSTTHP GADLQENFCRNPDSSTTGPWCYTDDPTVR RQECVIPVCGQDQVTVAMTPRSEGSSVNLS PPLEQCVPRGQYQGR LAVTTHGLPCLA WASAQAKALSKHQDFNSAVQLVENFCRNP DGDEEGVWCYVAGKPGDFGYCDLNYCEE AVEEETGDGLDEDS DRAIEGRTATSEYQTF FNPRTFGSGEADCGLRPLFEKKSLEDKTER ELLESYIDGRIVEGSDAEIGMSPWQVMLFR KSPQELLCGASLISDRWVLTA AHCLLYPPW DKNFTENDLLVRIGKHSRTRYERNIEKISM LEKIYIHPRYNWRENLD RDIALMKLKKPV AFSDYIHPVCLPDRETAASLLQAGYKGRVT

[0631]

		GWGNLKETWTANVGKGQPSVLQVVNLPI VERPVCKDSTRITDNMFCAKYKPDEGK RGDACEGDSGGPFVMKSPFNNRWYQMGI VSWGEGCDRDGKYGFYTHVFRLKKWIQ KVIDQFGE
17	sVFR17	VFRLKKWIX ₁ KVIX ₂ QFGE
18	sFRL16	FRLKKWIX ₁ KVIX ₂ QFGE
19	sRLK15	RLKKWIX ₁ KVIX ₂ QFGE
20	sLKK14	LKKWIX ₁ KVIX ₂ QFGE
21	sKKW13	KKWIX ₁ KVIX ₂ QFGE
22	sKKK14	KKKWIX ₁ KVIX ₂ QFGE
23	sKKK15	KKKKWIX ₁ KVIX ₂ QFGE
24	sRKK14	RKKWIX ₁ KVIX ₂ QFGE
25	sRRK15	RRKKWIX ₁ KVIX ₂ QFGE
26	2sGKY25_2	cyclo[X ₃ KYGX ₄]YTHVFRLKKWIX ₁ KVIX ₂ Q FGE

[0632] 在上面的序列表中, X₁和X₂最初各自为(S)-2-(4'戊烯基)-丙氨酸,它们通过RCM彼此反应以形成烯烃系链。在所述序列表中,给出了未反应的肽的序列。技术人员理解,尽管提供了未反应的序列,但通常肽以钉合形式使用,即在通过RCM形成烯烃系链之后。另外, X₃和X₄分别是甘氨酸和谷氨酸,它们彼此反应以形成内酰胺桥形式的共价连接。

[0633] 项

[0634] 本发明还可以由以下任一项来定义:

[0635] 1.一种肽,其包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶的10至23个氨基酸范围内的含有至多6个氨基酸取代的连续序列,其中所述肽:

[0636] i) 总长度在10至40个氨基酸之间;

[0637] ii) 在两个不相邻的内部氨基酸的侧链之间包含至少一个内部共价连接,其中所述氨基酸表示为X₁和X₂;和

[0638] iii) 至少包含SEQ ID NO:1的凝血酶的氨基酸K247、K248和K252;

[0639] 条件是,如果肽的总长度在24至40个氨基酸之间,则它在两个不相邻的内部氨基酸的侧链之间包含至少两个内部共价连接,其中第一内部共价连接的氨基酸表示为X₁和X₂,

并且第二内部共价连接的氨基酸表示为 X_3 和 X_4 。

[0640] 2. 项1的肽, 其中所述肽包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶的10至40个氨基酸范围内的连续序列。

[0641] 3. 一种肽, 其包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶的10至23个氨基酸范围内的含有至多6个氨基酸取代的连续序列, 其中所述肽:

[0642] i) 总长度在10至23个氨基酸之间;

[0643] ii) 在两个不相邻的内部氨基酸的侧链之间包含至少一个内部共价连接, 其中所述氨基酸表示为 X_1 和 X_2 ; 和

[0644] iii) 至少包含SEQ ID NO:1的凝血酶的氨基酸K247、K248和K252。

[0645] 4. 一种肽, 其包含来自SEQ ID NO:12的GKY25的10至23个氨基酸范围内的含有至多6个氨基酸取代的连续序列, 其中所述肽:

[0646] i) 总长度在10至23个氨基酸之间;

[0647] ii) 包含两个不相邻的内部氨基酸的侧链之间的至少一个内部共价连接, 其中所述氨基酸表示为 X_1 和 X_2 ; 和

[0648] iii) 至少包含SEQ ID NO:12的GKY25的氨基酸K13、K14和K18。

[0649] 5. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述肽包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶或SEQ ID NO:12的GKY25的13至23个氨基酸范围内的连续序列。

[0650] 6. 一种肽, 其包含以下氨基酸序列或由以下氨基酸序列组成:

[0651] $-U-U-(Z)_n-I-Q-K-V-I-D-Q-(Z)_m-$

[0652] 其中

[0653] 肽的总长度在10至23个氨基酸之间; 和

[0654] 每个Z单独地是任何常规氨基酸; 和

[0655] U是His、Lys或Arg; 和

[0656] n为0至10范围内的整数; 和

[0657] m为0至5范围内的整数, 且

[0658] 其中所述氨基酸的两个已被侧链通过共价连接连接的烯基化氨基酸取代。

[0659] 7. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述肽的总长度为13至23个氨基酸。

[0660] 8. 一种肽, 其包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶的13至23个氨基酸范围内的含有至多6个氨基酸取代的连续序列, 其中所述肽:

[0661] i) 总长度在13至23个氨基酸之间;

[0662] ii) 在两个不相邻的内部氨基酸的侧链之间包含至少一个内部共价连接, 其中所述氨基酸表示为 X_1 和 X_2 ; 和

[0663] iii) 至少包含SEQ ID NO:1的凝血酶的氨基酸R245、K247、K248、K252。

[0664] 9. 根据项1和8中任一项所述的肽, 其中所述肽至少包含SEQ ID NO:1的凝血酶的氨基酸R245、K247、K248、K252。

[0665] 10. 一种肽, 其包含来自SEQ ID NO:12的GKY25的13至23个氨基酸范围内的含有至多6个氨基酸取代的连续序列, 其中所述肽:

[0666] i) 总长度在13至23个氨基酸之间;

[0667] ii) 在两个不相邻的内部氨基酸的侧链之间包含至少一个内部共价连接, 其中所

述氨基酸表示为 X_1 和 X_2 ;和

[0668] iii) 至少包含SEQ ID NO:12的GKY25的氨基酸K13、K14和K18。

[0669] 11. 项10所述的肽,其中所述肽至少包含SEQ ID NO:12的凝血酶的氨基酸R11、K13、K14和K18。

[0670] 12. 根据前述项中任一项所述的肽,其中所述肽在两个不相邻的内部氨基酸之间包含仅一个内部共价连接。

[0671] 13. 前述项中任一项所述的肽,其中氨基酸 X_1 位于位置n并且氨基酸 X_2 位于位置n+3、或位置n+4、或位置n+5、或位置n+6、或位置n+7、或位置n+8、或位置n+9、或位置n+10、或位置n+11,其中n是2至18范围内的整数。

[0672] 14. 根据前述项中任一项所述的肽,其中氨基酸 X_1 位于位置n并且氨基酸 X_2 位于位置n+3、或位置n+4、或位置n+7、或位置n+11,其中n为2至18范围内的整数。

[0673] 15. 根据前述项中任一项所述的肽,其中氨基酸 X_1 位于位置n并且氨基酸 X_2 位于位置n+3、或位置n+4、或位置n+7,其中n为2至18范围内的整数。

[0674] 16. 根据前述项中任一项所述的肽,其中氨基酸 X_1 位于位置n并且氨基酸 X_2 位于位置n+4或位置n+7,其中n是2至18范围内的整数。

[0675] 17. 根据前述项中任一项所述的肽,条件是当将所述肽序列与SEQ ID NO:12的GKY25的序列进行比对时,则

[0676] a. X_2 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Lys对齐;和

[0677] b. 当 X_1 与Lys对齐时, X_2 不与Gln对齐。

[0678] 18. 根据前述项中任一项所述的肽,条件是当将所述肽序列与SEQ ID NO:12的GKY25的序列进行比对时,则

[0679] a. X_1 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Arg11对齐

[0680] b. X_1 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Lys14对齐

[0681] c. X_2 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Lys14对齐;和

[0682] d. X_2 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Lys18对齐;和

[0683] e. 当 X_1 与SEQ ID NO:12的Lys18对齐时, X_2 不与Gln22对齐。

[0684] 19. 根据前述项中任一项所述的肽,其中氨基酸 X_1 位于位置n并且氨基酸 X_2 位于位置n+3,其中n是2至18范围内的整数,条件是当将所述肽序列与SEQ ID NO:12的GKY25的序列进行比对时,则

[0685] a. X_1 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Arg11对齐

[0686] b. X_1 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Lys14对齐;和

[0687] c. X_2 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Lys14对齐。

[0688] 20. 根据前述项中任一项所述的肽,其中氨基酸 X_1 位于位置n并且氨基酸 X_2 位于位置n+4,其中n是2至18范围内的整数,条件是当将所述肽序列与SEQ ID NO:12的GKY25的序列进行比对时,则

[0689] a. X_1 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Arg11对齐

[0690] b. X_1 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Leu12对齐

[0691] c. X_1 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Lys14对齐

[0692] d. X_2 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Lys14对齐;

[0693] e. X_1 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Lys18对齐;和

[0694] f. X_2 不与SEQ ID NO:12的GKY25中的Lys18对齐。

[0695] 21.根据前述项中任一项所述的肽,其中氨基酸 X_1 位于位置n并且氨基酸 X_2 位于位置n+3,其中n是2至18范围内的整数,其中将所述肽序列与SEQ ID NO:12的GKY25的序列进行比对时,则 X_1 和 X_2 对应于SEQ ID NO:12的Val19和Leu12;或Phe10和Lys13;或Leu12和Trp15;或Lys13和Ile16,或Ile16和Val19;或Gln17和Ile20;或Lys18和Asp21;或Val19和Gln22;或Ile20和Phe23;或Asp21和Gly24;或Gln22和Glu25。

[0696] 22.根据前述项中任一项所述的肽,其中氨基酸 X_1 位于位置n并且氨基酸 X_2 位于位置n+4,其中n是2至18范围内的整数,其中将所述肽序列与SEQ ID NO:12的GKY25的序列进行比对时,则 X_1 和 X_2 对应于SEQ ID NO:12的Val19和Lys13;或Lys13和Gln17;或Trp15和Val19;或Ile16和Ile20;或Gln17和Asp21;或Val19和Phe23;或Ile20和Gly24;或Asp21和Glu18。

[0697] 23.根据前述项中任一项所述的肽,其中氨基酸 X_1 位于位置n并且氨基酸 X_2 位于位置n+4,其中n是2至18范围内的整数,其中当将所述肽序列与SEQ ID NO:12的GKY25的序列进行比对时,则 X_1 和 X_2 对应于SEQ ID NO:12的Gln17和Asp21。

[0698] 24.根据前述项中任一项所述的肽,其中 X_1 和 X_2 选自由以下组成的组:

[0699] i) X_1 是Lys并且 X_2 选自由Asp、Glu、Lys、Cys和Tyr组成的组;

[0700] ii) X_1 是Cys并且 X_2 选自由Cys、Lys和Met组成的组;

[0701] iii) X_1 是Asp并且 X_2 是Lys;

[0702] iv) X_1 是Glu并且 X_2 选自由Lys和Glu组成的组;

[0703] v) X_1 是Tyr并且 X_2 选自由Lys、Phe和Trp组成的组;

[0704] vi) X_1 是Met并且 X_2 选自由Met和Cys组成的组;

[0705] vii) X_1 是His并且 X_2 是His;

[0706] viii) X_1 是Phe并且 X_2 选自由Phe、Tyr、Ala和Trp组成的组;

[0707] ix) X_1 是Ala并且 X_2 是Phe或Tyr;

[0708] x) X_1 是Trp并且 X_2 选自由Trp、Phe和Tyr组成的组;

[0709] xi) X_1 是Gly并且 X_2 是Glu。

[0710] 25.根据前述项中任一项所述的肽,其中 X_1 是Lys并且 X_2 是Asp、Glu、Cys或Lys,或反之亦然。

[0711] 26.根据前述项中任一项所述的肽,其中 X_1 和 X_2 是Cys,并且其中所述共价连接是直接共价键(即二硫桥)或通过交联接头,其中所述交联接头例如是双烷基化剂,例如包含至少两个(溴甲基)取代基的接头。

[0712] 27.根据前述项中任一项所述的肽,其中 X_1 或 X_2 是衍生化的常规氨基酸,例如选自由Ser衍生物和Ala衍生物组成的组。

[0713] 28.根据前述项中任一项所述的肽,其中所述共价连接是通过连接两个非常规氨基酸形成的,任选地其中所述非常规氨基酸已经取代了凝血酶的两个天然氨基酸。

[0714] 29.根据前述项中任一项所述的肽,其中所述共价连接是炔钎。

[0715] 30.根据前述项中任一项所述的肽,其中 X_1 和 X_2 是烯基化氨基酸,例如两个C-烯基化氨基酸,例如两个 α -取代的烯基氨基酸和/或 α, α -二取代的烯基氨基酸,并且所述共价连

接是在所述烯基残基之间形成的烯烃系链。

[0716] 31. 根据项30所述的肽, 其中所述烯基化氨基酸是已经烯基化的凝血酶天然的氨基酸, 和/或取代凝血酶天然的氨基酸的烯基化氨基酸。

[0717] 32. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中 X_1 和 X_2 各自选自自由烯基化Ala、烯基化Leu、烯基化Met、烯基化Ser、烯基化Tyr、烯基化Lys、烯基化Arg和烯基化Phe组成的组。

[0718] 33. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中 X_1 或 X_2 之一是烯基化Ala, 并且另一个选自自由烯基化Ala、烯基化Leu、烯基化Met、烯基化Ser、烯基化Tyr、烯基化Lys、烯基化Arg和烯基化Phe组成的组。

[0719] 34. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中 X_1 和/或 X_2 是烯基化的丙氨酸。

[0720] 35. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中 X_1 和/或 X_2 是 α, α -二取代的烯基化丙氨酸, 并且所述共价连接是在所述烯基残基之间形成的烯烃系链。

[0721] 36. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中 X_1 和/或 X_2 通过系链连接, 其中所述系链是从C- α 碳开始计算的10个碳原子的烯烃链。

[0722] 37. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中 X_1 和/或 X_2 是烯基化丙氨酸, 其通过闭环复分解彼此连接形成烯烃系链, 其中所述系链是从C- α 碳开始计算的10个碳原子的烯烃链。

[0723] 38. 根据项36至37中任一项所述的肽, 其中所述烯烃链是无支链的烯烃链。

[0724] 39. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中 X_1 和/或 X_2 是烯基化Ser, 例如O-烯基化Ser。

[0725] 40. 根据项30至39中任一项所述的肽, 其中所述烯基化氨基酸在烯基链中包含2至10个碳, 例如2、3、4、5、6、7、8、9或10个碳, 优选4、5或6个碳。

[0726] 41. 根据项30至40中任一项所述的肽, 其中所述烯基化氨基酸是 α -取代的烯基烯烃封端的氨基酸和/或 α, α -二取代的烯基烯烃封端的氨基酸。

[0727] 42. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中 X_1 和/或 X_2 是 α, α -二取代的S-或R-戊烯基丙氨酸(S5或R5)和S-或R-辛烯基丙氨酸(S8或R8)丙氨酸。

[0728] 43. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述内部烃钉通过连接两个(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸而形成。

[0729] 44. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述共价连接通过闭环(ring-closing)形成。

[0730] 45. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述共价连接通过闭环复分解(RCM)形成。

[0731] 46. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中 X_1 是非常规的叠氨基封端的氨基酸并且 X_2 是非常规的炔基封端的氨基酸, 或反之亦然。

[0732] 47. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中 X_3 和 X_4 相对于 X_1 和 X_2 更靠近N-端。

[0733] 48. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中氨基酸 X_3 位于位置n, 并且氨基酸 X_4 位于位置n+3、或位置n+4、或位置n+5, 其中n是整数。在优选的实施方案中, 氨基酸 X_3 位于位置n, 并且氨基酸 X_4 位于位置n+4。

[0734] 49. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中氨基酸 X_3 位于所述肽的极N-端。

[0735] 50. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中氨基酸 X_3 位于所述肽的极N-端并且氨基酸 X_4 位于位置n+4。

[0736] 51. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述内部共价键是通过胺与羧酸反应形成的酰胺键。

[0737] 52. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述内部共价键是通过胺与羧酸反应形成的内酰胺桥。

[0738] 53. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中 X_3 是带有N-端胺基团的N-端氨基酸, 并且 X_4 是带有羧酸侧链的氨基酸, 并且其中 X_3 和 X_4 通过所述胺与所述羧酸反应形成的内部共价键而连接。

[0739] 54. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中当将本发明的肽的序列与SEQ ID NO:12的GKY25的序列进行比对时, 则 X_3 和 X_4 对应于SEQ ID NO:12的Gly1和Phe5。

[0740] 55. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中 X_3 和 X_4 对应于SEQ ID NO:14的Gly1和Glu5。

[0741] 56. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述肽具有14至22个氨基酸之间的长度, 例如15至21个氨基酸之间, 例如16至20个氨基酸之间, 例如17至20个氨基酸之间的长度。

[0742] 57. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述肽具有18至20个氨基酸的长度, 例如18或19个氨基酸的长度。

[0743] 58. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述肽包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶的14至22个氨基酸之间、例如13至18个氨基酸之间、例如15至21个氨基酸之间、例如16至20个氨基酸之间、例如17至20个氨基酸之间、优选17至18个氨基酸之间的连续氨基酸序列。

[0744] 59. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述肽具有24至40个氨基酸之间的长度, 例如25至35个氨基酸之间, 例如25至30个氨基酸之间, 例如28至34个氨基酸之间的长度。

[0745] 60. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述肽包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶的在16至21个氨基酸范围内的含有至多6个氨基酸取代的连续氨基酸序列, 或由该连续序列组成。

[0746] 61. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述肽包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶的在17至18个氨基酸范围内的含有至多2个氨基酸取代的连续氨基酸序列或由该连续序列组成, 其中所述肽可以包含至多4个另外的氨基酸。

[0747] 62. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述肽包含来自SEQ ID NO:1的凝血酶的在17至18个氨基酸范围内的含有一个氨基酸被氨基酸 X_1 取代和一个氨基酸被氨基酸 X_2 取代的连续氨基酸序列或由该连续序列组成, 其中所述肽可以包含至多4个另外的氨基酸。

[0748] 63. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中与凝血酶的所述连续序列相比, 所述肽包含至少2个氨基酸取代, 例如3个氨基酸取代, 例如4个氨基酸取代, 例如5个氨基酸取代。

[0749] 64. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述取代中的一个或多个是保守取代, 例如其中1、2、3或4个氨基酸取代是保守取代。

[0750] 65. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述肽还包含与所述肽缀合的一个或多个部分, 任选地其中所述肽和所述一个或多个部分通过接头彼此缀合, 其中所述一个或多个部分选自烷基、芳基、杂芳基、烯烃、脂肪酸、聚乙二醇(PEG)、糖和多糖。

[0751] 66. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述肽还包含在所述肽的末端处或接近所述肽的末端处插入的1至5个、例如1至4个、例如1至3个、例如1至2个、例如2个带正电荷的氨基酸。

[0752] 67. 根据项66所述的肽, 其中所述带正电荷的氨基酸在N-端处或接近N-端处插入, 例如在选自相对于所述肽N-端的位置1、2、3、4和/或5的位置处插入。

[0753] 68. 根据项66至67中任一项所述的肽, 其中所述带正电荷的氨基酸插入在N-端。

[0754] 69. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述肽包含在N-端处或接近N-端处、例如在选自相对于所述肽N-端的位置1、2和/或3的位置处插入的2个带正电荷的氨基酸。

[0755] 70. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述肽由SEQ ID NO:1的凝血酶的15至20个连续氨基酸(其中2个氨基酸已被形成内部羟钉的烯基化氨基酸取代)和2至5个另外的N-端氨基酸组成。

[0756] 71. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述肽由SEQ ID NO:1的凝血酶的16至18个连续氨基酸(其中2个氨基酸已被形成内部羟钉的烯基化氨基酸取代)和2至5个另外的N-端氨基酸组成。

[0757] 72. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述肽由SEQ ID NO:1的凝血酶的17个连续氨基酸(其中2个氨基酸已被形成内部羟钉的烯基化氨基酸取代)和2至3个另外的N-端氨基酸组成。

[0758] 73. 根据项66至72中任一项所述的肽, 其中所述另外的N-端氨基酸带正电荷。

[0759] 74. 根据项66至73中任一项所述的肽, 其中所述带正电荷的氨基酸选自由精氨酸、赖氨酸和组氨酸组成的组, 优选地, 其中所述带正电荷的氨基酸是精氨酸和/或赖氨酸, 甚至更优选地, 其中所述带正电荷的氨基酸是赖氨酸。

[0760] 75. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述烯基化氨基酸如项30至43中任一项所定义。

[0761] 76. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述肽包含序列:

[0762] -K-K-Z-Z-X₁-K-Z-Z-X₂-Z

[0763] 其中

[0764] 每个Z单独地是任何常规氨基酸; 和

[0765] X₁和X₂是侧链通过共价连接连接的氨基酸。

[0766] 77. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述肽包含序列:

[0767] U-U-(Z)_n-K-K-Z-Z-X₁-K-Z-Z-X₂-Z,

[0768] 其中

[0769] 每个Z单独地是任何常规氨基酸;

[0770] U是His、Lys或Arg;

[0771] n是0至10范围内的整数; 并且

[0772] X₁和X₂是侧链通过共价连接连接的氨基酸。

[0773] 78. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述肽包含序列:

[0774] Z-R-Z-K-K-Z-Z-X₁-K-Z-Z-X₂-Z

[0775] 其中

[0776] 每个Z单独地是任何常规氨基酸; 和

[0777] X₁和X₂是通过共价连接连接的氨基酸。

[0778] 79. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述肽包含以下序列或由以下序列组成:

[0779] U-U-Z-Z-R-Z-K-K-Z-Z-X₁-K-Z-Z-X₂-Z

- [0780] 其中
- [0781] 每个Z单独地是任何常规氨基酸；
- [0782] U是His、Arg或Lys；并且
- [0783] X_1 和 X_2 是通过共价连接连接的氨基酸。
- [0784] 80. 根据前述项中任一项所述的肽，其中所述肽包含以下序列或由以下序列组成：
- [0785] V-F-R-L-K-K-W-I- X_1 -K-V-I- X_2 -Q-F-G-E
- [0786] 其中
- [0787] X_1 和 X_2 是通过共价连接连接的氨基酸。
- [0788] 81. 根据前述项中任一项所述的肽，其中所述肽包含以下序列或由以下序列组成：
- [0789] U-U-V-F-R-L-K-K-W-I- X_1 -K-V-I- X_2 -Q-F-G-E
- [0790] 其中
- [0791] U是His、Arg或Lys；并且
- [0792] X_1 和 X_2 是通过共价连接连接的氨基酸。
- [0793] 82. 根据项76至81中任一项所述的肽，其中U是Lys或Arg。
- [0794] 83. 根据前述项中任一项所述的肽，其中所述肽包含如下所示的序列或由如下所示的序列组成：
- [0795] i) SEQ ID NO:3
- [0796] ii) SEQ ID NO:4
- [0797] iii) SEQ ID NO:5
- [0798] iv) SEQ ID NO:6
- [0799] v) SEQ ID NO:7
- [0800] vi) SEQ ID NO:8；
- [0801] vii) SEQ ID NO:9；
- [0802] viii) SEQ ID NO:10；
- [0803] ix) SEQ ID NO:11
- [0804] x) SEQ ID NO:17；
- [0805] xi) SEQ ID NO:18；
- [0806] xii) SEQ ID NO:19；
- [0807] xiii) SEQ ID NO:20；
- [0808] xiv) SEQ ID NO:21；
- [0809] xv) SEQ ID NO:22；
- [0810] xvi) SEQ ID NO:23；
- [0811] xvii) SEQ ID NO:24；
- [0812] xviii) SEQ ID NO:25；或者
- [0813] xix) SEQ ID NO:26
- [0814] 其中 X_1 和 X_2 是通过共价连接连接的氨基酸，并且其中 X_3 和 X_4 是通过共价连接连接的氨基酸。
- [0815] 84. 根据前述项中任一项所述的稳定肽，其中所述肽包含如下所示的序列或由如下所示的序列组成：

[0816] iv)SEQ ID NO:3

[0817] v)SEQ ID NO:4

[0818] vi)SEQ ID NO:5

[0819] vii)SEQ ID NO:8;或者

[0820] viii)SEQ ID NO:9

[0821] 其中 X_1 和 X_2 是通过共价连接连接的氨基酸。

[0822] 85.根据前述项中任一项所述的肽,其中所述肽包含如下所示的序列或由如下所示的序列组成:

[0823] i)SEQ ID NO:3;

[0824] ii)SEQ ID NO:5;

[0825] iii)SEQ ID NO:6;或者

[0826] iv)SEQ ID NO:7;

[0827] 其中 X_1 和 X_2 是侧链通过共价连接连接的氨基酸,任选地,其中 X_1 和 X_2 是(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸,其侧链已经彼此反应以形成烯基系链,进一步任选地,其中 X_1 和 X_2 是Ala,其侧链通过包含一个双键的 C_8 烯基系链彼此共价结合。

[0828] 86.根据前述项中任一项所述的肽,其中所述肽包含如下所示的序列或由如下所示的序列组成:

[0829] i)SEQ ID NO:3

[0830] ii)SEQ ID NO:5;或者

[0831] 其中 X_1 和 X_2 是侧链通过共价连接连接的氨基酸,任选地,其中 X_1 和 X_2 是(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸,其侧链已经彼此反应以形成烯基系链,进一步任选地,其中 X_1 和 X_2 是Ala,其侧链通过包含一个双键的 C_8 烯基系链彼此共价结合。

[0832] 87.根据前述项中任一项所述的肽,其中所述肽包含如下所示的序列或由如下所示的序列组成:

[0833] i)SEQ ID NO:14;或者

[0834] ii)SEQ ID NO:26

[0835] 其中 X_1 和 X_2 是侧链通过共价连接连接的氨基酸;并且进一步地,其中 X_3 和 X_4 是侧链通过共价连接连接的氨基酸,优选地,其中 X_1 和 X_2 是(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸,其侧链已经彼此反应以形成烯基系链,并且 X_3 和 X_4 分别是Gly和Glu,它们已经彼此反应以形成内酰胺桥。

[0836] 88.根据项49至项55中任一项所述的肽,其中 X_1 和 X_2 如项13至项47中任一项所定义。

[0837] 89.根据前述项中任一项所述的肽,其中 X_3 和 X_4 如项13至项55中任一项所定义。

[0838] 90.根据前述项中任一项所述的肽,其中所述肽在水性溶液中含有至少一个 α 螺旋二级结构单元。

[0839] 91.根据项90所述的肽,其中所述 α 螺旋二级结构单元在结合靶分子例如簇分化14(CD14)后得以维持。

[0840] 92.根据前述项中任一项所述的肽,其中所述肽在pH7.4时具有小于150nm、例如小于100nm的流体动力学半径,和/或在pH5时具有小于100nm、例如小于80nm的流体动力学半

径。

[0841] 93. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中当在相同条件下测试时, 与除了氨基酸 X_1 和 X_2 被交换为缺乏共价连接的其他氨基酸之外具有相同序列的肽相比, 所述肽具有增加的体内和/或体外稳定性。

[0842] 94. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中当在相同条件下测试时, 例如与除了氨基酸 X_1 和 X_2 被交换为缺乏共价连接的其他氨基酸之外具有相同序列的肽相比, 所述肽在丝氨酸蛋白酶存在下具有增加的稳定性。

[0843] 95. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中50 μ M的肽在新鲜全血中具有至多5%的溶血活性, 例如至多4%、例如至多3%、例如至多2%的溶血活性。

[0844] 96. 根据前述项中任一项所述的肽, 在LPS刺激的血液在体外将TNF- α 释放降低50%的肽浓度下, 所述肽在新鲜全血中具有至多10%、优选至多5%的溶血活性。

[0845] 97. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述肽具有抗凝血活性。

[0846] 98. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述肽在60 μ M的浓度下使通过aPPT测定的凝血时间增加至少100%和/或在40 μ M的肽浓度下使通过aPPT测定的凝血时间增加至少90%。

[0847] 99. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述肽减轻炎症和/或感染。

[0848] 100. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述肽在一种或多种内毒素例如LPS的存在下减少促炎细胞因子的分泌。

[0849] 101. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述肽在体内减少包含一种或多种内毒素例如LPS的血液中促炎细胞因子的分泌。

[0850] 102. 根据项100或102中任一项所述的肽, 其中所述促炎细胞因子选自由以下组成的组: 肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 β (IL-1 β)、白细胞介素6 (IL-6)、白介素10 (IL-10)、干扰素 (IFN- γ) 和/或单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)。

[0851] 103. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述肽在tol1样受体 (TLR) 激动剂例如脂多糖 (LPS)、脂磷壁酸 (LTA)、金黄色葡萄球菌肽聚糖 (SA-PGN) 和/或酵母聚糖的存在下降低NF- κ B活化。

[0852] 104. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中当在相同条件下测试时, 与除了氨基酸 X_1 和 X_2 被交换为缺乏共价连接的其他氨基酸之外具有相同序列的肽相比, 在存在LPS的情况下在新鲜血液中孵育后, 10 μ M的肽将TNF- α 和/或IL-1 β 的分泌减少至少50%, 例如至少60%, 例如至少70%。

[0853] 105. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中所述肽是杀菌的, 例如其中所述肽能够通过破坏细菌膜来杀伤细菌。

[0854] 106. 根据项105所述的肽, 其中所述细菌选自由金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和大肠杆菌组成的组。

[0855] 107. 根据前述项中任一项所述的肽, 其中在全身施用所述肽后, 所述肽的抗炎作用在体内维持24小时。

[0856] 108. 根据前述项中任一项所述的肽, 用作药物。

[0857] 109. 根据前述项中任一项所述的肽, 用于治疗 and/或预防有需要的个体中的炎症和/或感染的方法中。

- [0858] 110. 根据项109所述使用的肽,其中所述炎症与感染相关。
- [0859] 111. 根据项1至108中任一项所述的肽,用于治疗或预防选自以下组成的组的疾病的方法中:急性炎症、脓毒症、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、慢性阻塞性肺病(COPD)、囊性纤维化、哮喘、过敏性鼻炎和其他类型的鼻炎、血管炎、血栓形成、弥散性血管内凝血(DIC)、胃肠炎和肺部炎症。
- [0860] 112. 根据项109至110中任一项所述使用的肽,其中所述炎症选自急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、严重急性呼吸综合征(SARS)、胃肠炎和肺部炎症组成的组。
- [0861] 113. 根据项109至110中任一项所述使用的肽,其中所述炎症是ARDS。
- [0862] 114. 根据项109至113中任一项所述使用的肽,其中所述治疗是全身性的。
- [0863] 115. 根据项109至114中任一项所述使用的肽,其中所述方法包括肽的胃肠外施用,例如皮下或静脉内施用。
- [0864] 116. 根据项109至115中任一项所述使用的肽,其中所述个体是人类。
- [0865] 117. 根据项109至116中任一项所述使用的肽,其中所述感染是微生物感染,例如细菌感染或病毒感染。
- [0866] 118. 根据项109至117中任一项所述使用的肽,其中所述个体患有细菌感染。
- [0867] 119. 根据项118所述使用的肽,其中所述细菌感染是急性或慢性细菌感染,例如革兰氏阴性细菌的感染。
- [0868] 120. 根据项109至119中任一项所述使用的肽,其中所述个体具有增加的内毒素水平,例如增加的LPS、LTA和/或SA-PGN水平。
- [0869] 121. 根据项109至120中任一项所述使用的肽,其中所述个体在一种或多种体液中具有增加的内毒素水平,任选地,其中所述体液选自血液、血清、唾液、鼻咽拭子样品和支气管肺泡灌洗(BAL)样品组成的组,还任选地,其中所述内毒素是LPS。
- [0870] 122. 根据项109至121中任一项所述使用的肽,其中所述增加的LPS水平是至少50pg/ml的水平,例如至少50pg/ml的血清LPS水平。
- [0871] 123. 根据项109至122中任一项所述使用的肽,其中所述个体患有病毒感染。
- [0872] 124. 根据项123所述使用的肽,其中所述病毒感染是S蛋白病毒的感染,例如冠状病毒科病毒的感染,例如选自以下组成的组的病毒的感染:
- [0873] PorCov-HKU15,
- [0874] SARS-CoV,
- [0875] HCoV NL63
- [0876] HKU1,
- [0877] MERS-CoV
- [0878] SARS-CoV 2,和
- [0879] MERS-CoV。
- [0880] 125. 一种治疗和/或预防有需要的个体中的炎症和/或感染的方法,所述方法包括向所述个体施用治疗有效量的根据项1至107中任一项所述的肽。
- [0881] 126. 根据项125所述的方法,其中所述治疗、所述炎症、所述感染和/或所述个体如项110至项124中任一项所定义。
- [0882] 127. 根据项1至项107中任一项所述的肽在制备用于治疗和/或预防有需要的个体

中的炎症和/或感染的药物中的用途。

[0883] 128. 根据项127所述的用途, 其中所述治疗、所述炎症、所述感染和/或所述个体如项110至项124中任一项所定义。

[0884] 129. 一种药物组合物, 其包含项1至项107中任一项所述的肽。

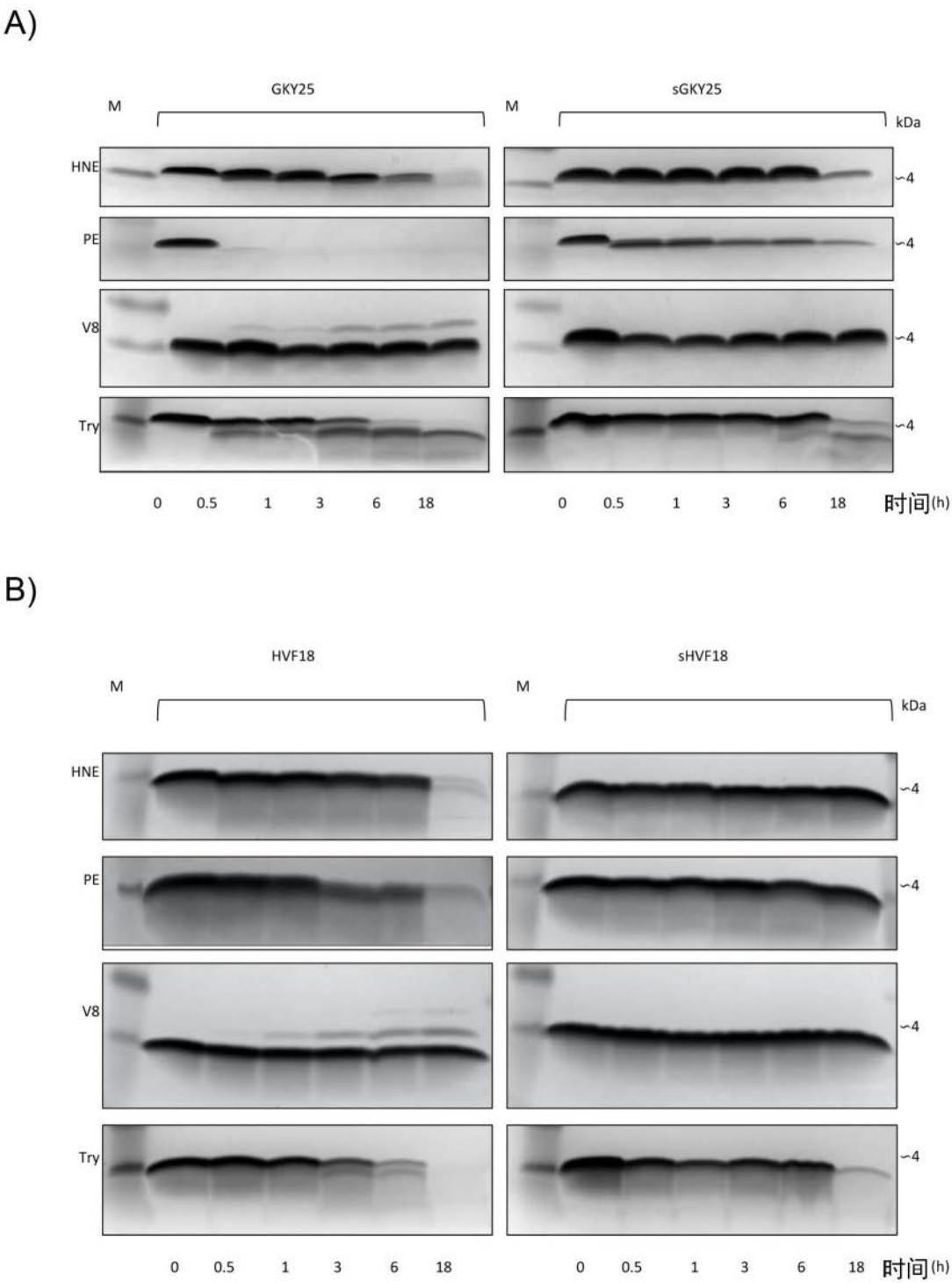
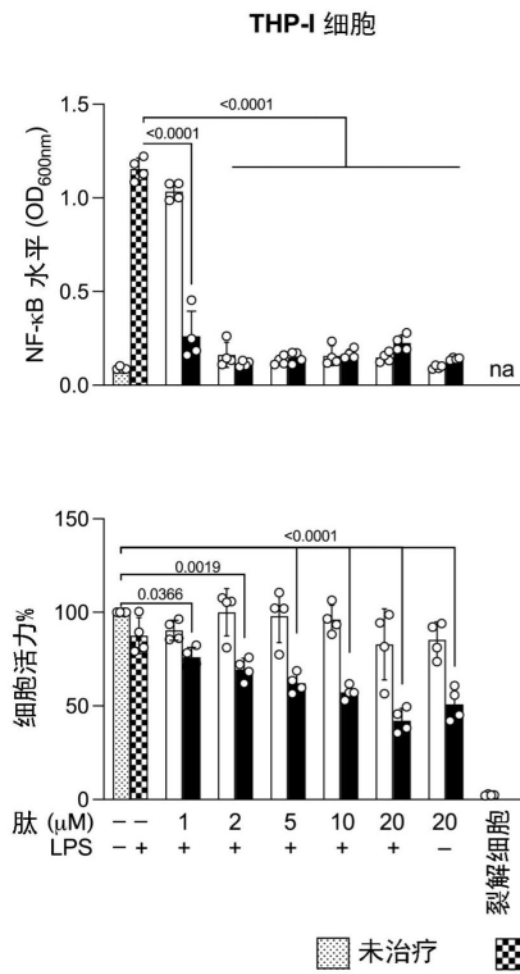


图1

A)



B)

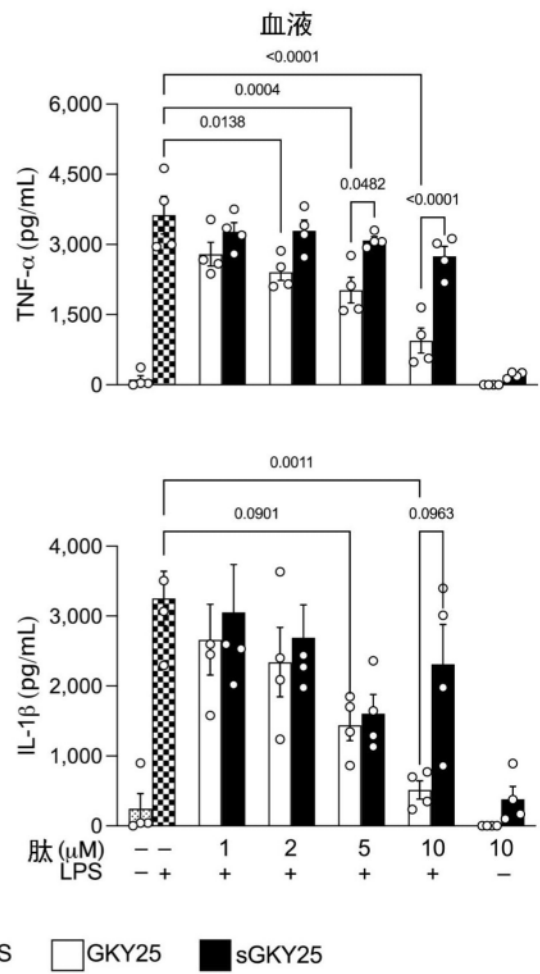


图2

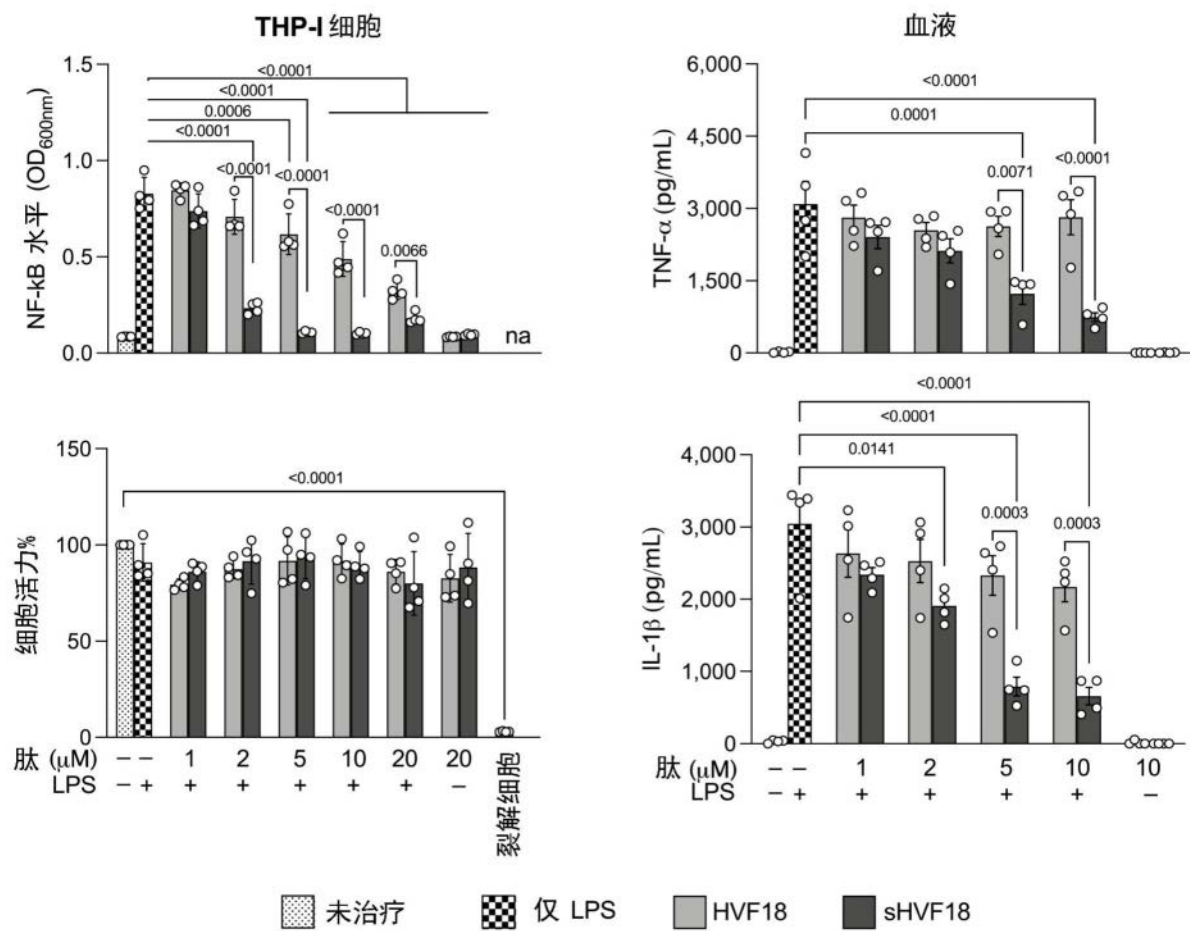
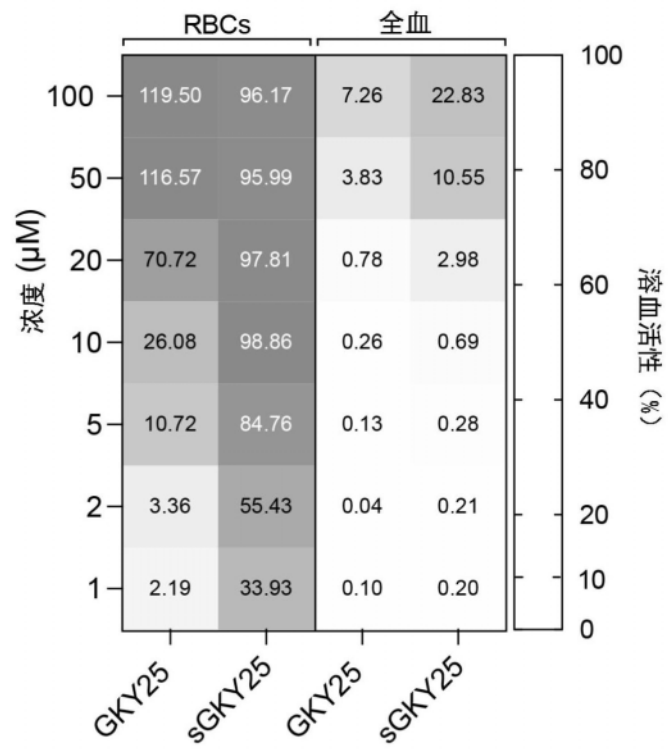


图3

A)



B)

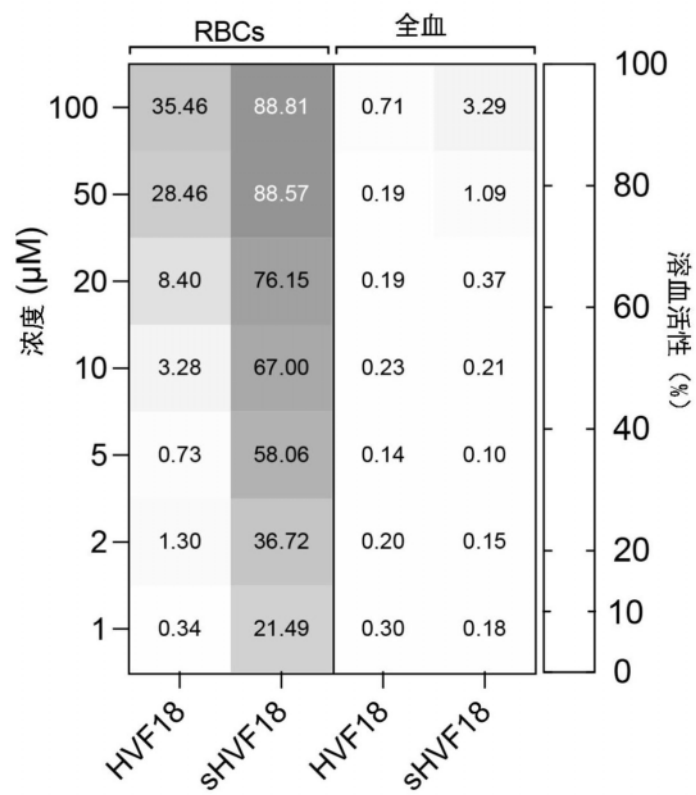


图4

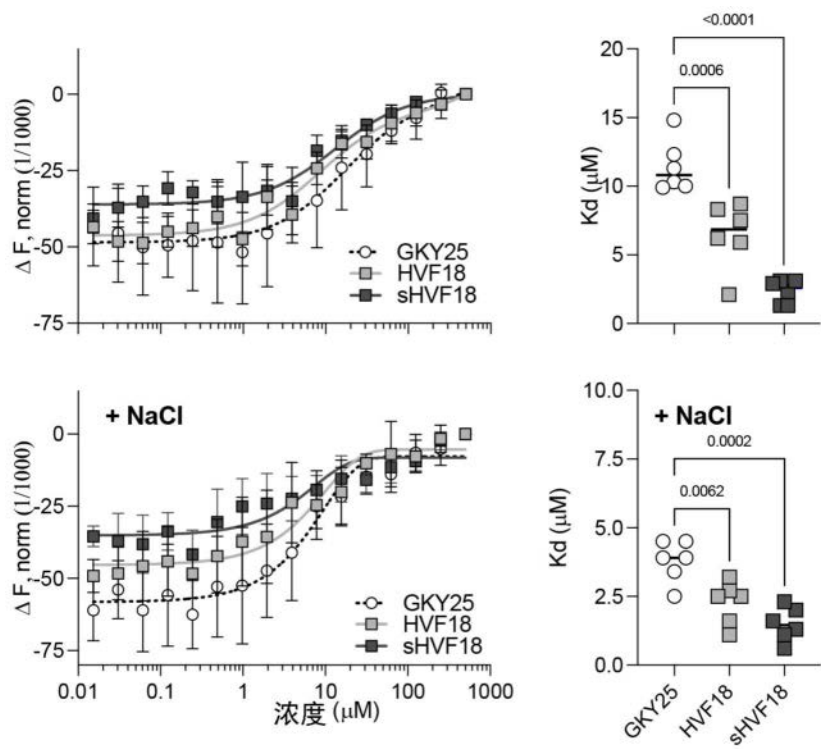


图5

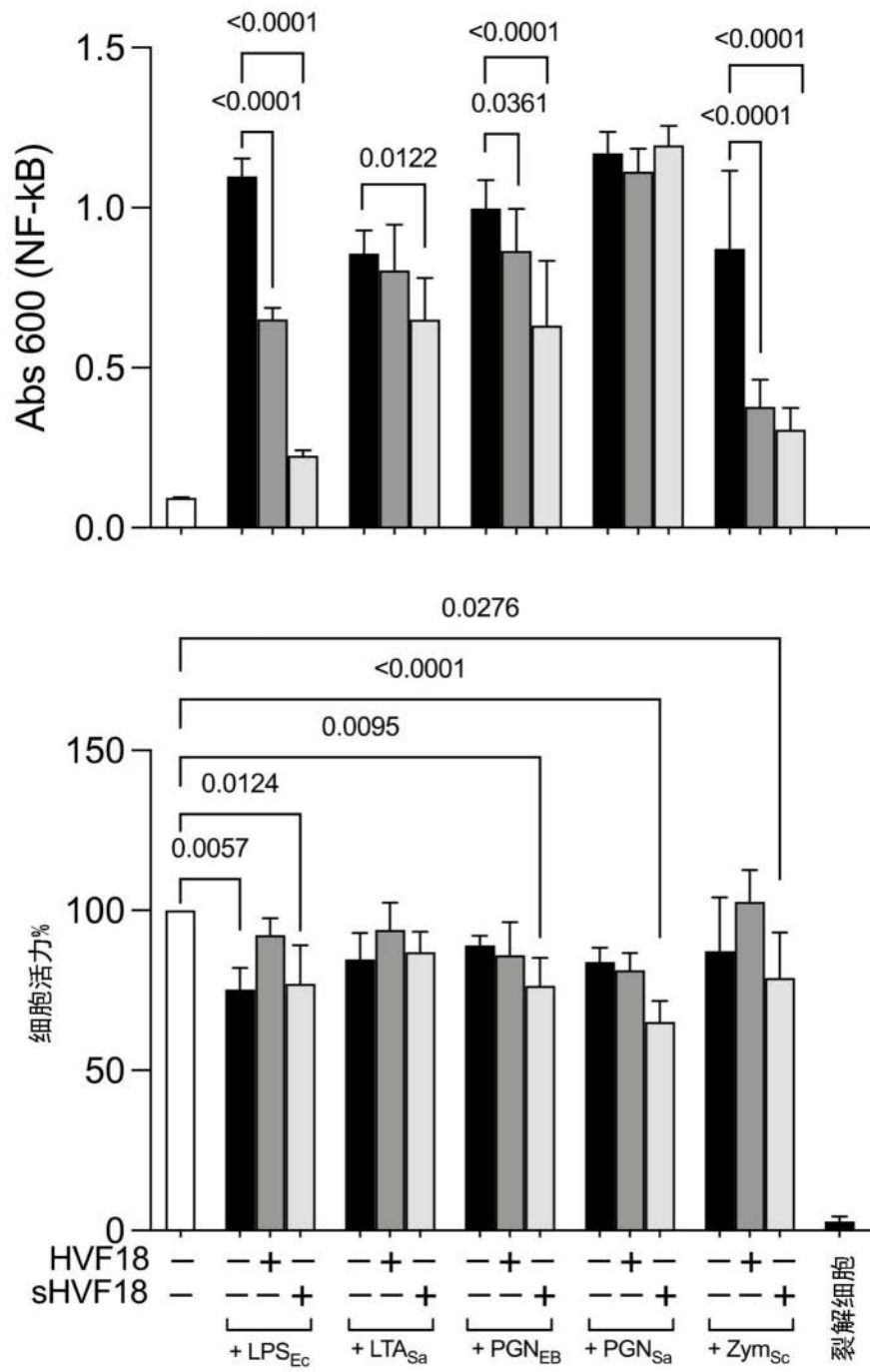
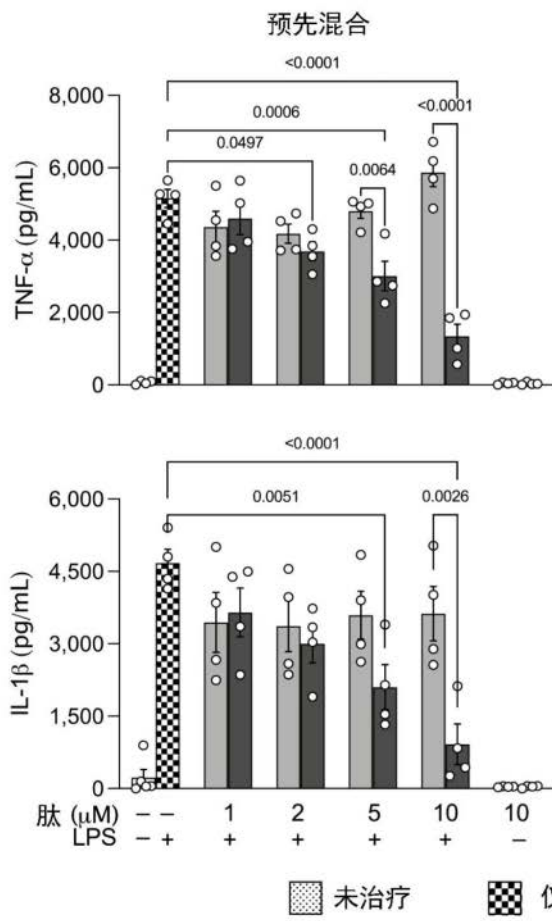


图6

A)



B)

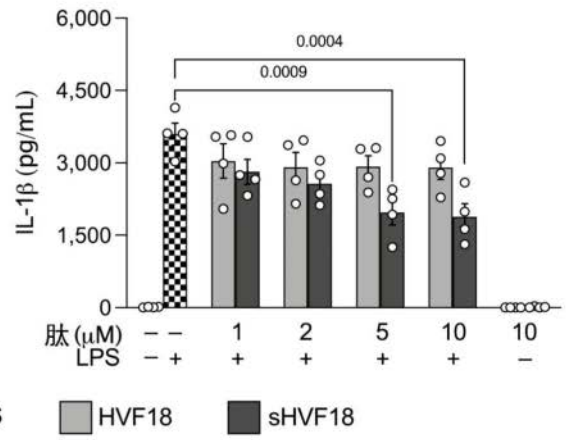
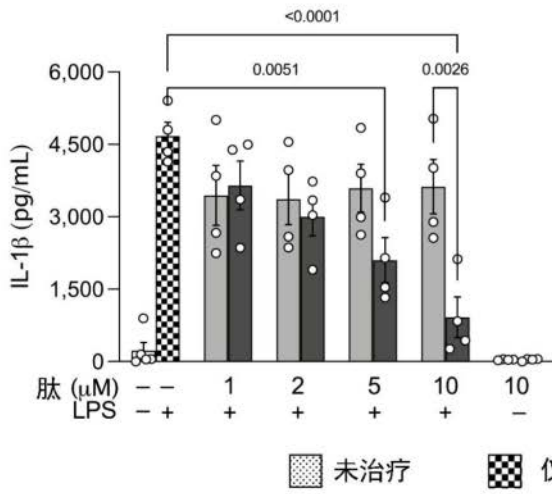
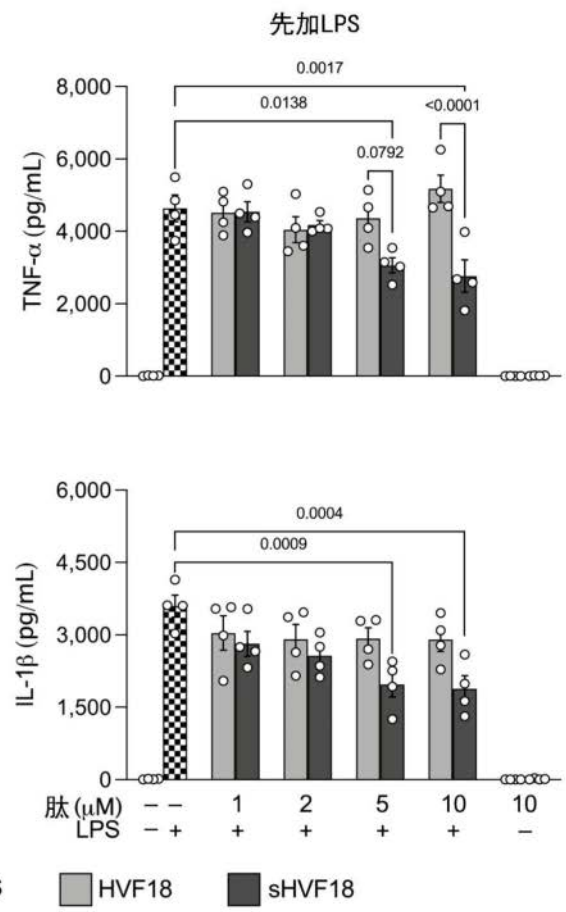


图7

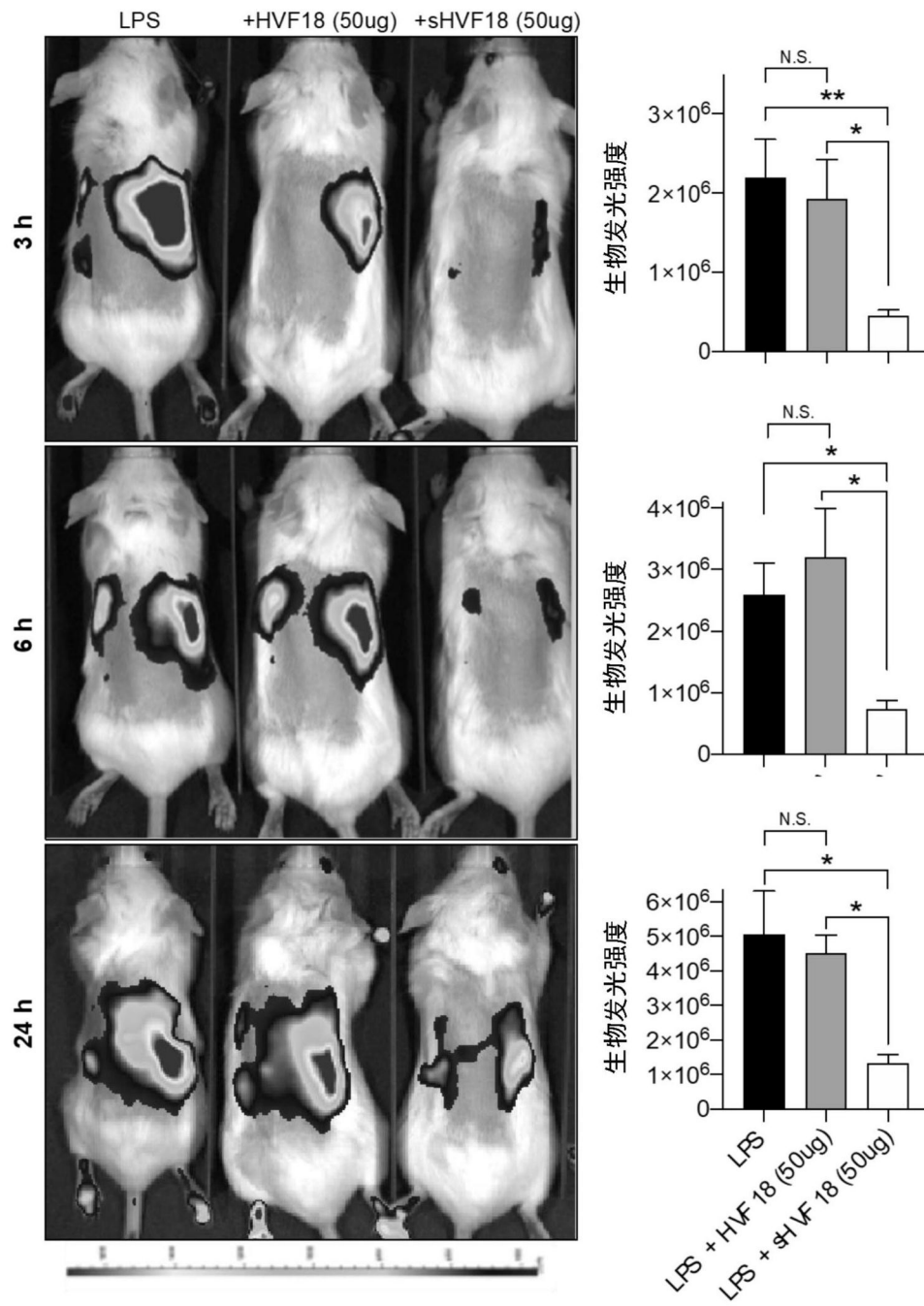


图8a

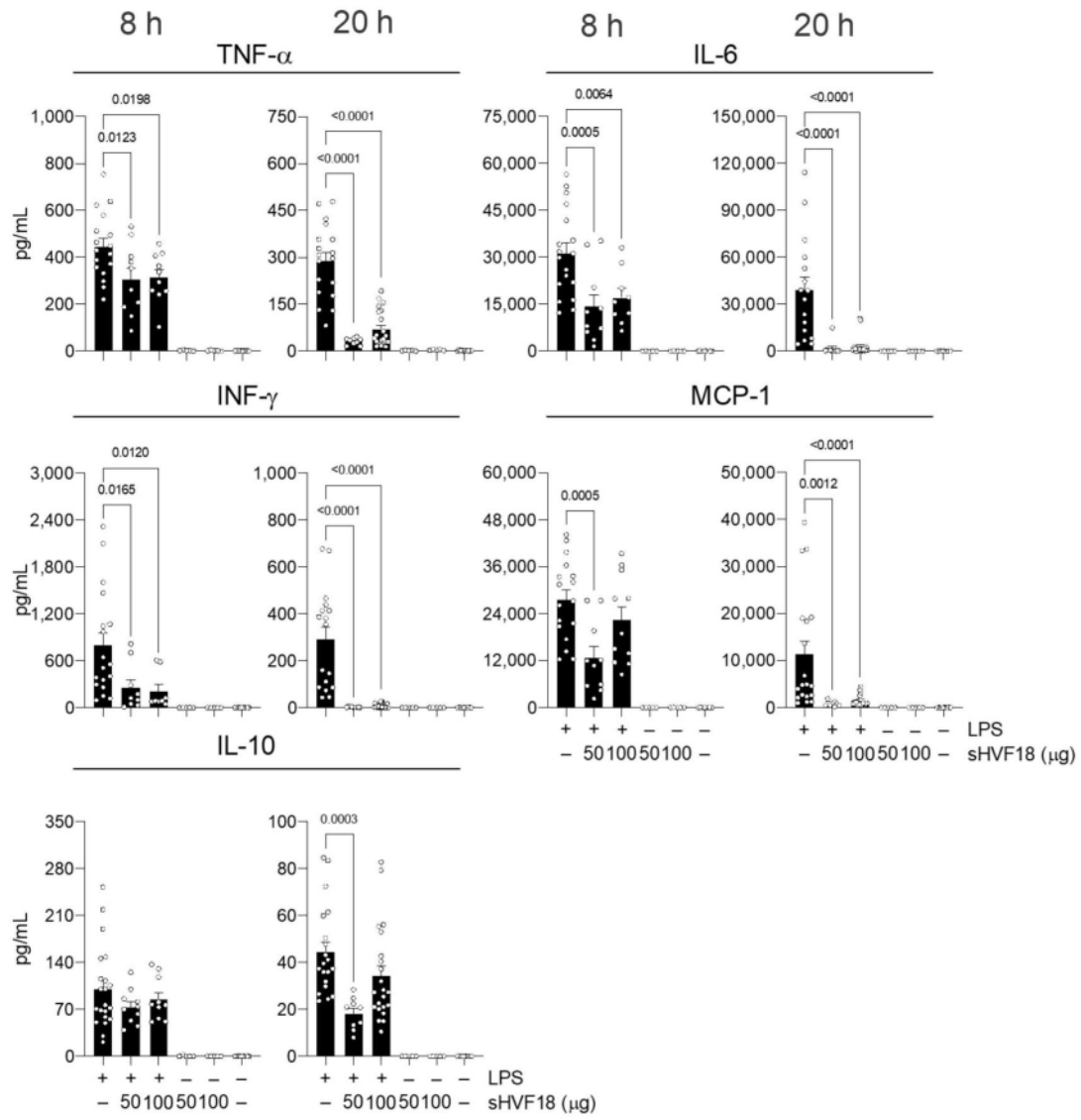
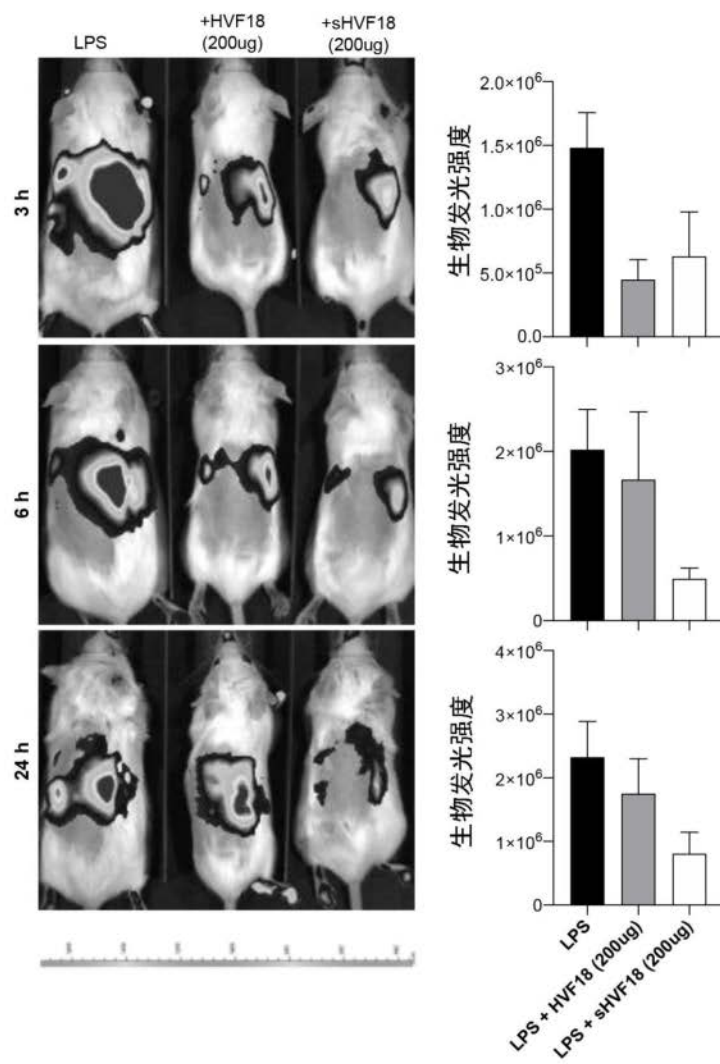


图8b

A)



B)

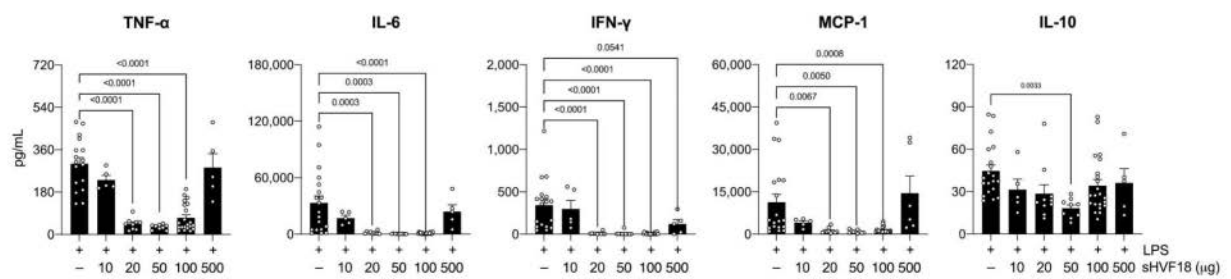
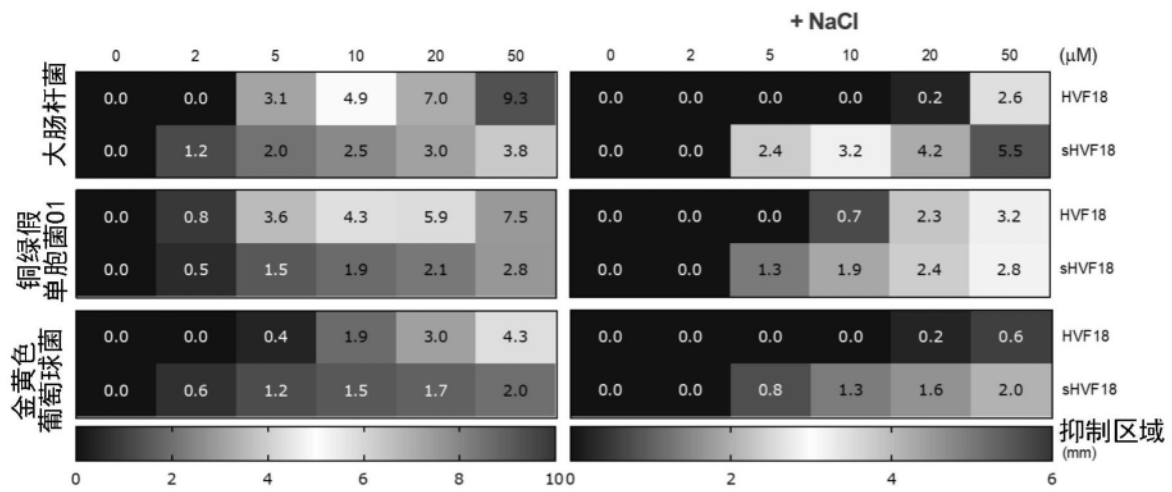


图9

A)



B)

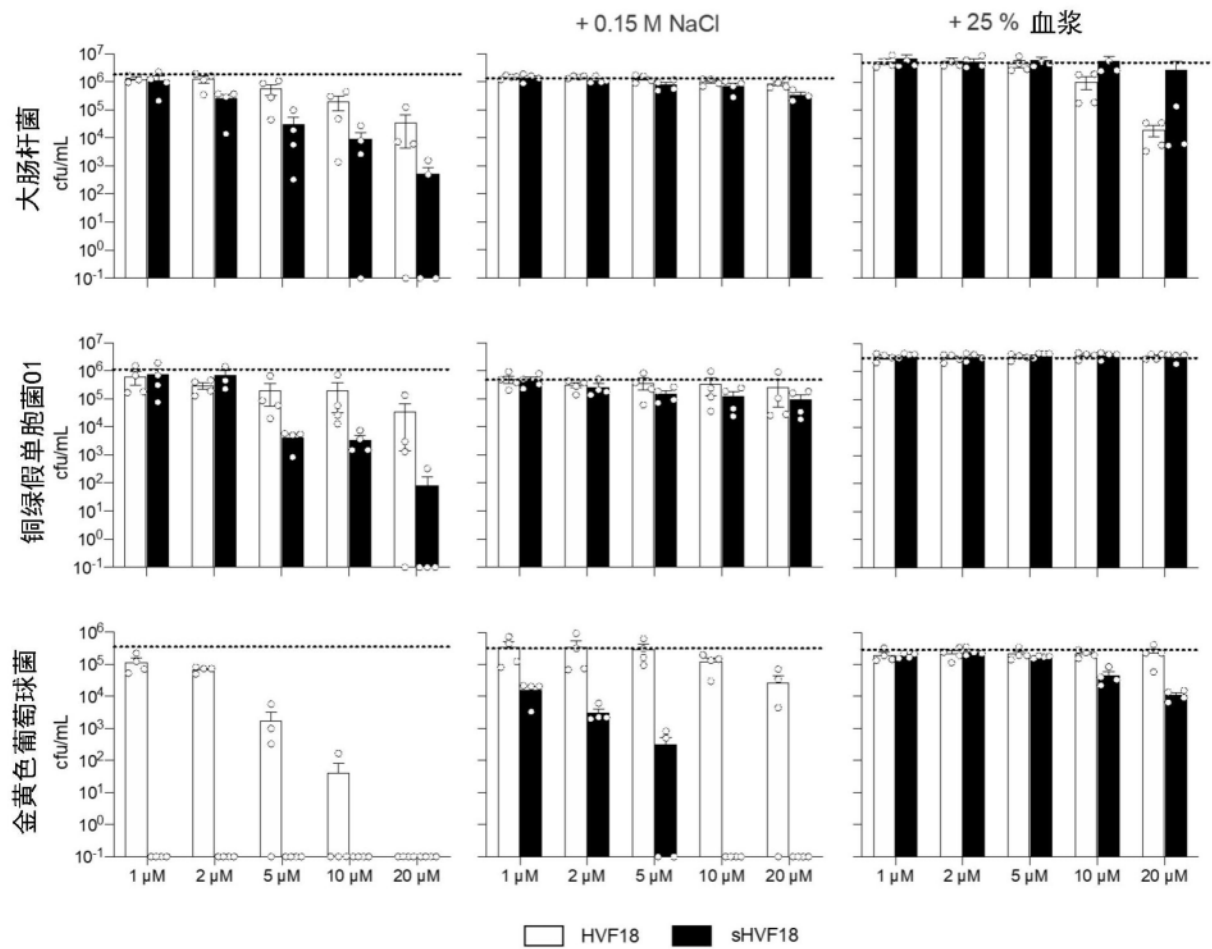
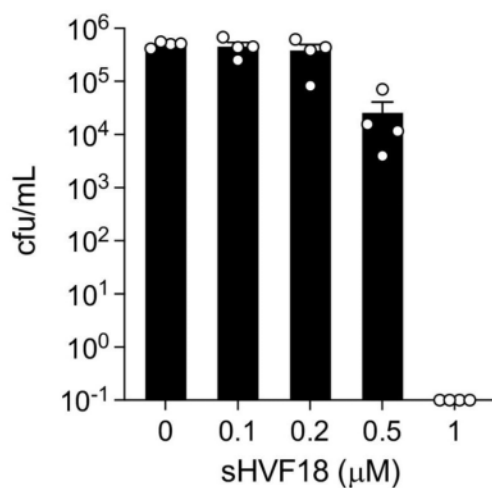


图10

C)



D)

肽	大肠杆菌		铜绿假单胞菌01		金黄色葡萄球菌	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
HVF18	40	40	40	80	80	≥ 160
sHVF18	80	160	40	80	10	80

E)

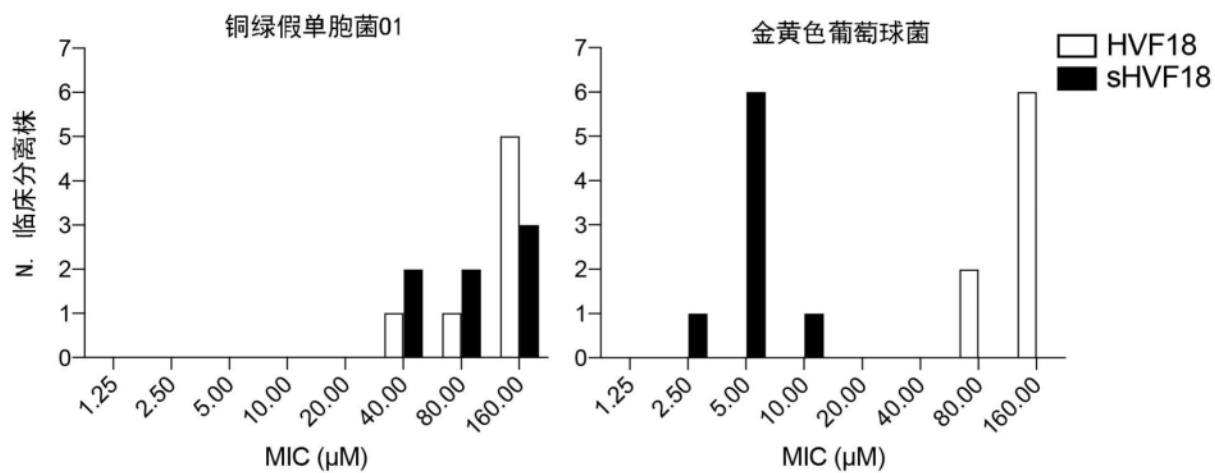


图10续

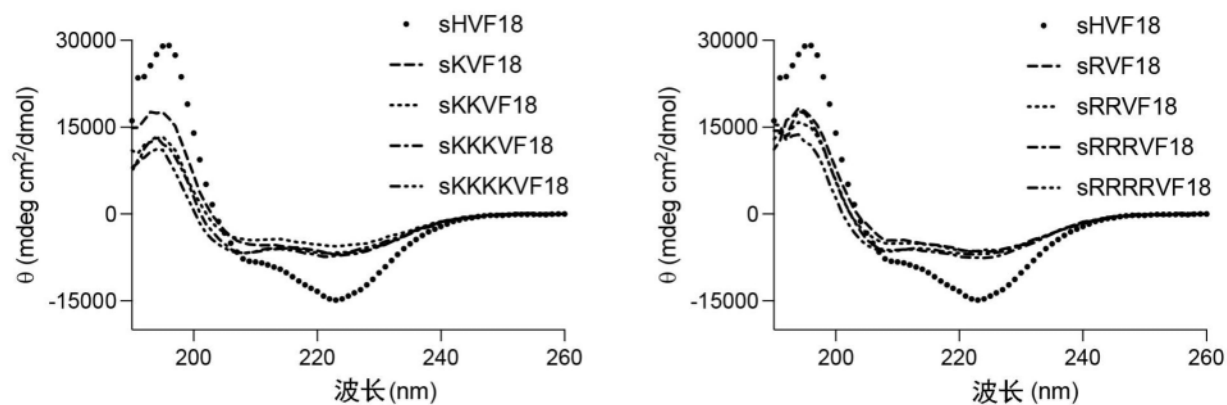


图11

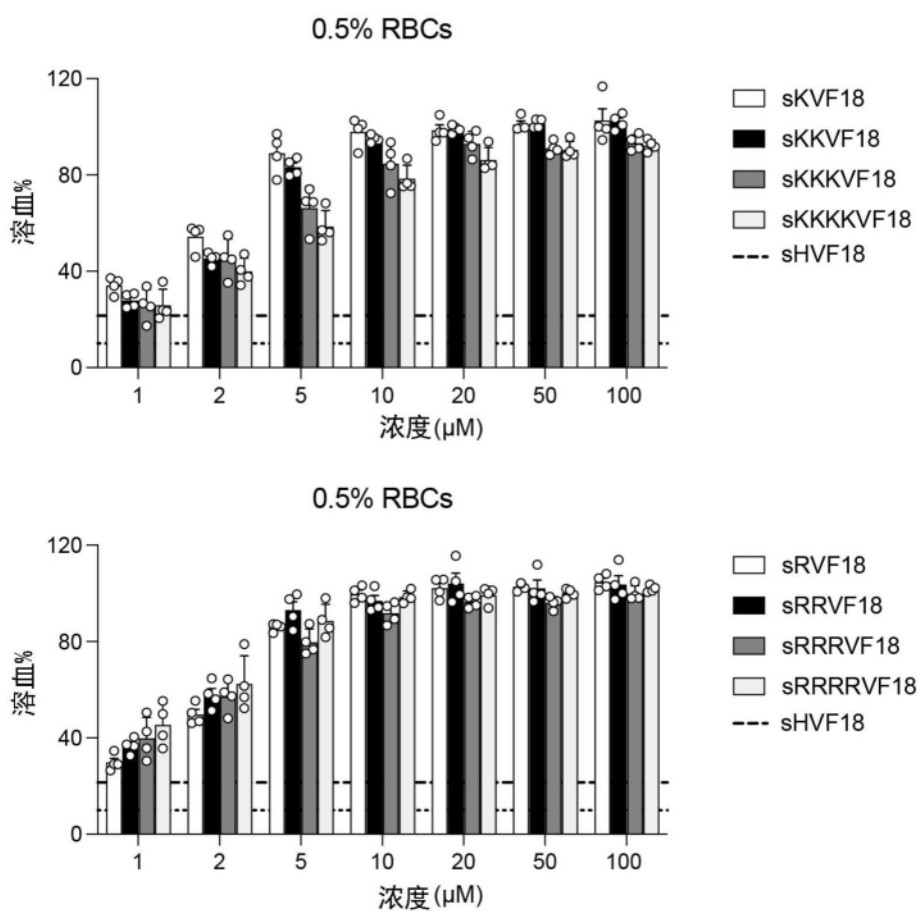


图12a

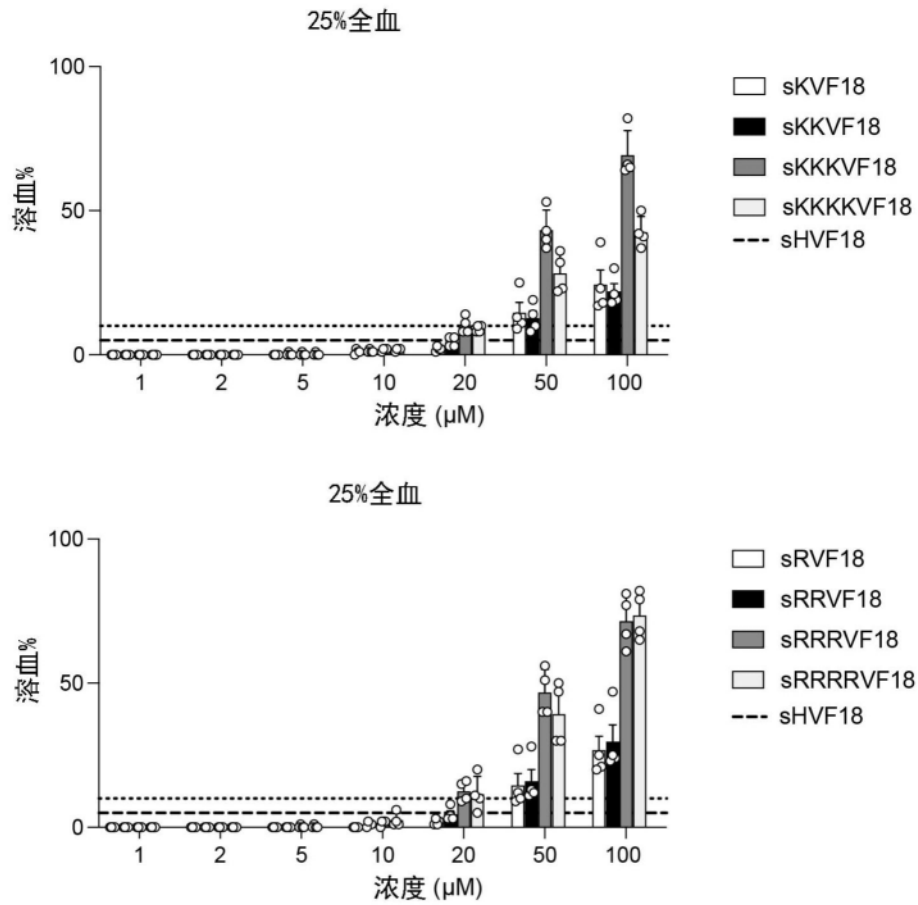


图12b

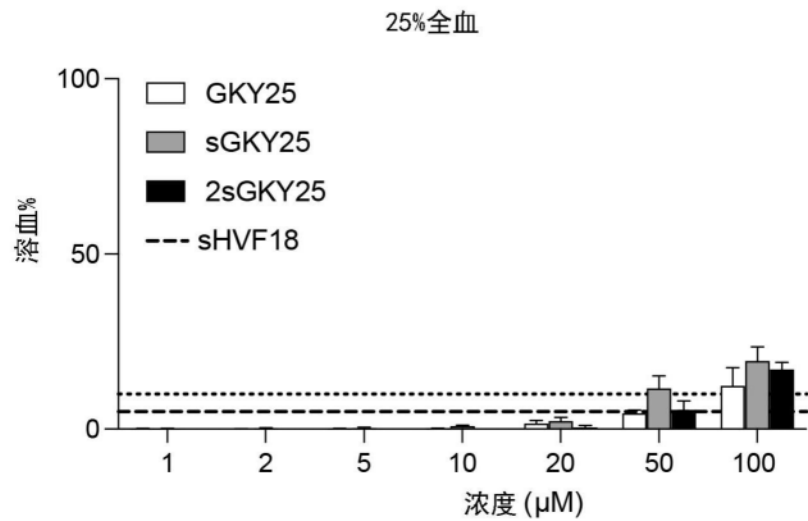


图12c

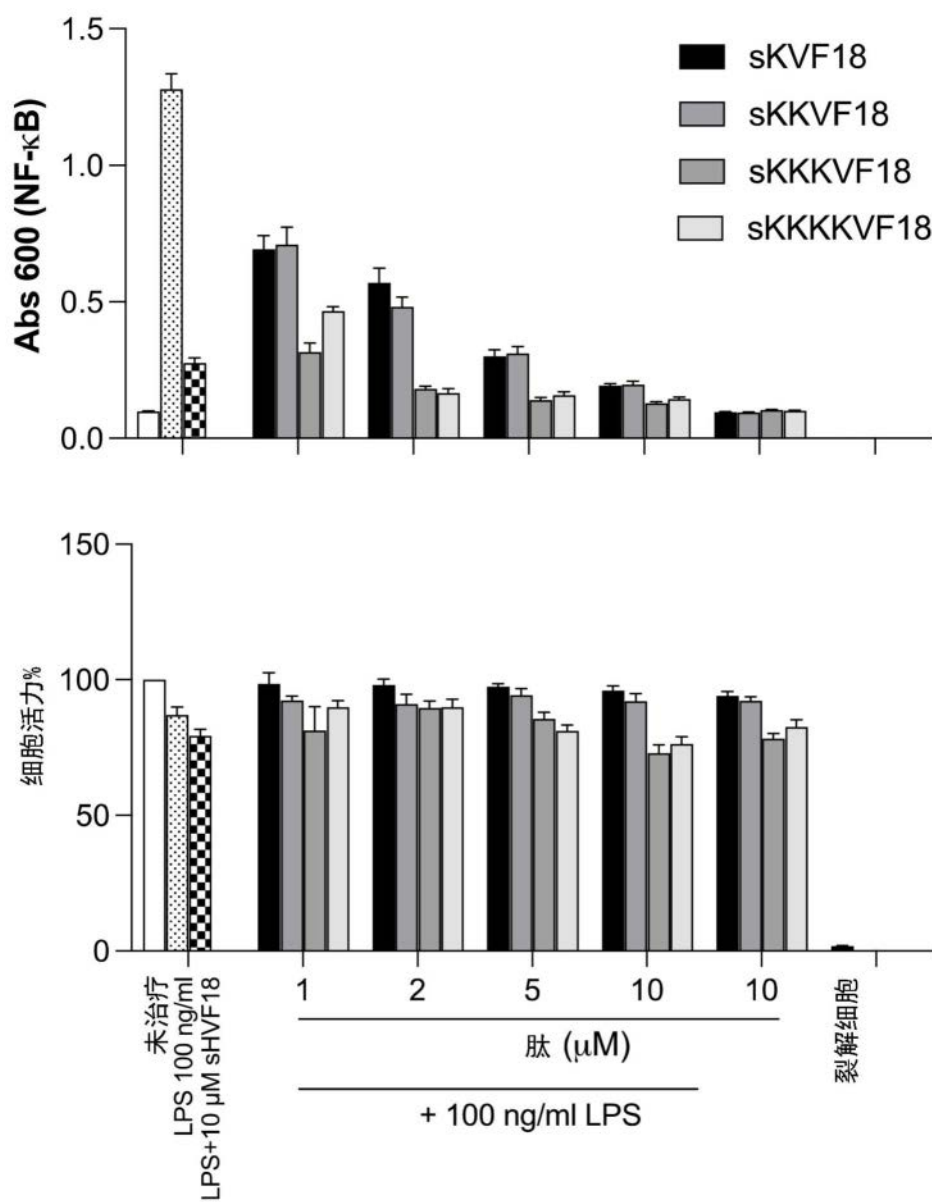


图13A

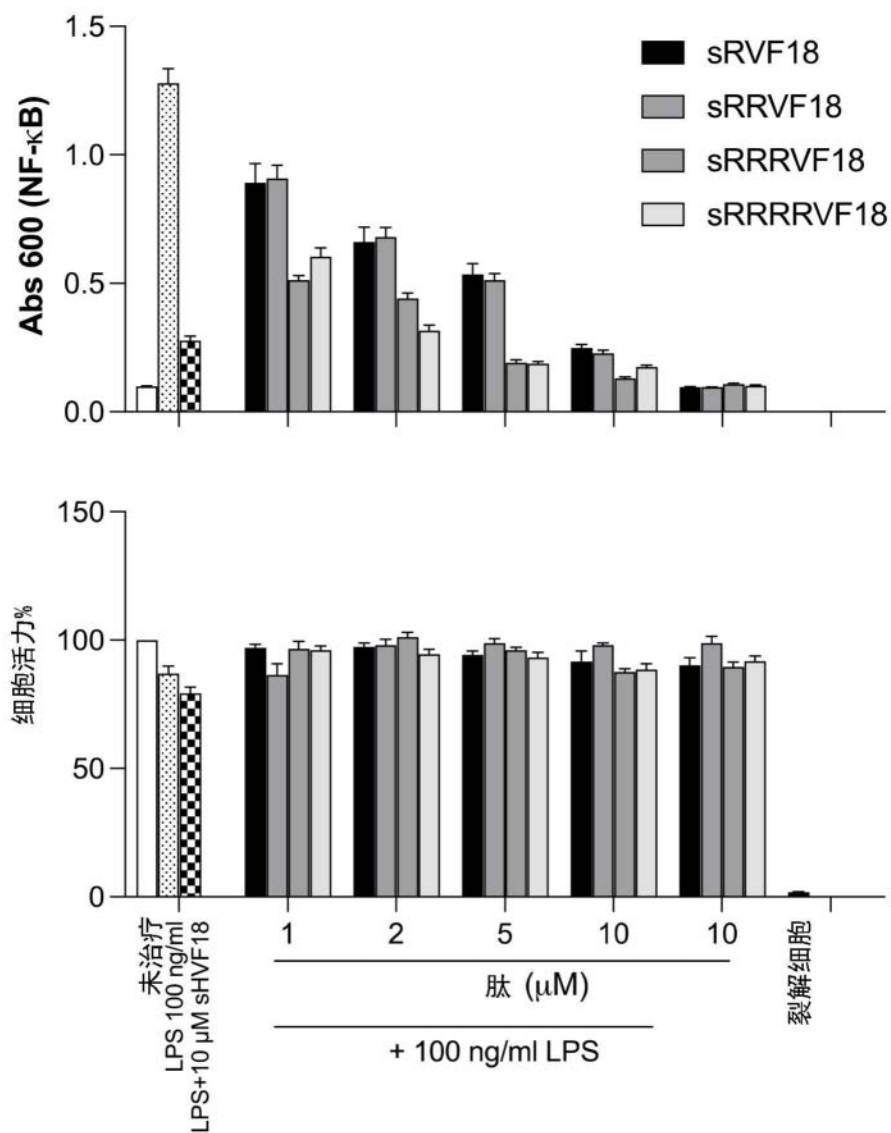


图13B

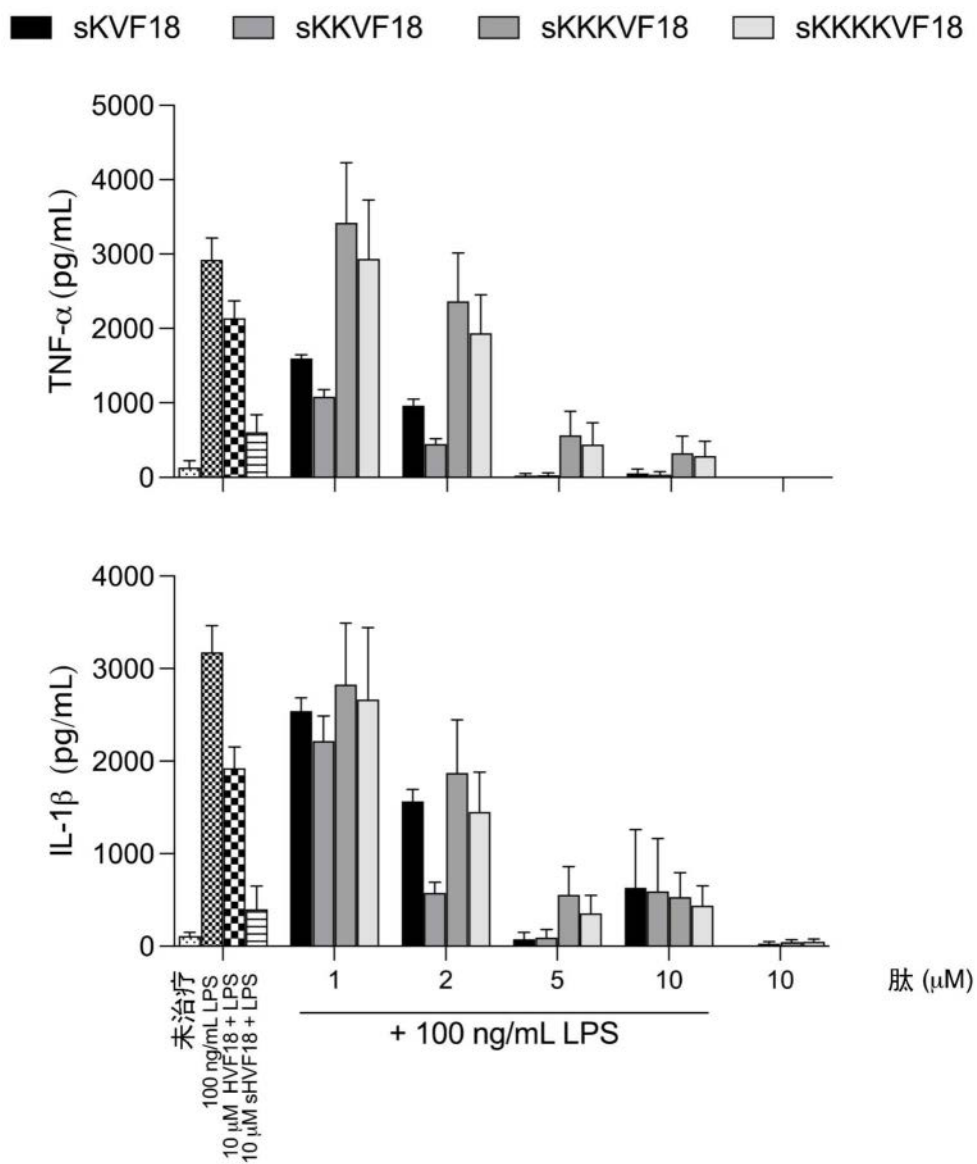


图14A

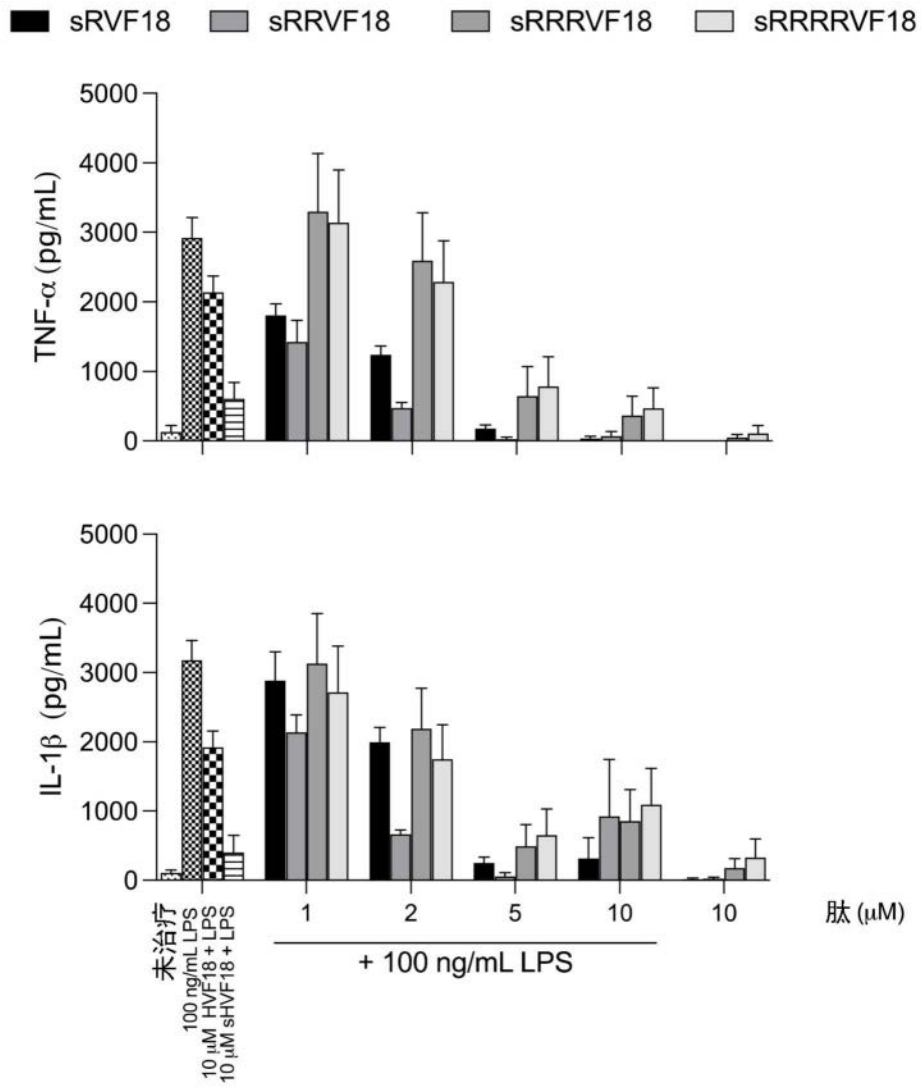


图14B

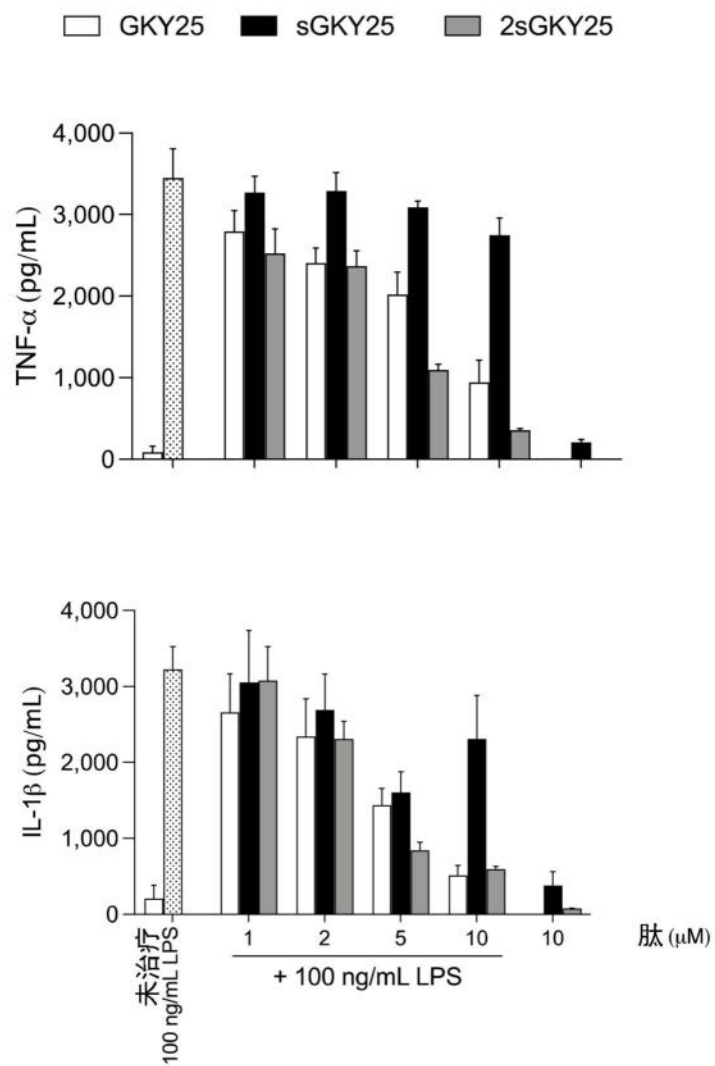


图14C

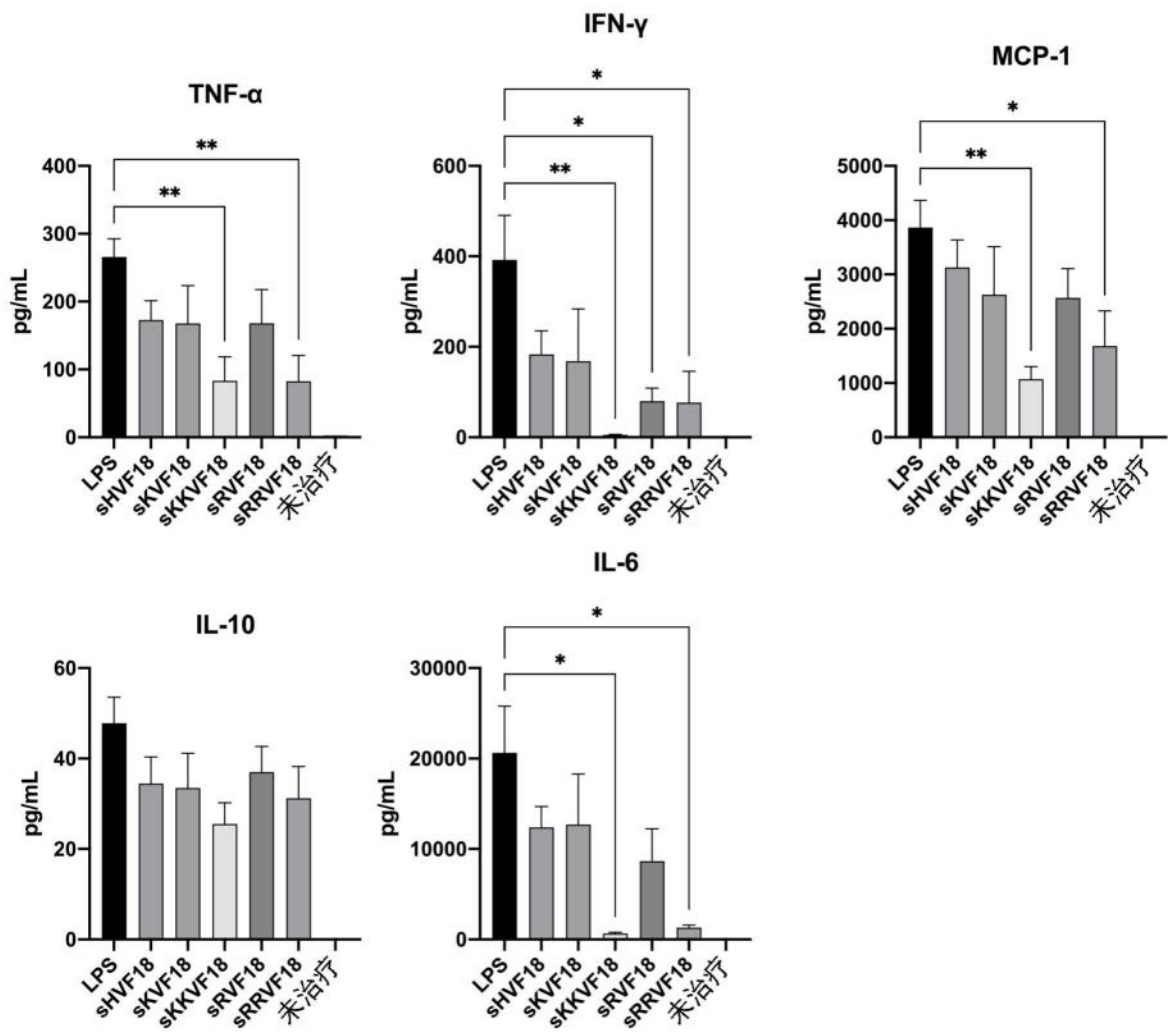


图15

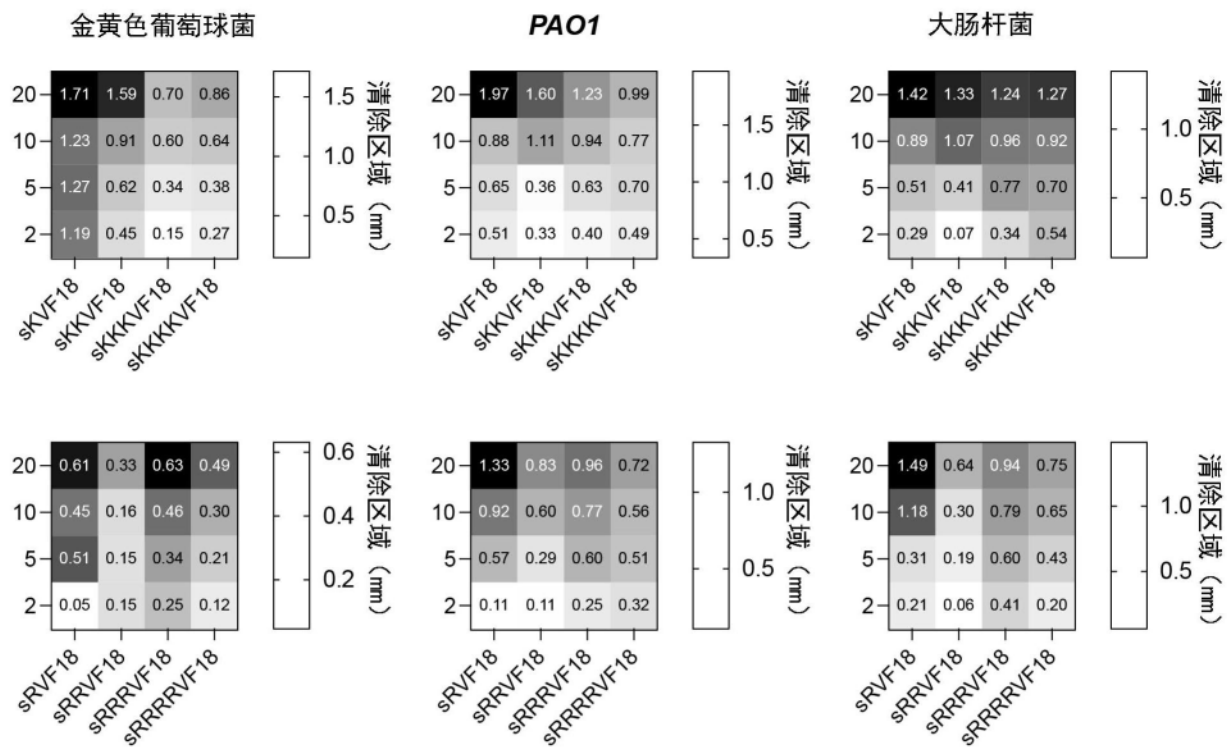


图16A

+ 150 mM NaCl

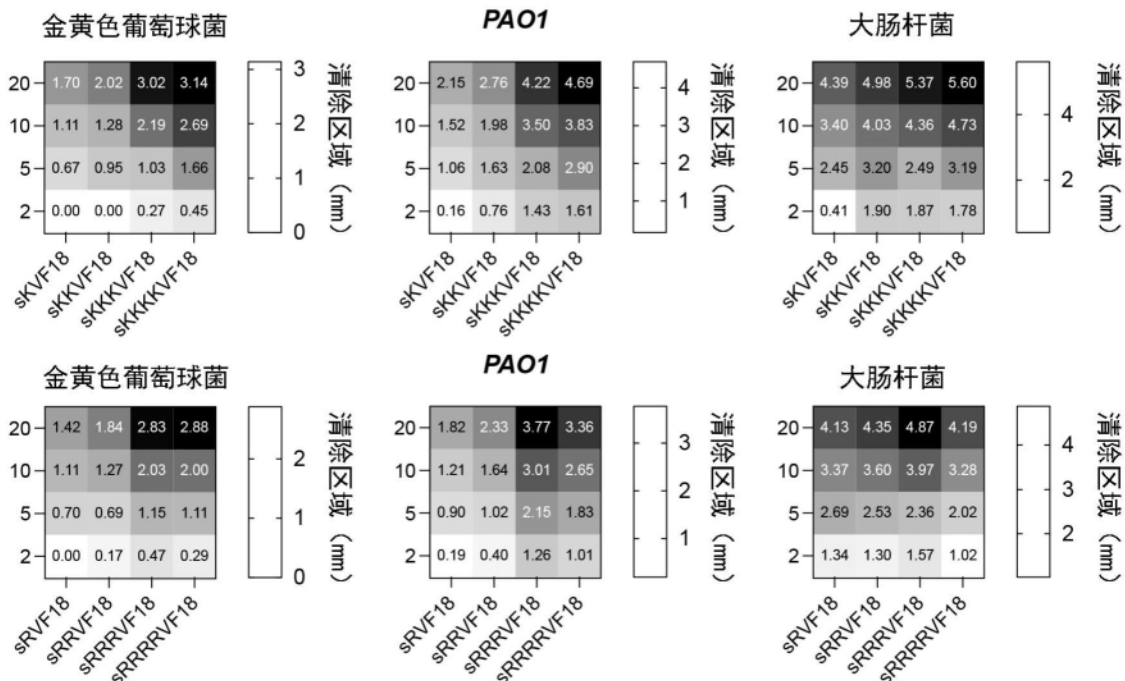


图16B

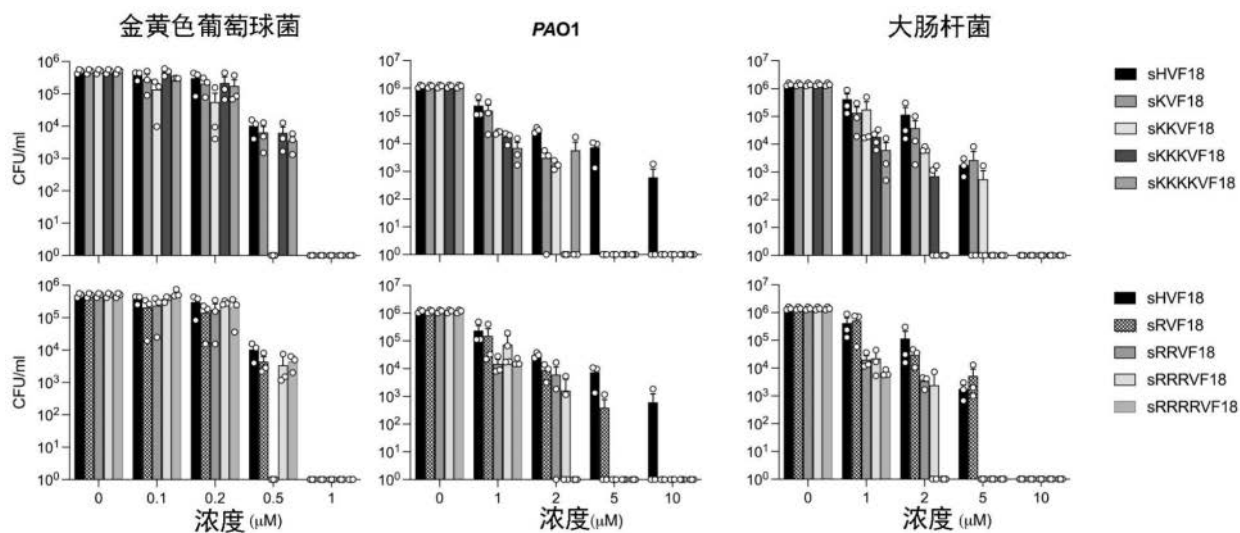


图17A

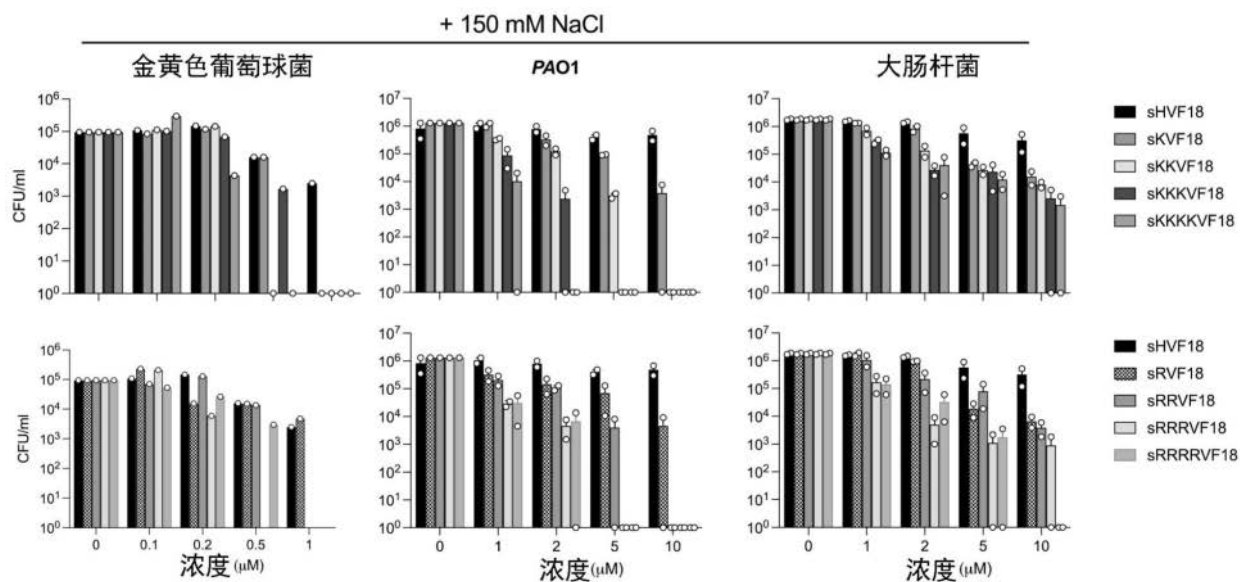


图17B

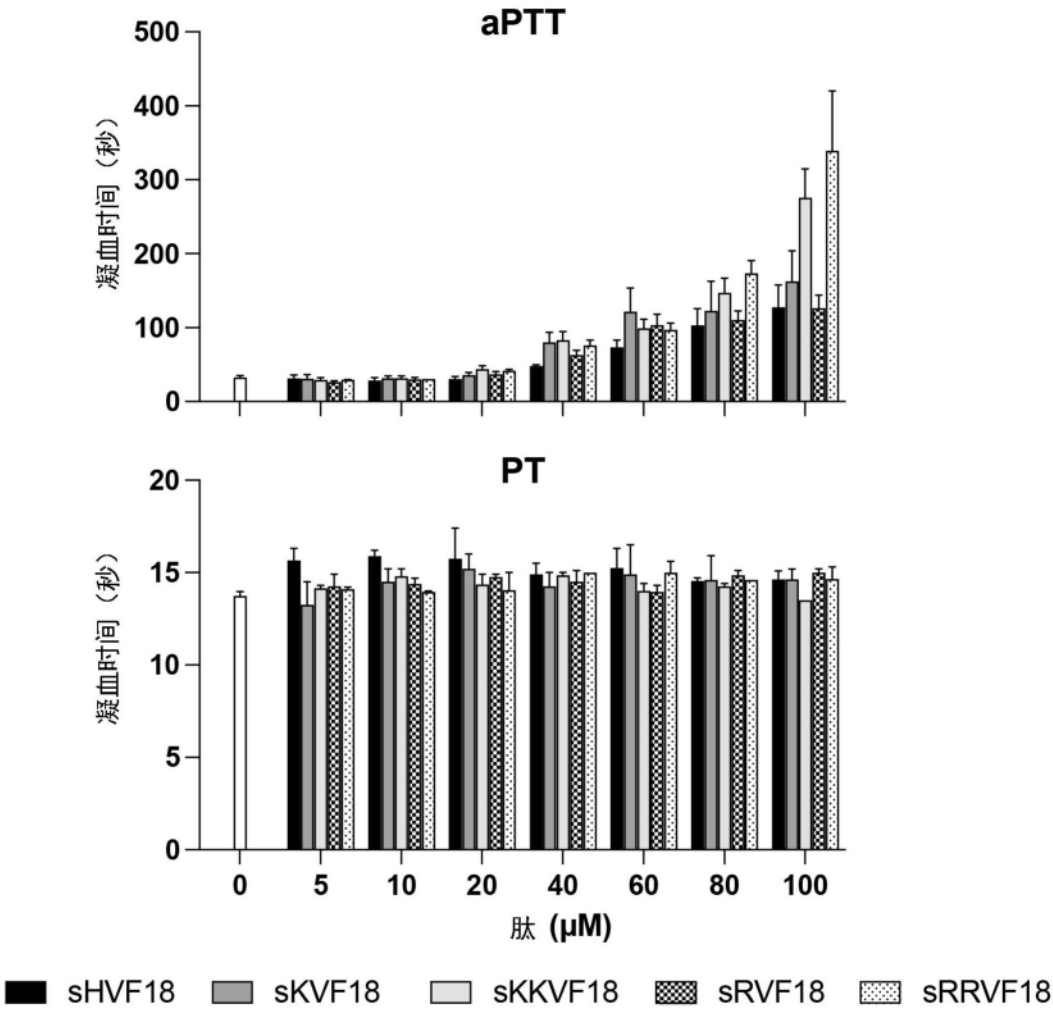


图18

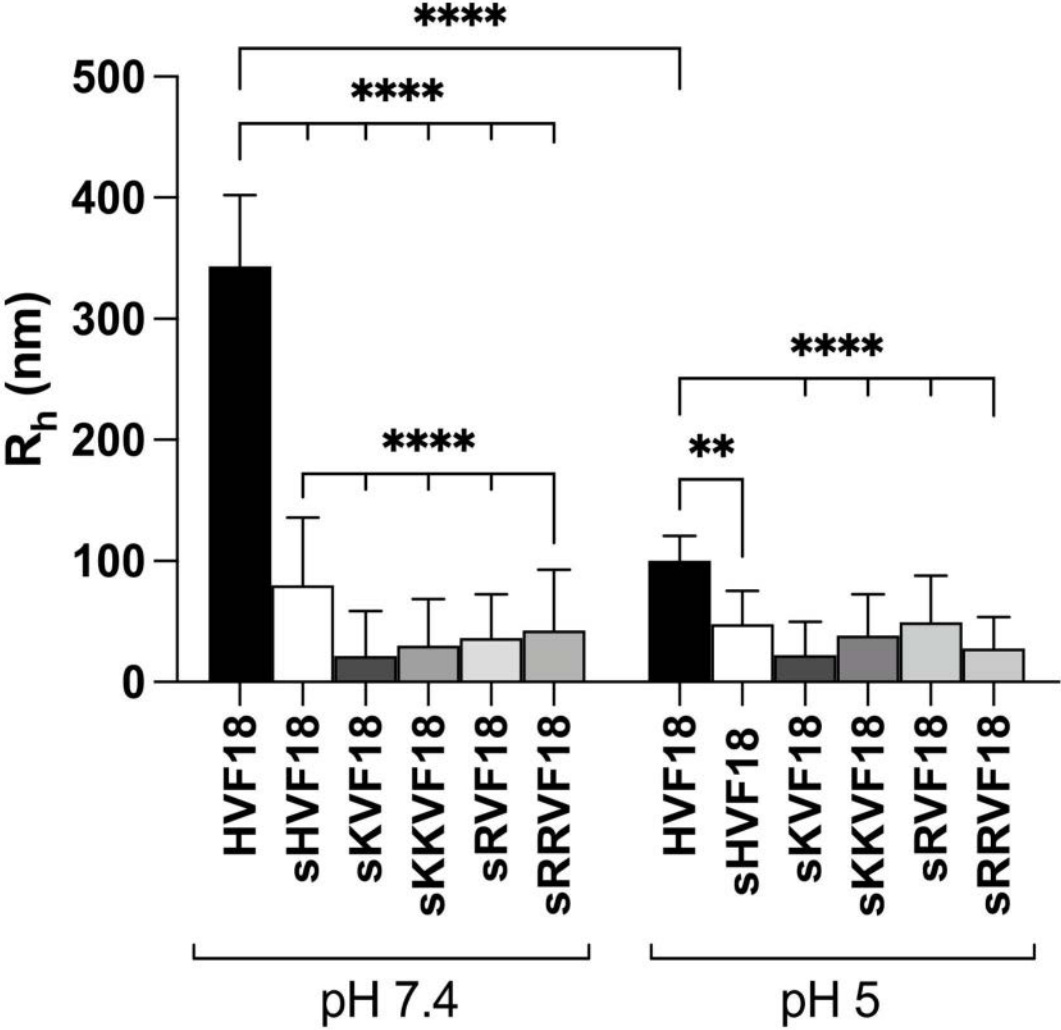


图19

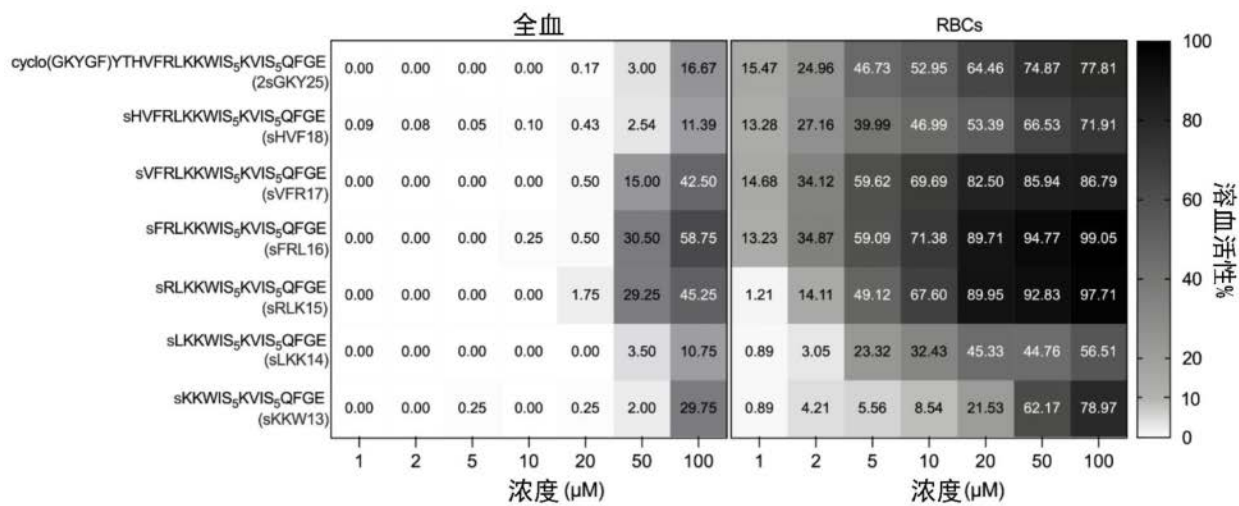


图20A

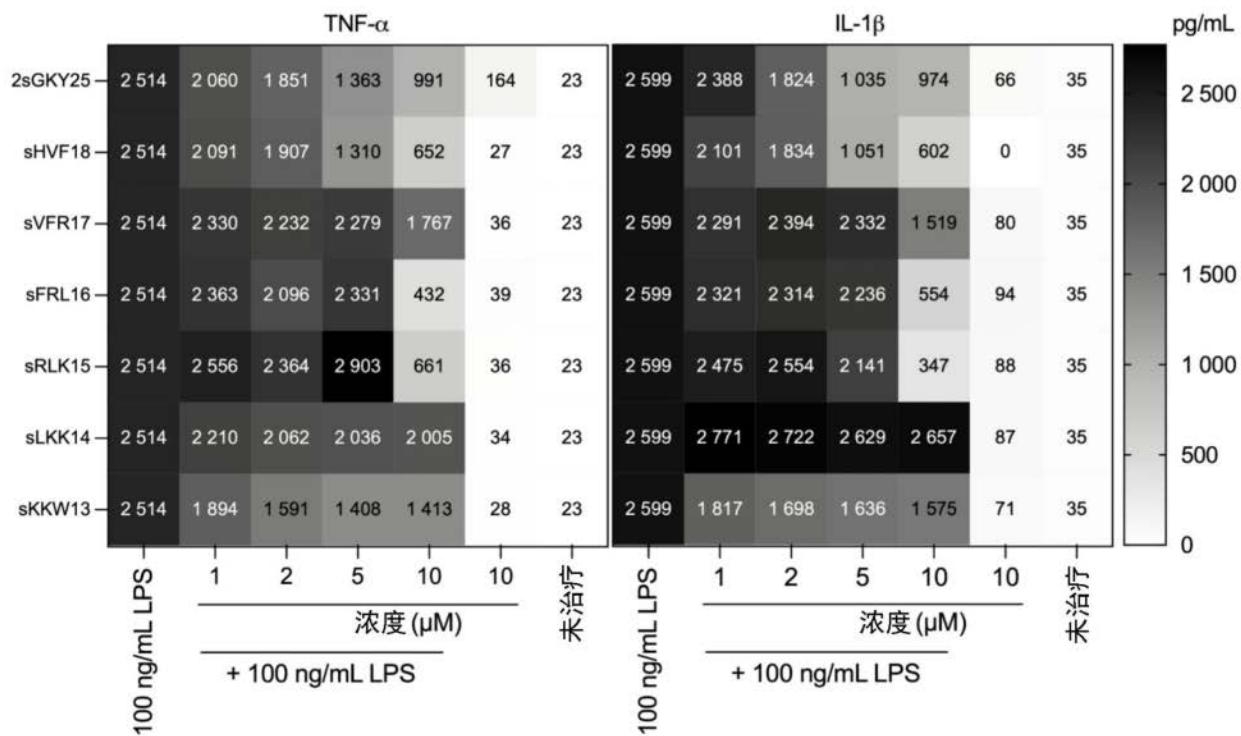


图20B

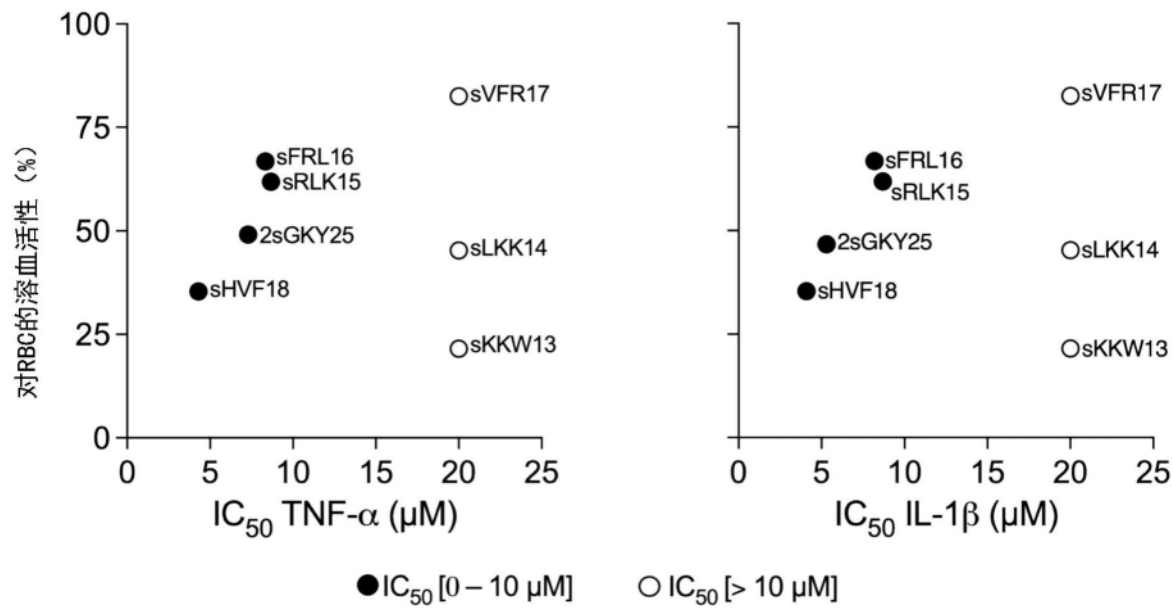


图20C

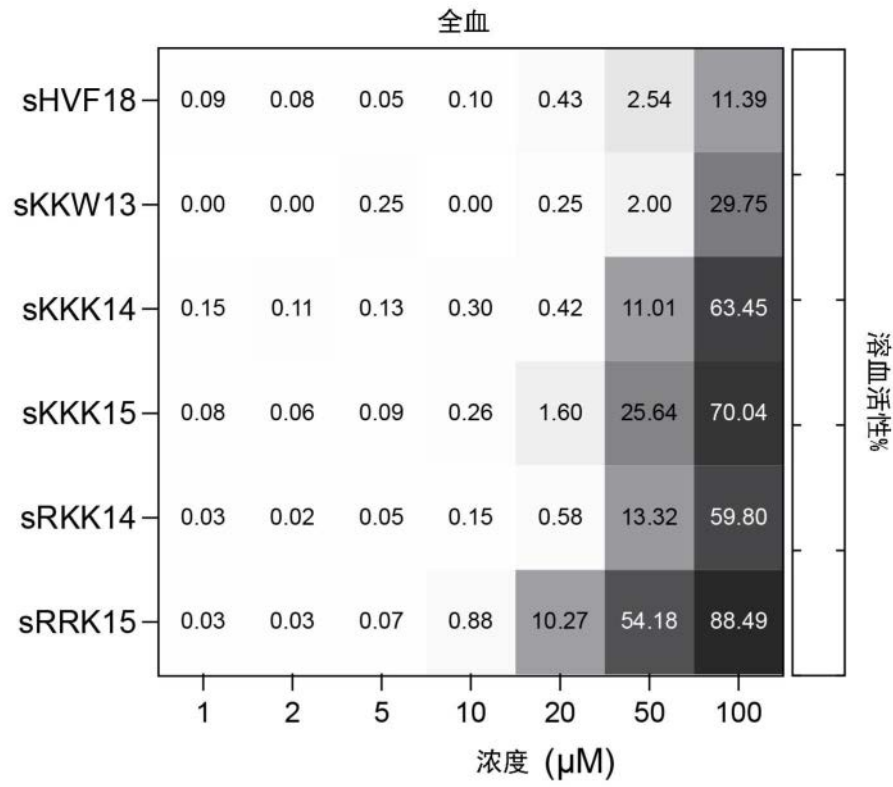


图21A

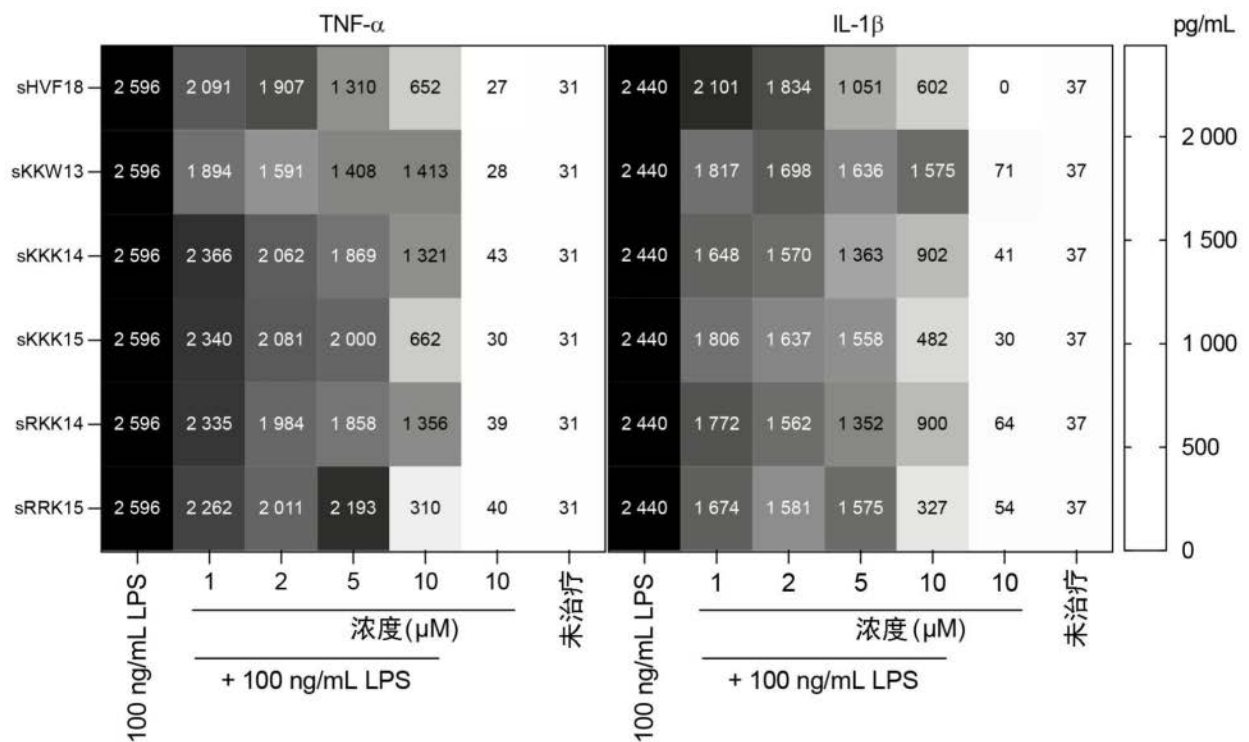


图21B

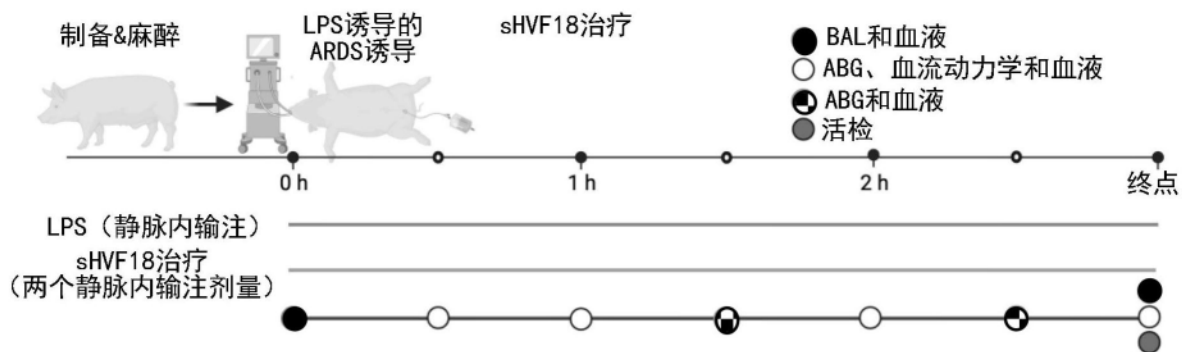


图22A

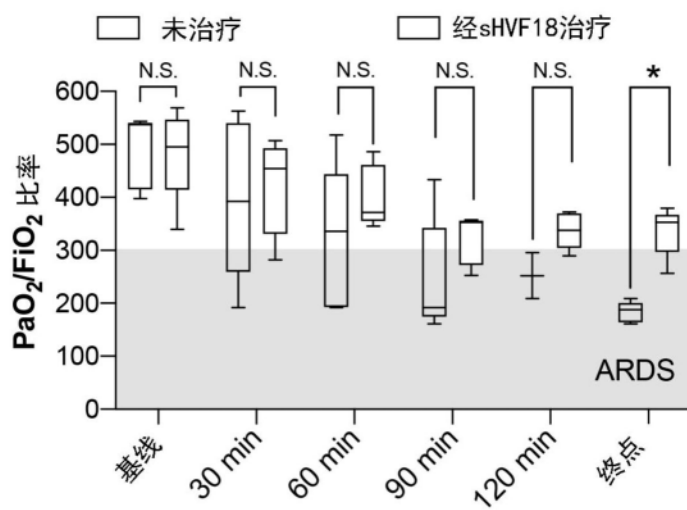


图22B

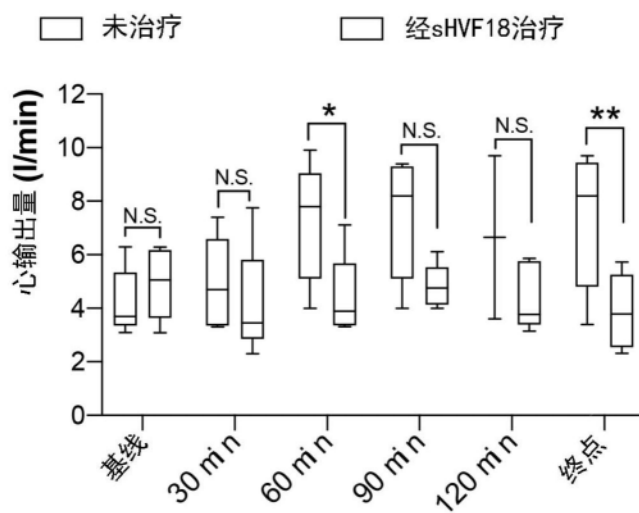


图22C

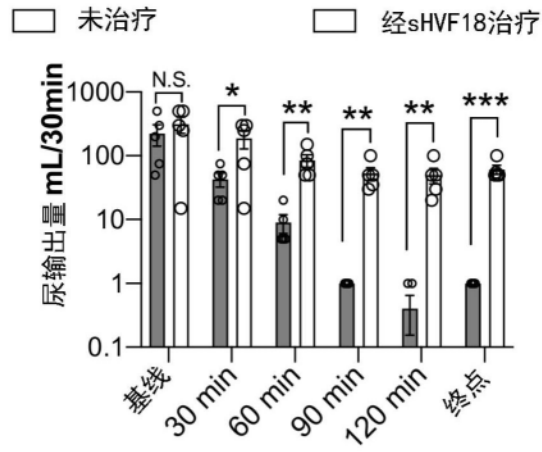


图22D

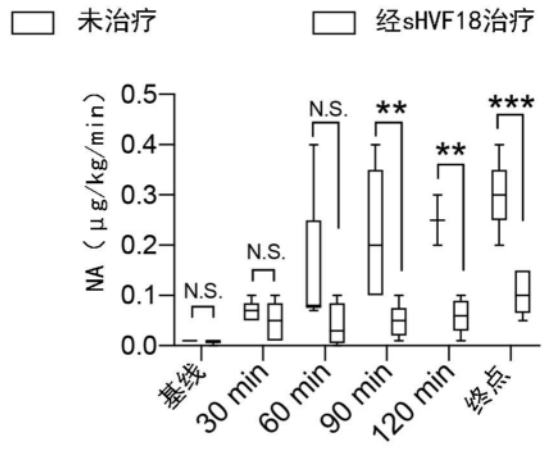


图22E

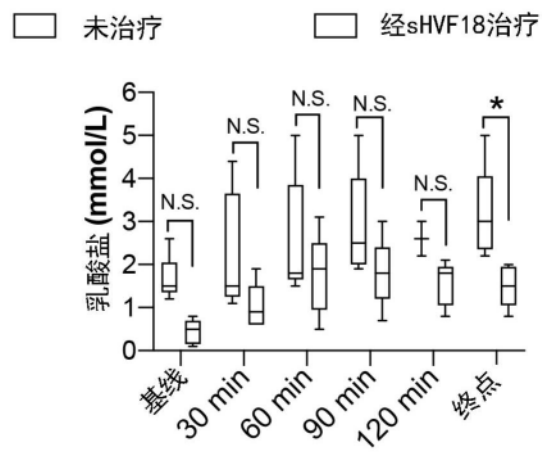


图22F

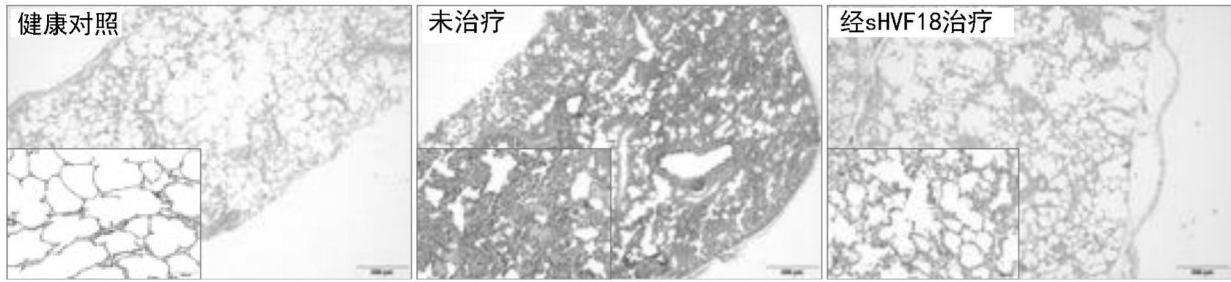


图22G

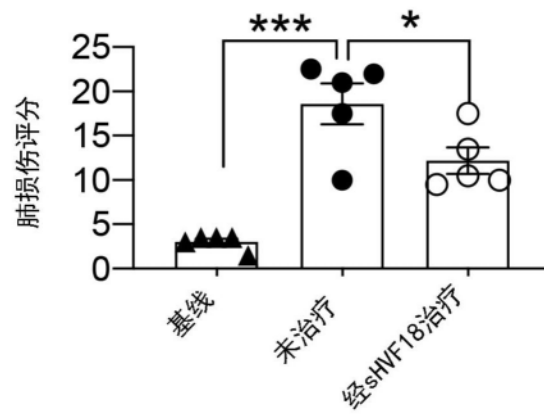


图22H

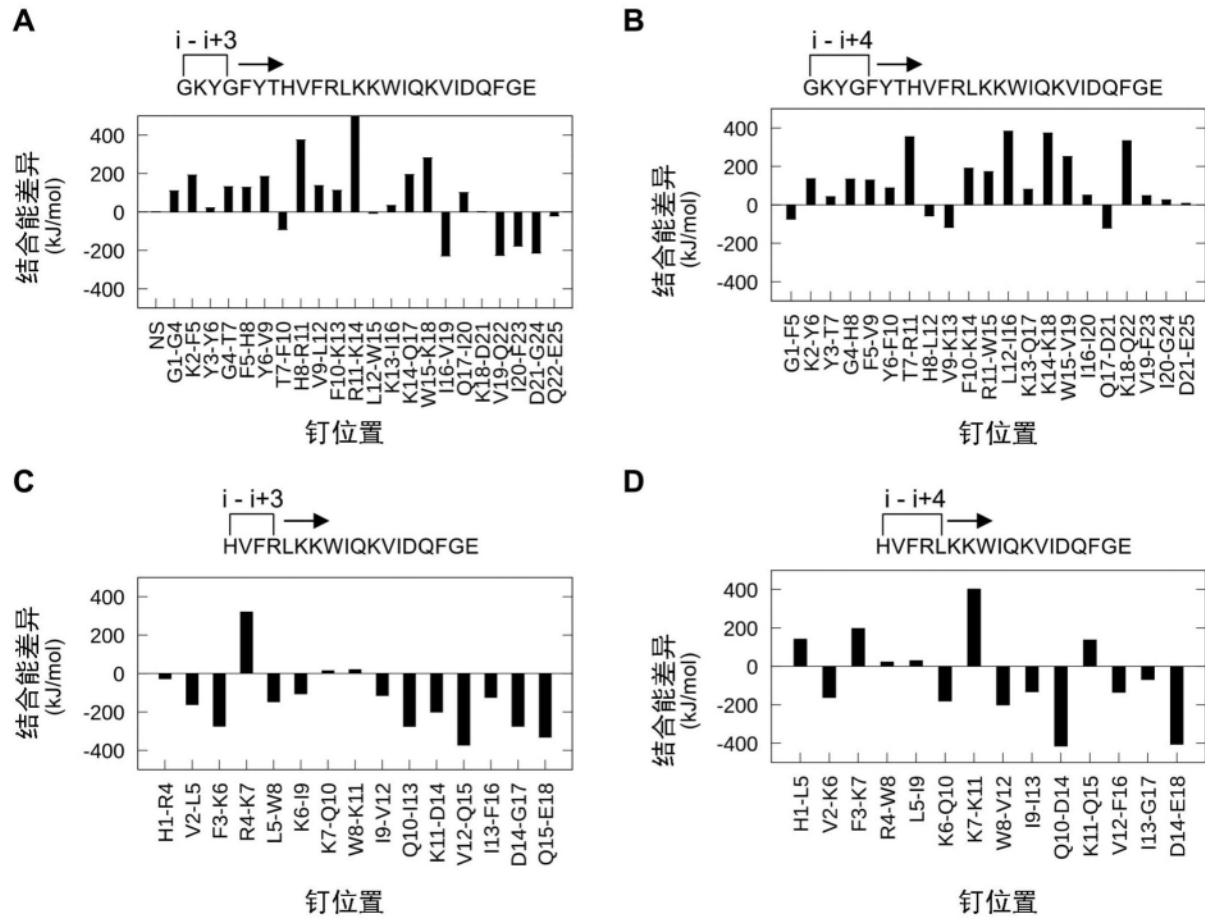


图23