



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104768970 B

(45)授权公告日 2019.11.15

(21)申请号 201380057907.5

豪夫迈·罗氏有限公司

(22)申请日 2013.11.06

(72)发明人 尼古拉斯·威勒米尔

(65)同一申请的已公布的文献号

塞布丽娜·派格诺

申请公布号 CN 104768970 A

奥利弗·哈特莱 休伯特·格特内

(43)申请公布日 2015.07.08

普利斯希拉·凯梅洛特谢拉

(30)优先权数据

保罗·卡特勒 菲利普·费伯

12191474.1 2012.11.06 EP

(74)专利代理机构 北京聿宏知识产权代理有限公司 11372

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

代理人 吴大建 刘华联

2015.05.05

(51)Int.Cl.

(86)PCT国际申请的申请数据

C07K 14/775(2006.01)

PCT/IB2013/059948 2013.11.06

(87)PCT国际申请的公布数据

(56)对比文件

W02014/072916 EN 2014.05.15

W0 2008156873 A2, 2008.12.24,

W0 2012149563 A1, 2012.11.01,

(73)专利权人 日内瓦大学

审查员 李萌

地址 瑞士日内瓦

权利要求书2页 说明书41页

专利权人 日内瓦大学附属医院

序列表26页 附图13页

(54)发明名称

模拟肽

(57)摘要

本发明涉及载脂蛋白A-I的表位的模拟肽、包括该模拟肽的诊断免疫测验以及用于诊断的方法和用于预防和/或治疗心血管疾病的方法。

1. 载脂蛋白A-I (ApoA-I) 的表位的模拟肽在制备用于检测在哺乳动物主体的生物流体样本中的内源性抗-ApoA-I抗体的药剂中的应用,所述检测包括以下步骤:

(a) 提供来自哺乳动物主体的生物流体样本;

(b) 使所述生物流体样本与固体基质接触,其中载脂蛋白A-I (ApoA-I) 的表位的至少一种模拟肽被偶联至所述固体基质;其中,所述模拟肽由SEQ ID NO:15,或SEQ ID NO:16,或SEQ ID NO:17,或SEQ ID NO:19组成;其中,所述接触是在足以使得在所述生物流体样本中存在的抗-ApoA-I抗体通过抗原-抗体相互作用结合至所述至少一种模拟肽的条件下进行;其中,所述至少一个模拟肽的序列具有处于至少两个不相邻的氨基酸之间的内部交联;

(c) 从所述固体基质的表面去除任何未结合的抗体;

(d) 检测结合至所述固体基质的抗原-抗体复合体的存在;

其中,所述复合体的存在表示所述生物流体样本包括内源性抗-ApoA-I抗体。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述主体罹患急性胸痛。

3. 一种载脂蛋白A-I (ApoA-I) 的表位的模拟肽,其中,所述模拟肽:

(a) 由下列任意一种的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:19;以及

(b) 从属于(a)的氨基酸序列的至少两个不相邻氨基酸之间的内部交联;

其中,所述模拟肽能够特异地结合抗-ApoA-I抗体。

4. 根据权利要求3所述的模拟肽,其中,从属于(a)的氨基酸序列选自SEQ ID NO:19。

5. 根据权利要求1或2所述的应用,其中,从属于(b)的内部交联是在肽序列的位点n和n+4处的两个氨基酸之间形成的内酰胺桥,其中位点n处的Xaa是式(I)的经修饰的氨基酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{H})(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$,其中R是连接于位点n+4处的后续残基的内酰胺桥 $-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-$,并且其中位点n+4处的Xaa是式(I)的经修饰的氨基酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{H})(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$,其中R'是连接于来自于位点n处的所述Xaa的内酰胺桥的单键。

6. 根据权利要求1或2所述的应用,其中,从属于(b)的内部交联是连接肽序列的位点n和n+7处的两个氨基酸Xaa的烃连接,其中位点n处的Xaa是式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$,其中R是连接于在位点n+7处的后续Xaa的烃连接 $-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$,并且其中位点n+7处的Xaa是式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$,其中R'是连接于来自位点n处的所述Xaa的烃连接的单键。

7. 根据权利要求1或2所述的应用,其中,从属于(b)的内部交联是连接肽序列的位点n和n+4处的两个氨基酸Xaa的烃连接,其中位点n处的Xaa是式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$,其中R是连接在位点n+4处的后续Xaa的烃连接 $-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$,并且其中位点n+4处的Xaa是式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$,其中R'是连接于来自位点n处的所述Xaa的烃连接的单键。

8. 根据权利要求3所述的模拟肽,其中:(i)从属于(a)的氨基酸序列由SEQ ID NO:19组成,并且从属于(b)的内部交联是连接位点19处的谷氨酸(E)和位点23处的赖氨酸(K)的内酰胺桥,所述位点涉及从属于(a)的氨基酸序列;或者

(ii)从属于(a)的氨基酸序列由SEQ ID NO:15组成,并且从属于(b)的内部交联是连接位点16处的(R)-2-(7'-辛烯基)-丙氨酸和位点23处的(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸的烃连接,所述位点涉及从属于(a)的氨基酸序列;或者

(iii) 从属于(a)的氨基酸序列由SEQ ID NO:16组成,并且从属于(b)的内部交联是连接位点13处的(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸和位点17处的(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸的烃连接,所述位点涉及从属于(a)的氨基酸序列;

(iv) 从属于(a)的氨基酸序列由SEQ ID NO:17组成,并且从属于(b)的内部交联是连接位点9处的(R)-2-(7'-辛烯基)-丙氨酸和位点16处的(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸的烃连接,所述位点涉及从属于(a)的氨基酸序列。

9. 根据权利要求1或2所述的应用,其中所述模拟肽由SEQ ID NO:19组成。

10. 根据权利要求3或4所述的模拟肽,其在N末端的自由氨基被乙酰化,在C末端的自由羧基被酰胺化。

11. 一种药物组合物,包括至少一种根据权利要求3或4所述的模拟肽。

12. 用于在生物流体样本中检测抗-ApoA-I抗体的试剂盒,其包括至少一种根据权利要求3或4所述的模拟肽或其组合物。

13. 一种模拟肽在制备用于预防和/或治疗ApoA-I相关疾病的药剂中的应用,其中所述模拟肽选自权利要求3或4所述的模拟肽。

14. 根据权利要求13所述的应用,其中所述模拟肽是权利要求10所述的模拟肽。

15. 根据权利要求1或2中任一项所述的应用,其特征在于,所述模拟肽是根据权利要求3或4所述的模拟肽。

模拟肽

技术领域

[0001] 本发明涉及心血管疾病的预后、诊断或治疗中有用的肽。

背景技术

[0002] 载脂蛋白A-I (ApoA-I) 是高密度脂蛋白 (HDL) 中最丰富的蛋白 (70%)，已知其浓度与心血管疾病风险呈负相关。HDL相关的ApoA-I通过调节反向胆固醇运输并将其输送至肝脏而在胆固醇体内平衡中扮演关键角色 (Yancey et al; 2003, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:712-719)。HDL相关ApoA-I还具有抗炎性以及具有抗氧化性。

[0003] 在罹患系统性红斑狼疮 (SLE) 的病人中已指示有高水平的针对IgG亚型的ApoA-I的自身抗体 (抗-ApoA-I IgG)，这是与很高的心血管疾病 (CV) 风险相关的自身免疫病症 (Dinu et al, 1998, *Lupus* 7:355-360)。抗-ApoA-I IgG自身抗体已在其他高CV风险种群中被描述，包括在心肌梗塞 (MI) 病人中 (Vuilleumier et al, 2010a, *Eur. Heart J.* 31:815-823)、在患有风湿性关节炎 (RA) 的病人中 (Vuilleumier et al, 2010b, *Arthritis Rheum.* 62:2640-2650)、在患有急性胸痛的病人中 (Keller et al, 2012, *J. Intern. Med.* 271:451-462)，以及在患有颈动脉重度狭窄的病人中 (Montecucco et al, 2011, *Eur. Heart J.* 32:412-421)。在MI和RA病人中，抗-ApoA-I IgG自身抗体显示为独立地与高CV风险种群中的CV疾病的增高的风险相关 (Vuilleumier et al, 2010a and b, *supra*; Keller et al, 2012, *supra*)，在患有颈动脉重度狭窄的病人中，其与增加的动脉粥样硬化斑块易损性相关 (Montecucco et al, 2011, *Eur. Heart J.* 32:412-421)。最后，在近期的一个面对面的比较研究中，显示抗-ApoA-I IgG自身抗体是对于MI之后的CV预后的最佳的自身体液免疫标记物 (Vuilleumier, 2011, *J. Clinic. Experiment. Cardiology.* 2:69)，是为RA病人中的CV风险分层提供对传统心血管风险因子的增多的预后信息的唯一生物标记物 (Finckh et al, 2012, *Arthritis Care Res (Hoboken)* 64:817-825)。

[0004] 从病理生理学的角度上看，通过当将其施用给ApoE缺陷性小鼠时，其增大动脉粥样硬化斑块尺寸和易损性已显示了抗-ApoA-I IgG自身抗体是动脉粥样化形成和相关并发症的潜在介体 (Montecucco et al, 2011, *supra*)。尽管这些导致动脉粥样化的效果没有被完全了解，但是有证据表明它们在几个不同层面上协同作用。抗-ApoA-I IgG自身抗体已显示出 (i) 抑制高密度脂蛋白的抗动脉粥样硬化效果 (Batuca et al, 2009, *Rheumatology (Oxford)* 48:26-31)，(ii) 通过Toll样受体2/CD14复合体来促进无菌性炎症 (Pagano et al, 2012, *J Intern Med.* 1365-2796)，(iii) 通过L型钙通道的盐皮质激素受体下游激活来作为致心律失常因子起作用 (Rossier et al, 2012, *Endocrinology* 153:1269-1278)，以及 (iv) 促进中性粒细胞趋化性 (Montecucco et al, 2011, *supra*)。

[0005] 已研发出用于心血管失调的预后/诊断的方法，其基于对抗-ApoA-I IgG自身抗体在主体中的存在的评估。但是，这些方法一般是基于所述抗体和全长ApoA-I之间的免疫反应 (Dinu et al, 1998, *supra*; Vuilleumier et al, 2010a, *supra*; Keller et al, 2012, *supra*; Montecucco et al, 2011, *supra*; Batuca et al, 2009, *supra*)。在这样的诊断学免疫

测试中使用全长ApoA-I的主要局限涉及蛋白的大量生产的费用和其不稳定性,这危及测试的效率。为了解决现有技术中预后/诊断方法的问题,本发明提供了一种基于肽的新的诊断免疫测试,所述肽的生产更为廉价,其更稳定,并且其与来自罹患心血管疾病的病人的抗-ApoA-I IgG自身抗体特异性连接。本发明的方法尤其适用于对病人的具体需求选择适宜的治疗法,以及采取行动预防心血管失调的发展,在具有高的心血管风险的病人的亚种群中避免首次或复发的心血管事件。

发明内容

[0006] 在第一个方面,本发明涉及载脂蛋白A-I (ApoA-I) 的表位的模拟肽,其中所述模拟肽具有:

[0007] (a) 长度为15至80个氨基酸的氨基酸序列,

[0008] (b) 包括以下任意一种的氨基酸序列:

[0009] (i) SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24;或其变体,或者

[0010] (ii) 与从属于(i)的序列中的任意一个相同的氨基酸序列,不同之处在于所述(i)中的序列的1个、2个、3个、4个、5个或6个氨基酸被置换、缺失、插入,和/或化学修饰,而不失去所述模拟肽特异性连接抗-ApoA-I抗体的能力,或者

[0011] (iii) 从属于(i)和/或(ii)的两种氨基酸序列的任意组合;以及

[0012] (c) 从属于b)的氨基酸序列的至少两种非相邻氨基酸之间的内部交联;

[0013] 其中,所述模拟肽能够特异性地连接抗-ApoA-I抗体。

[0014] 在第二个方面,本发明涉及载脂蛋白A-I (ApoA-I) 的表位的模拟肽,其中所述模拟肽具有:

[0015] (a) 长度为15至80个氨基酸的氨基酸序列,

[0016] (b) 包括以下任意一种的氨基酸序列:

[0017] (i) SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23;或其变体,或者

[0018] (ii) SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9,或者SEQ ID NO:25;或其变体,或者

[0019] (iii) 与从属于(i)和/或(ii)的任意一个序列相同的氨基酸序列,不同之处在于所述(iii)中的序列的1个、2个、3个、4个、5个或6个氨基酸被置换、缺失、插入,和/或化学修饰,而不失去所述模拟肽特异性连接抗-ApoA-I抗体的能力,或者

[0020] (iv) 从属于(i)、(ii)和/或(iii)的两种氨基酸序列的任意组合;其中,所述模拟肽能够特异性地连接抗-ApoA-I抗体。

[0021] 本发明的第三方面涉及编码所述模拟肽的分离的多核苷酸、包括所述多核苷酸的重组载体、包括所述重组载体的宿主细胞,以及用于制备所述模拟肽的方法,其包括在培养基中培养所述宿主细胞和将所述肽从培养基中或在宿主细胞裂解之后从宿主细胞裂解液中分离,以及任选地将通过二硫桥、内酰胺桥或烃连接(hydrocarbon staple)获得的肽的两个非相邻的氨基酸残基交联的步骤。

[0022] 本发明的第四方面涉及诊断组合物、免疫测定制剂或免疫测试板,其包括至少一

种根据本发明的模拟肽。

[0023] 在第五方面,本发明提供一种包括至少一种根据本发明的模拟肽的药物组合物。

[0024] 在第六方面,本发明涉及一种用于在生物流体样本中检测抗-ApoA-I抗体作为心血管疾病的生物标记物的试剂盒,其包括至少一种根据本发明的模拟肽或其组合。

[0025] 本发明的第七方面涉及一种用于在哺乳动物主体的生物流体样本中检测内源性抗-ApoA-I IgG抗体的方法,其包括以下步骤:

[0026] (a) 提供来自哺乳动物主体的生物流体样本;

[0027] (b) 使所述生物流体样本与固体基质接触,其中至少一种根据本发明的模拟肽被偶联至所述固体基质,其中,所述接触是在足以使得在所述生物流体样本中存在的抗-ApoA-I IgG抗体通过抗原-抗体相互作用结合至至少一种模拟肽的条件下进行;

[0028] (c) 从所述固体基质的表面去除任何未结合的抗体;

[0029] (d) 检测结合至所述固体基质的抗原-抗体复合体的存在;

[0030] 其中,所述复合体的存在表示所述生物流体样本包括内源性抗-ApoA-I IgG抗体。

[0031] 第八方面涉及用于从哺乳动物主体的生物流体样本检测心血管疾病或风险概况的方法,其包括如下步骤:

[0032] (a) 提供来自哺乳动物主体的生物流体样本;

[0033] (b) 使所述生物流体样本与固体基质接触,其中至少一种根据本发明的模拟肽被偶联至所述固体基质,其中,所述接触是在足以使得在所述生物流体样本中存在的抗-ApoA-I抗体通过抗原-抗体相互作用结合至至少一种所述模拟肽的条件下进行;

[0034] (c) 从所述固体基质的表面去除任何未结合的抗体;

[0035] (d) 检测结合至所述固体基质上的抗原-抗体复合体的存在;

[0036] 其中,所述复合体的存在表示所述生物流体样本包括一种或多种心血管疾病相关的抗-ApoA-I自身抗体。

[0037] 第九方面涉及一种用于在需要其的主体中预防和/或治疗心血管疾病的方法,包括向主体施用所述模拟肽、其药物制剂或所述模拟肽的三维结构类似物。

[0038] 第十方面涉及一种用于在罹患急性胸痛、急性冠脉综合征、风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、颈动脉重度狭窄、晚期肾病或牙周炎的主体中预防和/或治疗心血管疾病的方法,包括以下步骤:

[0039] (a) 根据本发明的方法,检测在哺乳动物主体的生物流体样本中的内源性抗-ApoA-I IgG抗体;以及

[0040] (b) 施用选自于下列各项中的至少一种试剂:(i) 根据本发明的模拟肽或其药物制剂,(ii) 根据权利要求1-5中任一项所述的模拟肽的三维结构类似物,(iii) 包含ApoA-I的药物组合物,以及(iv) 适用于预防和/或治疗心血管疾病的试剂。

[0041] 本发明的其他特征和优点将从下列具体实施方式显而易见。

附图说明

[0042] 图1. 用于在溶液中根据本发明的肽中制备二硫桥(A)、使用基于Fmoc的固相肽合成在根据本发明的肽中制备烃连接(B) 或者在固相上在根据本发明的肽中制备内酰胺桥(C) 的化学反应。“DMSO”是二甲基亚砷,“PyBOP”是六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷

基,“DIEA”是N,N-二异丙基乙胺,“alloc基团”是烯丙氧羰基,“烯丙基”具有 $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ 结构式。括号旁边,m、k和l表示肽序列中氨基酸的位置。

[0043] 图2.在根据本发明的肽中内部交联的例子的发展的化学式:二硫桥(A),烃连接(B),内酰胺桥(C)。在(A)中:k是3或6,R是任意氨基酸侧链;在(B)中,对于在n和n+4位点的残基之间的交联,k是3,n是1,*是(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸;对于在n和n+7位点的残基之间的交联,k是6,n是4,*是(R)-2-(7'-辛烯基)-丙氨酸;R是任意氨基酸侧链;在(C)中:当X是 $-\text{CO}-\text{NH}-$ 时,n是2,p是4,k是3;当X是 $-\text{NH}-\text{CO}-$ 时,n是4,p是2,k是3;R是任意氨基酸侧链。括号旁边,m、k和l表示肽序列中氨基酸的位置。

[0044] 图3.模拟肽F3L1和F3S2A(F3S2A=F3S2)(A)、F3S1B和F4S2B(B)、F3L1和F4L1(C)的CD光谱显示了相比于非连接的对照F3肽, α -螺旋含量的增加。

[0045] 图4.竞争性ELISA显示了模拟肽F3L1有效地与完整的ApoA-I竞争结合至抗-ApoA-I抗体。来自已知对抗-ApoA-I抗体呈阳性的病人的血清以所示浓度与模拟肽F3L1预孵育,然后加到载有完整ApoA-I的ELISA板中,实施根据标准方法实施随后的实验步骤(A)。用ApoA-I作为竞争物实施竞争ELISA实验的对比结果(B)。

[0046] 图5.竞争ELISA显示了模拟肽F3L1有效地与完整ApoA-I竞争结合至抗-ApoA-I抗体。将来自3个已知对抗-ApoA-I抗体呈阳性(+)的病人的血清以指定浓度与模拟肽F3L1(A)、F3(B)或杂乱的F3(C)预孵育,然后加到载有完整ApoA-I的ELISA板中,根据标准方法实施随后的实验步骤。来自3个已知对抗-ApoA-I抗体呈阴性的病人的血清作为对照。

[0047] 图6.模拟肽F3L1抑制与抗-ApoA-I IgG相关的促炎反应。通过由抗-ApoA-I IgG(A)诱导的巨噬细胞或者通过来自对于抗-ApoA-I抗体呈阳性的病人的IgG的合并(B)产生的TNF- α 的效果。

[0048] 图7.模拟肽F3L1抑制抗-ApoA-I IgG相关的变时反应。

[0049] 图8.使用在赖氨酸(K)残基的消化的ApoA-I表位鉴定。来自阳性(A)和阴性(B)病人血清的抗存在于每个收集的部分中的肽的自身抗体的免疫反应性。

[0050] 图9.使用在精氨酸(R)残基的消化的ApoA-I表位鉴定。来自阳性(A)和阴性(B)病人血清的抗存在于每个收集的部分中的肽的自身抗体的免疫反应性。

具体实施方式

[0051] “载脂蛋白A-1”,在本文中也称为“ApoA-I”和“ApoA-1”,是在人体中由APOA1基因编码的蛋白质。在人体中,ApoA-I是28kDa的蛋白质(Uniprot登记号为P02647)。成熟的人体APO-A1包括243个氨基酸(SEQ ID NO:1)。ApoA-I蛋白质在脂类代谢中具有特定作用。载脂蛋白A-I是血浆中高密度脂蛋白(HDL)的主要蛋白组分。该蛋白质促进胆固醇从组织流出到肝脏去排泄。其是卵磷脂胆固醇脂酰转移酶(LCAT)的辅助因子,其负责大部分血浆胆固醇脂的形成。ApoA-I也被分离作为环前列腺素(PGI₂)稳定因子,并因此具有抗凝固效应。编码其的基因的缺陷与HDL缺陷(包括丹吉尔病)相关,并与系统性非神经病性淀粉样变性相关。ApoA-I是构型灵活、动态的蛋白质,能够在至少两种截然不同的构型之间转换:无脂构型和脂相关构型。载脂蛋白A-1的完整、无脂形式的结构研究表明下列6个 α 螺旋的存在:从SEQ ID NO:1位点10的精氨酸至位点39的甘氨酸的螺旋A;从SEQ ID NO:1的位点48的天冬酰胺至位点84的谷氨酰胺的螺旋B;从SEQ ID NO:136的位点94的赖氨酸至位点136的谷氨酸的

螺旋C;从SEQ ID NO:1的位点146的谷氨酸至位点187的丙氨酸的螺旋D;从SEQ ID NO:1的位点196的丙氨酸至位点212的谷氨酸的螺旋E;从SEQ ID NO:1的位点220的脯氨酸至位点243的谷氨酰胺的螺旋F。

[0052] 本文中使用的术语“表位的模拟肽”也称为“模拟表位”,指的是模拟目标蛋白质的表位的肽。所述模拟肽与目标蛋白质的天然表位足够相似以使得其能够被对天然表位特异的抗体识别(并且由此具有抗原性),并且还有可能诱发对于天然表位特异的免疫反应(并由此具有免疫原性)。更具体地,术语“ApoA-I的表位的模拟肽”指的是模拟载脂蛋白A-I的抗原决定簇的肽,并且其因此被与载脂蛋白A-I特异性结合的抗体(也称为ApoA-I抗体)识别。

[0053] 术语“表位”在本文中也称为“表位”或“抗原决定簇”,是被免疫系统识别、尤其被抗体、B细胞或T细胞识别的抗原的一部分。

[0054] “抗原性”指的是表位的抗原性,并相当于表位与免疫反应的终产物(例如分泌的抗体和/或T细胞的表面受体)结合的能力。“免疫原性”指的是表位的免疫原性,并相当于表位诱导体液和/或细胞调节的免疫反应的能力。尽管具有免疫原性性质的所有表位也都具有抗原性性质,但是反之却不能成立。

[0055] 用于氨基酸序列的表述“两个非相邻的氨基酸”在本文中表示在具有所述氨基酸序列的肽的一级结构中并不相邻的两个氨基酸,即彼此并不邻接。

[0056] 在本文中,术语“ApoA-I抗体”或“抗-ApoA-I抗体”是指能够选择性结合ApoA-I蛋白质(例如ApoA-I的无脂形式或其片段)的任何抗体或其变体形式,包括但不限于抗体片段、结构域抗体或单链抗体。尤其是,ApoA-I抗体包括能够结合哺乳动物(尤其是人)的ApoA-I(尤其是氨基酸序列SEQ ID NO:1的ApoA-I)的表位,或者尤其是位于由氨基酸序列SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:23的任意一种构成的区域中的任意表位的ApoA-I抗体。ApoA-I抗体包括鼠的、嵌合体的、人化的或完全人类的抗体,遗传工程或双特异性或多特异性抗体以及其片段,例如抗ApoA-I蛋白质或其片段等的单链抗体(scFv)或结构域抗体。抗-ApoA-I抗体可以为单克隆抗体或多克隆抗体,或具有基本上相同的抗原特异性的其片段或衍生物。尤其是,抗-ApoA-I抗体可以为在高心血管风险的病人中产生的自身抗体(也称为内源性抗体),尤其是在例如罹患急性胸痛、急性冠脉综合征、风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、颈动脉重度狭窄、晚期肾病或牙周炎的主体的病人种群中。术语“选择性”表示抗体优选识别和/或连接目标多肽或表位,即具有比其他抗原或表位更高的亲和性,即与目标多肽的连接可以和其他抗原的非特异性连接区别开。抗体的连接亲和性可以通过本领域的普通技术人员轻易地确定,例如通过斯卡查德分析(Scatchard分析)(Scatchard et al., 1949, Ann.N.Y.Acad.1949.51, 660-672)。

[0057] 术语“药学上可接受的”是指由并非生物学上或其他方面不可取的材料构成的载体。

[0058] 术语“载体”指的是在药物制剂中存在的并非活性剂的任何组分,并由此包括稀释剂、连接剂、润滑剂、崩解剂、填料、染色剂、湿润剂或乳化剂、pH缓冲剂、防腐剂等。

[0059] 本文中所用的“治疗”和“治”等通常表示获得所需的药理学和生理学效果。所述效果可以在预防或部分预防其疾病、症状或病症方面是预防性的,和/或可以在部分或完全治愈疾病、病症、症状或由所述疾病导致的不良反应方面是治疗性的。本文中使用的术语“治

疗”包括在哺乳动物,尤其是在人中的疾病的任何治疗,并包括:(a) 预防疾病在易感染该疾病但还未被确诊为患有该疾病(例如基于家族病史)的主体中产生;(b) 抑制疾病,即阻止疾病的发展;或减缓疾病,即导致疾病和/或其病症或症状的衰退,例如改善或损伤的修复。

[0060] 尤其是,心血管疾病的治疗包括预防、降低或者甚至根除疾病或失调的病症,例如通过在一般种群中(一级预防)或者在已经患有心肌梗死脑卒中或者外周动脉疾病这些疾病的病人中(二级预防)降低心肌梗死脑卒中或者外周动脉疾病的流行和发生率。

[0061] 术语“心血管疾病”在本文中被限定为影响心脏或血管的疾病或失调。心血管疾病或失调的非限制性的实施例主要包括动脉硬化的急性或者慢性表现,例如急性冠状动脉综合征、中风、短暂脑缺血发作、心律不齐、心衰竭和外周动脉疾病。

[0062] 术语“心血管疾病风险”或“心血管风险”在本文中被限定为对于还没有发展主要动脉粥样硬化病的主体来说发展心血管疾病的概率。此概率主要基于对不同的传统的心血管风险因子的观察来评估,例如性别、年龄、家族病史、吸烟情况、糖尿病、高血压(过度紧张)、高胆固醇(血脂异常)、肥胖、体能活动不足和不健康的饮食,已已知为风险评分表例如 Framingham 风险评分(D'Agostino et al,2008,Circulation 117:743-53)。当发展心血管疾病的10年风险基于10年总 Framingham 风险评分(D'Agostino et al,2008,Circulation 117:743-53)高10%时,一个主体能被评估为具有“高心血管风险”。

[0063] 在本文中使用的术语“主体”是指哺乳动物。例如,本发明所预期的哺乳动物包括人类、灵长类、家养动物例如牛、羊、猪、马、啮齿类实验动物等。

[0064] 表达“生物流体样本”是指用于测试的临床流体样本,其来自哺乳动物的体液例如唾液、血液和尿液中取出。例如,生物流体样本是来自人类主体的血清样本。

[0065] 表达“对照样本”是指阳性对照或阴性对照样本。阴性对照样本包括从与将被测试抗-ApoA-I自身抗体的主体是相同或同源物种,并且已知具有正常生物状态(例如没有可检测到的抗ApoA-I自身抗体)的主体取得的体液样本,或者不含与ApoA-I具有免疫反应性的抗体的溶液。阳性对照样本包括从与将被测试自身抗体的主体是相同或同源的物种,并且已知具有可检测到的抗ApoA-I自身抗体的主体取得的体液样本,或者包含与ApoA-I具有免疫反应性的抗体的溶液。

[0066] 用于肽或多肽的术语“变体”在本文中表示与参考肽序列基本上同源的肽或多肽,但是其由于一个或多个氨基酸的缺失、插入和/或置换而与参考序列的氨基酸序列不同。基本上同源是指除了1个、2个、3个、4个、5个或6个氨基酸残基的缺失、插入和/或置换之外与参考肽序列完全相同的变异的氨基酸序列。两个氨基酸序列的一致性可通过目测和/或数学计算或者更简单地通过使用已知的用于序列比较的计算机程序(例如Clustal包版本1.83)来比较序列信息来确定。变体可包括具有至少一个被保守置换的氨基酸的序列,这意味着给定的氨基酸残基被具有相似生理化学特性的残基替代。一般来说,对于存在于原始多肽中的一个或多个氨基酸的置换应该保守地进行。保守的置换的例子包括用一个脂肪族残基置换另一个脂肪族残基,例如Ile、Val、Leu或Ala彼此置换,或者用一个极性残基置换另一个极性残基,例如Lys和Arg;Glu和Asp;或者Gln和Asn之间的置换。其他的这样的保守置换(例如具有类似的疏水特性的整个区域的置换)是已熟知的(Kyte,et al,1982,J.Mol.Biol.,157:105-131)。例如,“保守的氨基酸置换”可能涉及用非天然氨基酸残基置换天然氨基酸残基,并使得对该位点的氨基酸残基的极性或电荷没有或者几乎没有影响。

所需的氨基酸置换(不管是保守的还是非保守的)可在需要该置换时由本领域技术人员确定。示例性的氨基酸置换显示在下表1中。术语“变体”还包括与参考肽序列基本上同源的肽或多肽,但是由于一个或多个氨基酸被化学修饰或者被氨基酸类似物置换,其具有与参考序列不同的氨基酸序列。例如,1个、2个、3个、4个、5个或6个氨基酸被化学修饰。一个或多个氨基酸残基的化学修饰包括用于建立烃连接的修饰,例如将序列的任何残基化学修饰成(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸或者(R)-2-(7'-辛烯基)-丙氨酸。因此,在本文中定义的变体还包括所参考的肽序列,其中序列的一个或多个氨基酸残基已被(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸或者(R)-2-(7'-辛烯基)-丙氨酸置换以建立烃连接。

[0067] 表1

[0068]

原始残基	置换的例子
Ala (A)	Val, Leu, Ile
Arg (R)	Lys, Gln, Asn
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser, Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Pro, Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, 正亮氨酸
Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe, 正亮氨酸
Lys (K)	Arg, Gln, Asn
Met (M)	Leu, Ile, Phe
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr
Pro (P)	Ala, Gly
Ser (S)	Thr, Ala, Cys
Trp (W)	Phe, Tyr
Thr (T)	Ser
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, 正亮氨酸

[0069] 变体还包括根据本发明的模拟肽,其包括用来稳定 α -螺旋结构的 α , α -二烷基化的残基(例如2-氨基异丁酸)。用于添加 α , α -二烷基化的残基的优选的位点涉及不具备螺旋形成的内在和明显倾向的残基的位点,例如脯氨酸、甘氨酸或缬氨酸,后者具有稳定折叠结构的内在倾向。可用于产生本文所述的烃连接的(R)-2-(7'-辛烯基)-丙氨酸和(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸也属于此化合物家族。如果对于所示肽存在任何治疗应用,这些残基也可以加入肽的倾向于蛋白水解切割的位点。其中可在ApoA-I氨基酸序列加入 α , α -二烷基化的残基的位点的例子包括在F螺旋区域中的位点,例如在位点229的脯氨酸,在位点220的缬氨酸,在位点221的苯丙氨酸,在位点225的赖氨酸,在位点226的缬氨酸或者在位点228的苯丙

氨酸,这些位点适用于成熟ApoA-I氨基酸序列SEQ ID NO:1。

[0070] 术语“固体基质”包括适用于实施根据本发明的免疫测试或方法的任何固相支持物。其包括珠、微米颗粒、纳米颗粒、管、织物或板、膜、片、孔,由玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、硝化纤维、石英、陶瓷、右旋糖酐或其他材料形成,或者负载有玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、硝化纤维、石英、陶瓷、右旋糖酐或其他材料。例如,固体基质是微量滴定孔的形式,例如96孔微量滴定板。

[0071] 术语“试剂盒”包括至少一种根据本发明的模拟肽或其变体或其组合(其如本文中所述的将要或者已经与固体基质偶联),和任选地说明材料。

[0072] 术语根据本发明的治疗或方法的术语“效力”可基于疾病或病症在响应于根据本发明的应用或方法的过程中的变化来测定。例如根据本发明的治疗或方法的效力可以通过其对下列各项的影响来测定:i)不同的相对临床终点(例如:总体死亡率、心血管相关死亡率、急性冠脉综合征或中风复发、住院治疗……),和/或ii)替代标记物,例如治疗化合物在不同动物或体外体系中的影响。

[0073] 术语“有效量”在本文中是指根据本发明的至少一种模拟肽或其药物制剂在正在被施用所述模拟肽的主体中引发心血管疾病的症状的可检测的减少的量,这些症状可包括例如总体死亡率、心血管相关死亡率、急性冠脉综合征或中风复发、CV相关的住院治疗。

[0074] ApoA-I的表位的模拟肽

[0075] 本发明的一方面涉及模拟无脂的载脂蛋白A-1构象的表位并能够特异性结合来自患有心血管疾病或失调的病人的抗-ApoA-I自身抗体的肽。

[0076] 在第一方面,模拟肽具有内部交联。

[0077] 在一个实施方式中,本发明涉及ApoA-I的表位的模拟肽,其中所述肽具有:

[0078] (a) 长度为15-80个氨基酸的氨基酸序列;

[0079] (b) 包括以下任意一种的氨基酸序列:

[0080] (i) SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24;或其变体

[0081] (ii) 与从属于(i)的序列中的任意一个相同的氨基酸序列,不同之处在于所述从属于(i)的序列的1个、2个、3个、4个、5个或6个氨基酸被置换、缺失、插入,和/或化学修饰,而不失去所述模拟肽特异性连接至抗-ApoA-I抗体的能力,

[0082] (iii) 从属于(i)和/或从属于(ii)的氨基酸序列中的两种的任意组合;以及

[0083] (c) 从属于b)的氨基酸序列的至少两种不连续氨基酸之间的内部交联;

[0084] 其中,所述模拟肽能够特异性地连接至抗-ApoA-I抗体。

[0085] 在一个实施方式中,上述模拟肽的长度为20-55个、尤其是25-55个、更尤其是25-40个氨基酸。

[0086] 在另一个实施方式中,上述模拟肽长度为20-40个;21-40个;22-40个;23-40个;24-40个;25-40个;26-40个;27-40个;28-40个;或30-40个氨基酸。

[0087] 在另一个实施方式中,上述模拟肽长度为15个、16个、17个、18个、19个、20个、21

个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、41个、42个、43个、44个、45个、50个、55个、60个、65个、70个、75个或80个氨基酸。尤其是根据本发明的模拟肽具有17个、18个、22个、26个、28个、32个、37个、38个、39个、40个、42个、44个或55个氨基酸。

[0088] 在一个实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列包括(i) SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9,或其变体中的任意一种,或(ii)选自SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9,或其变体中的两种序列的组合。

[0089] 在另一个实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列包括(i) SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24,和SEQ ID NO:18,或其变体中的任意一种,或者(ii)选自SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24,或其变体中的两种序列的组合。

[0090] 在一个实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列由下列各项构成:(i) SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9,或其变体中的任意一种,或者(ii)选自SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9,或其变体中的两种序列的组合。

[0091] 在另一个实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列由下列各项构成:

[0092] (i) SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24,和SEQ ID NO:18,或其变体中的任意一种,或者(ii)选自SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:24,或其变体中的两种序列的组合。

[0093] 在另一个实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列包括SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9或其变体的任意一种。

[0094] 在另一个实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列包括SEQ ID NO:25或其变体。

[0095] 在另一个具体实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列由SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9或其变体的任意一种构成。

[0096] 在另一个实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列由SEQ ID NO:25或其变体构成。

[0097] 在另一个实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列包括SEQ ID NO:5或其变体。

[0098] 在另一个实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列包括SEQ ID NO:5,其中SEQ ID NO:5的C末端部分的最后两个氨基酸E和N缺失。

[0099] 在另一个实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列包括SEQ ID NO:21或其变体。

[0100] 在另一个具体的实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列由SEQ ID NO:5或其变体构成。

[0101] 在另一个实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列由SEQ ID NO:5构成,其中SEQ ID NO:5的C末端部分的最后两个氨基酸E和N缺失。

[0102] 在另一个具体实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列由SEQ ID NO:21或其变体构成。

[0103] 在另一个实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列包括SEQ ID NO:23或由SEQ ID NO:23构成,或者由SEQ ID NO:23构成,其中添加了1个、2个、3个、4个、5个或6个,尤其是5个氨基酸。

[0104] 在又一个实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列包括SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20,或其变体。

[0105] 在又一个实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列包括SEQ ID NO:19,或其变体。

[0106] 在另一个实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列由SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20,或其变体中的任意一个构成。

[0107] 在另一个实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列由SEQ ID NO:19,或其变体构成。

[0108] 在又一个实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列包括SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:24,或其变体。

[0109] 在另一个具体实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列由SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:24,或其变体中的任意一个构成。

[0110] 在再一个实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列包括SEQ ID NO:13或由SEQ ID NO:13构成。

[0111] 在一个具体实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列包括SEQ ID NO:18,或其变体。

[0112] 在另一个具体实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列由SEQ ID NO:18或其变体构成。

[0113] 在另一个实施方式中,根据本发明的肽具有如上所述的氨基酸序列,不同之处在于,所述序列的1个、2个、3个、4个、5个或6个氨基酸被置换、缺失和/或插入,而不失去所述模拟肽特异性连接抗-ApoA-I抗体的能力。

[0114] 在本发明的一个具体实施方式中,所述序列的1个、2个、3个、4个、5个或6个氨基酸被适用于建立内部交联的氨基酸残基置换,例如用来建立内酰胺桥的谷氨酸(E)残基和/或赖氨酸(K)残基,或者例如用来建立二硫桥的半胱氨酸(C)残基。

[0115] 任选地,包括在本发明的模拟肽的氨基酸序列中的2个、4个或6个氨基酸被化学修饰以建立内部交联,而不失去所述模拟肽特异性连接抗-ApoA-I抗体的能力。例如,在一个具体实施方式中,包括在根据本发明的肽的氨基酸序列中的至少2个,例如2个或4个氨基酸残基(例如苯丙氨酸(F)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V)、赖氨酸(K)和酪氨酸(Y))被

丙氨酸残基置换,并且所述丙氨酸残基被化学修饰成(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸或者(R)-2-(7'-辛烯基)-丙氨酸,以使得能够在两个被化学修饰的丙氨酸残基之间建立烃连接。

[0116] 在另一个实施方式中,本发明的模拟肽的N末端和/或C末端被进一步修饰,以分别去除自由氨基和/或羧基末端的可能的电荷。在一个具体实施方式中,所述肽的N末端的自由氨基被共价连接于酰基(例如乙酰基、丙酰基、十六烷酰基等)。在另一个实施方式中,在所述肽的C末端的自由羧基被酰胺化。在一个进一步的实施方式中,模拟肽的N末端和C末端两者都被修饰,尤其是所述肽的N末端的自由氨基被共价连接到酰基(例如乙酰基、丙酰基、十六烷酰基等),并且所述肽的C末端的自由羧基被酰胺化。

[0117] 在本发明的一个进一步的实施方式中,通过共价连接进行包括在上述模拟肽的氨基酸序列中的2个不相邻氨基酸之间的内部交联,所述共价连接例如为内酰胺桥、烃连接、二硫桥或在所述2个不相邻氨基酸残基之间的任何其他刚性连接器,例如通过主链氢键替代稳定化来产生的连接器(Chapman et al, J Am Chem Soc, 2004, 126:12252-12253),或在图1和图2中表示的连接器。

[0118] 在本发明的一个实施方式中,被交联的肽的氨基酸残基分别位于位点n和n+3、n+4、n+5、n+6、n+7、n+8、n+9、n+10、n+11。应理解,位点是指肽的一级氨基酸序列,即氨基酸残基在肽的一级结构中的相应位点,并且“n”表示氨基酸残基中的一个的位点,“n+3”表示另一个氨基酸残基位于所述肽的氨基酸序列的n位点再加3个氨基酸处,“n+4”表示另一个氨基酸残基位于所述肽的氨基酸序列的n位点再加4个氨基酸处,“n+5”表示另一个氨基酸残基位于所述肽的氨基酸序列的n位点再加5个氨基酸处。

[0119] 在本发明的一个具体实施方式中,在肽序列中的位点n处的半胱氨酸(C)残基和所述肽序列的位点n+3处的另一个半胱氨酸(C)残基之间建立二硫桥。用于在溶液中的肽之中制备二硫桥的化学反应在图1A中表示。肽中的二硫桥在图2A中表示。

[0120] 在本发明的另一个具体实施方式中,在肽序列中的位点n处的经化学修饰的丙氨酸(A)和在所述肽序列的位点n+4、n+7处的另一个经化学修饰的丙氨酸(A)之间建立烃连接。具体地,在包括 α -二置换氨基酸的经修饰的丙氨酸残基(例如2-氨基异丙酸、(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸和(R)-2-(7'-辛烯基)-丙氨酸)之间建立烃连接。在一个进一步的实施方式中,内部交联是在一个(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸和一个(R)-2-(7'-辛烯基)-丙氨酸之间的烃连接。在另一个实施方式中,内部交联是在两个(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸之间的烃连接。在一个可替换的实施方式中,烃连接建立在肽序列中的位点n处的经化学修饰的丙氨酸(A)和所述肽序列的位点n+3的另一个经化学修饰的丙氨酸(A)之间。

[0121] 用于使用基于Fmoc固相肽合成,在肽中制造烃连接的化学反应在图1B中表示。在肽中的烃连接在图2B中表示。

[0122] 在本发明中有用的烃连接的例子包括在图2B中描述的那些。例如,烃连接可以连接位点n和n+7处的两个氨基酸Xaa,其中位点n处的Xaa是式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$,其中R是连接在位点n+7处的后续Xaa的烃连接 $-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$,并且其中位点n+7处的Xaa是式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$,其中R'是连接于来自如上所限定的位点n的Xaa的烃连接的单键。作为另一个例子,烃连接可以连接位点n和n+4处的两个氨基酸Xaa,其中位点n处的Xaa是式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$,其中R是连接在位点n+4处的后续Xaa的烃连接 $-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$,并且其

中位点n+4处的Xaa是式(I)的经修饰的丙氨酸： $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$ ，其中R'是连接于来自如上所限定的位点n的Xaa的烃连接的单键。

[0123] 在本发明的一个具体实施方式中，在肽序列中的位点n处的谷氨酸(E)残基和所述肽序列的位点n+4或n+7处(优选在位点n+4处)的赖氨酸(K)残基之间建立内酰胺桥。

[0124] 在另一个实施方式中，在肽序列中的位点n处的赖氨酸(K)残基和所述肽序列的位点n+4或n+7处(优选在位点n+4处)的谷氨酸(E)残基之间建立内酰胺桥。

[0125] 用于在固相中的肽中制造内酰胺桥的化学反应在图1C中表示。在肽中的内酰胺桥在图2C中表示。

[0126] 在本发明中有用的内酰胺桥的例子包括在图2C中表示的那些。例如，在肽序列的位点n和n+4处的两个氨基酸Xaa之间形成的内酰胺桥，其中在位点n处的Xaa是式(I)的经修饰的丙氨酸： $-\text{NH}-\text{C}(\text{H})(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$ ，其中R是连接于在位点n+4处的后续残基的内酰胺桥 $-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-$ ，并且其中位点n+4处的Xaa是式(I)的经修饰的丙氨酸： $-\text{NH}-\text{C}(\text{H})(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$ ，其中R'是连接于来自上述的位点n的Xaa的内酰胺桥的单键。另一个例子是在肽序列的n和n+4处的两个氨基酸Xaa之间形成的内酰胺桥，其中位点n处的Xaa是式(I)的经修饰的氨基酸： $-\text{NH}-\text{C}(\text{H})(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$ ，其中R是连接于在位点n+4处的后续Xaa的内酰胺桥 $-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-$ ，并且其中位点n+4处的Xaa是式(I)的经修饰的氨基酸： $-\text{NH}-\text{C}(\text{H})(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$ ，其中R'是连接于来自上述的位点n处的Xaa的内酰胺桥的单键。

[0127] 在一个进一步的实施方式中，根据本发明的模拟肽选自下表2中表示的肽，其中通过在加下划线的谷氨酸(E)和赖氨酸(K)残基之间的内酰胺桥或者通过在R8和S5之间的烃连接进行内部交联，其中R8对应于(R)-2-(7'-辛烯基)-丙氨酸，并且S5对应于(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸。

[0128] 表2根据本发明的模拟肽和其氨基酸序列的例子。

[0129] R8对应于(R)-2-(7'-辛烯基)-丙氨酸，并且S5对应于(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸，其参与根据图2B的烃连接。加下划线的E和K是参与根据图2C的内酰胺桥的氨基酸。任选地，根据本发明的肽在N末端的自由氨基被乙酰化，在C末端的自由羧基被酰胺化。

[0130]

VKDLR₈TVYVDV₅KDSGRDYVSQFEGSAL

具有图 2B 的连接位点 5 的 R8 和位点 12 的 S5 的烃连接
由 SEQ ID NO:10 表示

DSVTSTR₈SKLREQS₅GPVTQEFWDNLEKETEG

具有图 2B 的连接位点 7 的 R8 和位点 14 的 S5 的烃连接
由 SEQ ID NO:11 表示

YLDDFQKKWQEER₈ELYRQKS₅EPLRAELQEGARQKLHEL

具有图 2B 的连接位点 13 的 R8 和位点 20 的 S5 的烃连接
由 SEQ ID NO:12 表示

EEMRDRARAHR₈DALRTHS₅APYSDELQRRLAARLEALKEN

具有图 2B 的连接位点 11 的 R8 和位点 18 的 S5 的烃连接
由 SEQ ID NO:13 表示

ATEHR₈STLSEKS₅KPALED

具有图 2B 的连接位点 5 的 R8 和位点 12 的 S5 的烃连接
由 SEQ ID NO:14 表示

[0131]

GLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNT 具有图 2C 的连接位点 19 的 E 和位点 23 的 K 的内酰胺桥 由 SEQ ID NO:19 表示
GLLPVLESFKVSFLSR ₈ LEEYTKS ₅ LNT 具有图 2B 的连接位点 16 的 R8 和位点 23 的 S5 的烃连接 由 SEQ ID NO:15 表示
GLLPVLESFKVSS ₅ LSAS ₅ EEYTKKLNT 具有图 2B 的连接位点 13 的 S5 和位点 17 的 S5 的烃连接 由 SEQ ID NO:16 表示
VLESFKVSR ₈ LSALEES ₅ TKKLNT 具有图 2B 的连接位点 8 的 R8 和位点 16 的 S5 的烃连接 由 SEQ ID NO:17 表示
VLESFKVSFLSALEEYTKKLNT 具有图 2C 的连接位点 15 的 E 和位点 19 的 K 的内酰胺桥 由 SEQ ID NO:20 表示
CAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLR§GLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTC 在位点 28 处§=Gln 类似物(侧链是 CH ₂ -S-CH ₂ -CONH ₂ 而不是 CH ₂ -CH ₂ -CONH ₂), 并且具有连接位点 47 处的 E 和位点 51 处的 K 的图 2C 的内酰胺桥 由 SEQ ID NO:18 表示
VKDLX _a aTVYVDVX _a aKDSGRDYVSQFEGSAL (SEQ ID NO: 10, 其中位点 5 处的 X _a a 被置换成式 (I) 的经修饰的丙氨酸: -NH-C(CH ₃)(R)-C(O)-, 其中 R 是连接于位点 12 处的后续 X _a a 的烃连接-(CH ₂) ₆ -CH=CH-(CH ₂) ₃ -, 并且其中位点 12 处的 X _a a 是式(I)的经修饰的丙氨酸: -NH-C(CH ₃)(R')-C(O)-, 其中 R'是连接于来自上述限定的位点 5 处的 X _a a 的烃连接的单键)
DSVTSTX _a aSKLREQX _a aGPVTQEFWDNLEKETEG (SEQ ID NO: 11, 其中位点 7 处的 X _a a 是式 (I) 的经修饰的丙氨酸: -NH-C(CH ₃)(R)-C(O)-, 其中 R 是连接于位点 14 处的后续 X _a a 的烃连接-(CH ₂) ₆ -CH=CH-(CH ₂) ₃ -, 并且其中位点 14 处的 X _a a 是式(I)的经修饰的丙氨酸: -NH-C(CH ₃)(R')-C(O)-, 其中 R'是连接于来自上述限定的位点 7 处的 X _a a 的烃连接的单键)
YLDDFQKKWQEE _X a _a ELYRQK _X a _a EPLRAELQEGARQKLHEL (SEQ ID NO: 12, 其中位点 13 处的 X _a a 是式 (I) 的经修饰的丙氨酸: -NH-C(CH ₃)(R)-C(O)-, 其中 R 是连接于位点 20 处的后续 X _a a 的烃连接-(CH ₂) ₆ -CH=CH-(CH ₂) ₃ -, 并且其

[0132]

中位点 20 处的 Xaa 是式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$, 其中 R' 是连接于来自上述限定的位点 13 处的 Xaa 的烃连接的单键)

EEMRDRARAHXaaDALRTHXaaAPYSDELQRLAARLEALKEN (SEQ ID NO: 13, 其中位点 11 处的 Xaa 是式 (I) 的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$, 其中 R 是连接于位点 18 处的后续 Xaa 的烃连接 $-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$, 并且其中位点 18 处的 Xaa 是式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$, 其中 R' 是连接于来自上述限定的位点 11 处的 Xaa 的烃连接的单键)

LSPLGEEMRDRARAHXaaDALRTHXaaAPYSDELQRLAARLEALK (SEQ ID NO: 22, 其中位点 16 处的 Xaa 是式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$, 其中 R 是连接于位点 23 处的后续 Xaa 的烃连接 $-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$, 并且其中位点 23 处的 Xaa 是式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$, 其中 R' 是连接于来自上述限定的位点 16 处的 Xaa 的烃连接的单键)

EEMRDRARAHXaaDALRTHXaaAPYSDELQRLAARLEALK (SEQ ID NO: 24, 其中位点 11 处的 Xaa 是式 (I) 的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$, 其中 R 是连接于位点 18 处的后续 Xaa 的烃连接 $-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$, 并且其中位点 18 处的 Xaa 是式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$, 其中 R' 是连接于来自上述限定的位点 11 处的 Xaa 的烃连接的单键)

ATEHXaaSTLSEKXaaKPALED (SEQ ID NO: 14, 其中位点 5 处的 Xaa 是式 (I) 的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$, 其中 R 是连接于位点 12 处的后续 Xaa 的烃连接 $-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$, 并且其中位点 12 处的 Xaa 是式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$, 其中 R' 是连接于来自上述限定的位点 5 处的 Xaa 的烃连接的单键)

GLLPVLESFKVSFLSALEXaaYTKXaaLNT (SEQ ID NO: 19, 其中位点 19 处的 Xaa 是式 (I) 的经修饰的氨基酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{H})(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$, 其中 R 是连接于位点 23 处的后续 Xaa 的内酰胺桥 $-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-$, 并且其中位点 23 处的 Xaa 是式(I)的经修饰的氨基酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{H})(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$, 其中 R' 是连接于来自上述限定的位点 19 处的 Xaa 的内酰胺桥的单键)

GLLPVLESFKVSFLSXaaLEEYTKXaaLNT (SEQ ID NO: 15, 其中位点 16 处的 Xaa 是式 (I) 的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$, 其中 R 是连接于位点 23 处的后续 Xaa 的烃连接 $-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$, 并且其中位点 23 处的 Xaa 是式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$, 其中 R' 是连接于来自上述限定的位点 16 处的 Xaa 的烃连接的单键)

GLLPVLESFKVS XaaLSAXaaEEYTKKLNT (SEQ ID NO: 16, 其中位点 13 处

[0133]

的 Xaa 是式 (I) 的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$, 其中 R 是连接于位点 17 处的后续 Xaa 的烃连接 $-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$, 并且其中位点 17 处的 Xaa 是式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$, 其中 R' 是连接于来自上述限定的位点 13n 处的 Xaa 的烃连接的单键)

VLESFKVSXaaLSALEEXaaTKKLNT (SEQ ID NO: 17, 其中位点 9 处的 Xaa 是式 (I) 的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$, 其中 R 是连接于位点 16 处的后续 Xaa 的烃连接 $-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$, 并且其中位点 16 处的 Xaa 是式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$, 其中 R' 是连接于来自上述限定的位点 9 处的 Xaa 的烃连接的单键)

VLESFKVSFLSALEXaaYTKXaaLNT (SEQ ID NO: 20, 其中位点 15 处的 Xaa 是式 (I) 的经修饰的氨基酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{H})(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$, 其中 R 是连接于位点 19 处的后续 Xaa 的内酰胺桥 $-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-$, 并且其中位点 19 处的 Xaa 是式 (I) 的经修饰的氨基酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{H})(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$, 其中 R' 是连接于来自上述限定的位点 15 处的 Xaa 的亚酰胺桥的单键)

CAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRXaaGLLPVLESFKVSFLSALEXaaYTKXaaLNTC (SEQ ID NO: 18, 其中位点 28 处的 Xaa 是具有 $\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CONH}_2$ 作为侧链的 Gln 类似物, 其中位点 47 处的 Xaa 是式 (I) 的经修饰的氨基酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{H})(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$, 其中 R 是连接于位点 51 处的后续 Xaa 的内酰胺桥 $-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-$, 并且其中位点 51 处的 Xaa 是式(I)的经修饰的氨基酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{H})(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$, 其中 R' 是连接于来自上述限定的位点 47 处的 Xaa 的亚酰胺桥的单键)

[0134] 在一个具体实施方式中, 根据本发明的模拟肽的氨基酸序列包括SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9,或其变体。

[0135] 在一个具体实施方式中, 根据本发明的模拟肽的氨基酸序列包括SEQ ID NO:25,或其变体。

[0136] 在另一个具体实施方式中, 根据本发明的模拟肽的氨基酸序列包括SEQ ID NO:5,或其变体。

[0137] 在另一个具体实施方式中, 根据本发明的模拟肽的氨基酸序列包括SEQ ID NO:5, 其中SEQ ID NO:5的C末端部分的最后两个氨基酸E和N缺失。

[0138] 在另一个实施方式中, 根据本发明的模拟肽的氨基酸序列包括SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:23,或其变体。

[0139] 在另一个实施方式中, 根据本发明的模拟肽的氨基酸序列包括SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:20,或其变体。

[0140] 在另一个具体实施方式中, 根据本发明的模拟肽包括SEQ ID NO:15, 其中N末端的自由氨基被乙酰化和/或C末端的自由羧基被酰胺化, 更具体地, 其中N末端的自由氨基被乙

酰化,并且C末端的自由羧基被酰胺化。

[0141] 在另一个具体实施方式中,根据本发明的模拟肽包括SEQ ID NO:16,其中N末端的自由氨基被乙酰化和/或C末端的自由羧基被酰胺化,更具体地,其中N末端的自由氨基被乙酰化,并且C末端的自由羧基被酰胺化。

[0142] 在另一个具体实施方式中,根据本发明的模拟肽包括SEQ ID NO:17,其中N末端的自由氨基被乙酰化和/或C末端的自由羧基被酰胺化,更具体地,其中N末端的自由氨基被乙酰化,并且C末端的自由羧基被酰胺化。

[0143] 在另一个具体实施方式中,根据本发明的模拟肽包括SEQ ID NO:19,其中N末端的自由氨基被乙酰化和/或C末端的自由羧基被酰胺化,更具体地,其中N末端的自由氨基被乙酰化,并且C末端的自由羧基被酰胺化。

[0144] 在另一个具体实施方式中,根据本发明的模拟肽包括SEQ ID NO:20,其中N末端的自由氨基被乙酰化和/或C末端的自由羧基被酰胺化,更具体地,其中N末端的自由氨基被乙酰化,并且C末端的自由羧基被酰胺化。

[0145] 在另一个实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列包括SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:24。

[0146] 在一个具体实施方式中,根据本发明的模拟肽包括SEQ ID NO:13,其中N末端的自由氨基被乙酰化和/或C末端的自由羧基被酰胺化,更具体地,其中N末端的自由氨基被乙酰化,并且C末端的自由羧基被酰胺化。

[0147] 在一个具体实施方式中,根据本发明的模拟肽包括SEQ ID NO:22,其中N末端的自由氨基被乙酰化和/或C末端的自由羧基被酰胺化,更具体地,其中N末端的自由氨基被乙酰化,并且C末端的自由羧基被酰胺化。

[0148] 在一个具体实施方式中,根据本发明的模拟肽包括SEQ ID NO:24,其中N末端的自由氨基被乙酰化和/或C末端的自由羧基被酰胺化,更具体地,其中N末端的自由氨基被乙酰化,并且C末端的自由羧基被酰胺化。

[0149] 在一个进一步的实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列包括以下各项的任意一种:

[0150] (i) 具有连接位点19处的E和位点23处的K的图2C的内酰胺桥的SEQ ID NO:19;

[0151] (ii) 具有连接位点16处的(R)-2-(7'-辛烯基)-丙氨酸和位点23处的(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸的图2B的烃连接的SEQ ID NO:15;

[0152] (iii) 具有连接位点13处的(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸和位点17处的(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸的图2B的烃连接的SEQ ID NO:16;

[0153] (iv) 具有连接位点9处的(R)-2-(7'-辛烯基)-丙氨酸和位点16处的(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸的图2B的烃连接的SEQ ID NO:17。

[0154] 在一个进一步的实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列包括SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:20,或其变体中的任意一种。

[0155] 在一个进一步的实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列包括SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:24,或其变体中的任意一种。

[0156] 在再一个进一步的实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列由以下各项的任意一项构成:

[0157] (i) 具有连接位点19处的E和位点23处的K的图2C的内酰胺桥的SEQ ID NO:19;

[0158] (ii) 具有连接位点16处的(R)-2-(7'-辛烯基)-丙氨酸和位点23处的(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸的图2B的烃连接的SEQ ID NO:15;

[0159] (iii) 具有连接位点13处的(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸和位点17处的(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸的图2B的烃连接的SEQ ID NO:16;

[0160] (iv) 具有连接位点9处的(R)-2-(7'-辛烯基)-丙氨酸和位点16处的(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸的图2B的烃连接的SEQ ID NO:17。

[0161] 在一个进一步的具体实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列由SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:20,或其变体中的任意一种构成。

[0162] 在一个进一步的具体实施方式中,根据本发明的模拟肽的氨基酸序列由SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:24,或其变体中的任意一种构成。

[0163] 另一方面,根据本发明的模拟肽不具有内部交联。

[0164] 在一个实施方式中,本发明涉及载脂蛋白A-I (ApoA-I) 的表位的模拟肽,其中所述模拟肽具有:

[0165] (a) 长度为15至80个氨基酸的氨基酸序列,

[0166] (b) 包括以下任意一种的氨基酸序列:

[0167] (i) SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23;或其变体,或者

[0168] (ii) SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, 或者SEQ ID NO:25;或其变体,或者

[0169] (iii) 与从属于(i)或(ii)的序列中的任意一个相同的氨基酸序列,不同之处在于从属于(i)或(ii)的所述序列中的1个、2个、3个、4个、5个或6个氨基酸被置换、缺失、插入,和/或化学修饰,而不失去所述模拟肽特异性连接抗-ApoA-I抗体的能力,或者

[0170] (iv) 从属于(i)、(ii)和/或(iii)中的两种氨基酸序列的任意组合;

[0171] 其中,所述模拟肽能够特异性连接抗-ApoA-I抗体。

[0172] 在一个实施方式中,上述模拟肽长度为20-55个、尤其是25-55个、更尤其是25-40个氨基酸。

[0173] 在另一个实施方式中,上述模拟肽长度为20-40个;21-40个;22-40个;23-40个;24-40个;25-40个;26-40个;27-40个;28-40个;或30-40个氨基酸。

[0174] 在另一个实施方式中,上述模拟肽长度为15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、41个、42个、43个、44个、45个、50个、55个、60个、65个、70个、75个或80个氨基酸。尤其是根据本发明的模拟肽具有17个、18个、22个、26个、28个、32个、37个、38个、39个、40个、42个、44个或55个氨基酸。

[0175] 在另一个实施方式中,本发明的模拟肽的N末端和/或C末端被进一步修饰,以分别去除自由氨基和/或羧基末端的可能的电荷。在一个具体实施方式中,所述肽的N末端的自由氨基共价连接于酰基(例如乙酰基、丙酰基、十六烷酰基等)。在另一个实施方式中,在所述肽的C末端的自由羧基被酰胺化。在一个进一步的实施方式中,模拟肽的N末端和C末端两者都被修饰,尤其是所述肽的N末端的自由氨基被共价连接到酰基(例如乙酰基、丙酰基、十六烷酰基等),并且所述肽的C末端的自由羧基被酰胺化。

[0176] 在一个具体实施方式中,根据本发明的所述模拟肽包括SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:23。

[0177] 在另一个实施方式中,所述模拟肽包括SEQ ID NO:5,其中SEQ ID NO:5的C末端部分的最后两个氨基酸E和N缺失。

[0178] 在一个具体实施方式中,根据本发明的模拟肽包括SEQ ID NO:5,或其变体,其中N末端的自由氨基被乙酰化和/或C末端的自由羧基被酰胺化,更具体地,其中N末端的自由氨基被乙酰化并且C末端的自由羧基被酰胺化。

[0179] 在一个具体实施方式中,根据本发明的模拟肽包括SEQ ID NO:21,或其变体,其中N末端的自由氨基被乙酰化和/或C末端的自由羧基被酰胺化,更具体地,其中N末端的自由氨基被乙酰化并且C末端的自由羧基被酰胺化。

[0180] 在一个具体实施方式中,根据本发明的模拟肽包括SEQ ID NO:23,或其变体,其中N末端的自由氨基被乙酰化和/或C末端的自由羧基被酰胺化,更具体地,其中N末端的自由氨基被乙酰化并且C末端的自由羧基被酰胺化。

[0181] 在一个具体实施方式中,所述模拟肽包括SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:25。

[0182] 在一个具体实施方式中,根据本发明的模拟肽包括SEQ ID NO:8,或其变体,其中N末端的自由氨基被乙酰化和/或C末端的自由羧基被酰胺化,更具体地,其中N末端的自由氨基被乙酰化并且C末端的自由羧基被酰胺化。

[0183] 在一个具体实施方式中,根据本发明的模拟肽包括SEQ ID NO:9,或其变体,其中N末端的自由氨基被乙酰化和/或C末端的自由羧基被酰胺化,更具体地,其中N末端的自由氨基被乙酰化并且C末端的自由羧基被酰胺化。

[0184] 在一个具体实施方式中,根据本发明的模拟肽包括SEQ ID NO:25,或其变体,其中N末端的自由氨基被乙酰化和/或C末端的自由羧基被酰胺化,更具体地,其中N末端的自由氨基被乙酰化并且C末端的自由羧基被酰胺化。

[0185] 根据另一方面,本发明提供根据本发明的模拟肽用作诊断组合物的应用。

[0186] 具体地,本发明提供根据本发明的模拟肽用于心血管疾病的诊断和/或预后。

[0187] 在另一个实施方式中,本发明提供根据本发明的模拟肽用作药物的应用。

[0188] 在另一个实施方式中,本发明提供根据本发明的模拟肽用于心血管疾病的治疗。

[0189] 根据另一个实施方式,提供了一种对于在生物流体样本中检测抗-ApoA-I抗体作为对于心血管疾病的生物标记物有用的免疫制剂,其包括至少一种根据本发明的模拟肽,或其变体。

[0190] 根据一个进一步的实施方式,提供了一种对于在生物流体样本中检测抗-ApoA-I抗体作为对于心血管疾病的生物标记物有用的免疫制剂,其包括至少一种根据本发明的模拟肽,或其变体。

[0191] 根据另一个实施方式,提供了一种根据本发明的免疫制剂用于包覆用于实施免疫检测的固体基质的应用。

[0192] 根据一个进一步的实施方式,提供了一种对于在生物流体样本中检测抗-ApoA-I抗体作为对于心血管疾病的生物标记物有用的免疫检测板,其包括与固体基质偶联和/或被包覆在固体基质上的至少一种根据本发明的模拟肽,或其变体。

[0193] 编码根据本发明的模拟肽的多核苷酸

[0194] 本发明的另一方面涉及编码根据本发明的模拟肽的分离的多核苷酸。

[0195] 在一个具体实施方式中,本发明涉及编码根据本发明的模拟肽的分离的多核苷酸,其中,内部交联是在所述模拟肽的氨基酸序列的两个不相邻的半胱氨酸残基之间的二硫桥。

[0196] 根据本发明的肽的制备和纯化

[0197] 本发明的另一方面提供了一种包括根据本发明的多核苷酸的重组载体。

[0198] 可以使用大量表达体系,包括但不限于染色体、附加体和衍生的病毒。更具体地,所用的重组载体可以衍生自细菌质粒、转座子、酵母附加体、插入元件、酵母染色体元件、病毒例如杆状病毒、乳头瘤病毒如SV40、牛痘病毒、腺病毒、福克斯痘病毒、假狂犬病病毒、逆转录酶病毒。

[0199] 这些重组载体同样可以为粘粒或噬菌粒衍生物。核苷酸序列可以通过本领域技术人员已知的方法插入重组表达载体,例如在MOLECULAR CLONING:ALABORATORY MANUAL, Sambrook et al.,4th Ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,2001中描述的方法。

[0200] 重组载体可包括调控多核苷酸表达的核苷酸序列以及允许本发明的多核苷酸的表达和转录以及本发明的多肽的翻译的核苷酸序列,这些序列根据所用的宿主细胞来选择。

[0201] 因此,例如可以将适宜的分泌信号整合入重组载体,以使得被本发明的多核苷酸编码的多肽将导向内质网的腔,导向细胞周质间隙,在膜上,或者导向细胞外环境。适宜的分泌信号的选择可促进后续的蛋白质纯化。

[0202] 在一个进一步的实施方式中,提供了包括根据本发明的重组载体的宿主细胞。

[0203] 将重组载体引入宿主细胞可以根据本领域技术人员已熟知的方法进行,例如在BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY,Davis et al.,2nd ed.,McGraw-Hill Professional Publishing,1995,and MOLECULAR CLONING:ALABORATORY MANUAL,supra中描述的方法,例如通过磷酸钙转染、通过DEAE右旋糖酐转染、转染、微注射、通过阳离子脂质体转染、电穿孔、转导或感染。

[0204] 宿主细胞可以例如为细菌细胞(例如大肠杆菌)、真菌的细胞(例如酵母细胞和曲霉属真菌、链霉菌属的细胞)、昆虫细胞、中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、C127小鼠细胞系、叙利亚地鼠细胞的BHK细胞系、人胚肾293(HEK 293)细胞。

[0205] 宿主细胞可以被用来例如表达本发明的模拟肽。通过标准方法纯化之后,本发明的肽可以用在下文描述的方法中。

[0206] 本发明的一个进一步的实施方式提供了用于制备根据本发明的肽的方法,包括在培养基中培养如上所述的宿主细胞,将所述肽从培养基或在宿主细胞裂解之后从宿主细胞裂解物中分离。当通过在两个半胱氨酸残基之间形成二硫桥来施行上述方法得到的肽的两个不相邻的氨基酸残基的内部交联,所述交联可以在所述肽的合成和纯化步骤期间进行或在一个进一步的独立的步骤进行。

[0207] 当根据本发明的肽的两个不相邻的氨基酸残基的内部交联通过内酰胺桥结合或通过形成烃连接进行,并且所述肽通过如上所述方法中的重组技术制备时,根据本发明的

模拟肽的制备可需要一个进一步的步骤,通过该步骤,肽的所述内部交联如所述地进行。

[0208] 或者,根据本发明的模拟肽可通过化学合成方法制备,例如固相肽合成。这些肽的纯化可通过本领域已知的用于肽/蛋白质纯化的任何技术来进行。示例性的技术包括离子交换色谱法、疏水相互作用色谱法和免疫亲和法。

[0209] 当在叔丁氧羰基(Boc)化学中进行,并在苄基甲基酯/氨基甲酸酯保护基团的基于20%哌啶调节的切割进行1小时之后在树脂上形成内酰胺桥时,根据本发明的肽的内部交联可使用正交保护(O-Fm和Fmoc)通过在所述肽的谷氨酸和赖氨酸残基之间形成内酰胺桥来进行。当在苄基氧羰基(Fmoc)化学中进行时,正交保护例如为O-烯丙基和烯丙氧羰基,并使用3倍过量的在CHCl₃/AcOH/NMM中的四三苯基膦化钾(0)剪切2小时而被裂解在树脂上。肽内酰胺环化可用3当量的Pyclock和9当量的DIEA施行2天,并用Kaiser茚三酮试验(Kaiser et al.,1970,Anal Biochem 34:595-598)来监测。

[0210] 在另一个实施方式中,根据本发明的肽的内部交联通过使用肽的关环复分解反应(RCM)形成烃连接来进行,其中在固相肽合成中链延伸期间,结合两个 α -甲基、 α -烯基氨基酸。在MBHA-Rink酰胺树脂上,用二氯(邻-异丙氧基苯亚甲基)(三环己基膦)合钨(II)作为催化剂在Fmoc保护的肽上进行RCM,如Kim et al.,2011(Nat Protoc 6:761-771)所述。根据本发明的模拟肽的最后的去保护(和乙酰化)和后续的从树脂切除可使用在实施例部分描述的方案进行。

[0211] 根据本发明的组合物和试剂盒

[0212] 本发明提供了一种包括根据本发明的模拟肽的组合物。

[0213] 根据一个实施方式,本发明提供了一种包括根据本发明的模拟肽的组合物用作诊断组合物或者用作免疫制剂。

[0214] 具体地,本发明提供了一种包括根据本发明的模拟肽的组合物用于心血管疾病的诊断和/或预后。

[0215] 在另一个实施方式中,本发明提供一种包括根据本发明的模拟肽的组合物(尤其是药物组合物)用作药物。

[0216] 本发明还提供了包括根据本发明的模拟肽的组合物用于心血管疾病的治疗。

[0217] 根据本发明的另一方面,提供了一种用于在生物流体样本中检测抗-ApoA-I抗体作为对于心血管疾病的生物标记物的试剂盒,所述试剂盒包括至少一种根据本发明的模拟肽,或其变体,或其组合。

[0218] 在一个具体的实施方式中,根据本发明的试剂盒包括至少一种模拟肽,其氨基酸序列包括SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24,和SEQ ID NO:18,或其变体中的任意一种。

[0219] 在另一个具体实施方式中,根据本发明的试剂盒包括至少一种模拟肽,其氨基酸序列包括SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9,或其变体中的任意一种。

[0220] 在另一个实施方式中,根据本发明的试剂盒包括至少一种模拟肽,其氨基酸序列包括SEQ ID NO:25。

[0221] 在另一个实施方式中,根据本发明的试剂盒包括至少一种模拟肽,其氨基酸序列包括SEQ ID NO:5,或其变体。

[0222] 具体地,所述至少一种模拟肽的氨基酸序列包括SEQ ID NO:5,其中SEQ ID NO:5的C末端部分的最后两个氨基酸E和N缺失。

[0223] 在另一个具体实施方式中,根据本发明的试剂盒包括至少一种模拟肽,其氨基酸序列包括SEQ ID NO:21。

[0224] 在另一个具体实施方式中,根据本发明的试剂盒包括至少一种模拟肽,其氨基酸序列包括SEQ ID NO:23。

[0225] 在再一个进一步的实施方式中,根据本发明的试剂盒包括选自于下列各项中的至少一项的模拟肽:

[0226] (i) 具有包括SEQ ID NO:19的氨基酸序列以及内部交联的模拟肽,所述内部交联是连接位点19处的谷氨酸(E)和位点23处的赖氨酸(K)的图2C的内酰胺桥;

[0227] (ii) 具有包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列以及内部交联的模拟肽,所述内部交联是连接位点16处的(R)-2-(7'-辛烯基)-丙氨酸和位点23处的(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸的图2B的烃连接;

[0228] (iii) 具有包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列以及内部交联的模拟肽,所述内部交联是连接位点13处的(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸和位点17处的(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸的图2B的烃连接;

[0229] (iv) 具有包括SEQ ID NO:17的氨基酸序列以及内部交联的模拟肽,所述内部交联是连接位点9处的(R)-2-(7'-辛烯基)-丙氨酸和位点16处的(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸的图2B的烃连接。

[0230] 在再一个进一步的实施方式中,根据本发明的试剂盒包括选自于下列各项中的至少一项的模拟肽:

[0231] (i) 具有包括SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:20的氨基酸序列的模拟肽;

[0232] (ii) 具有包括SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:24的氨基酸序列的模拟肽。

[0233] 根据一个进一步的方面,本发明涉及一种用于实施根据本发明的方法的试剂盒。

[0234] 根据本发明的试剂盒包括至少一种根据本发明的模拟肽或其变体,或用于偶联或已经偶联于如本文所述的作为固相支持物的固体基质的其组合物。

[0235] 可以使用多种固体基质,包括但不限于玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、硝化纤维、石英、陶瓷、右旋糖酐或其他材料。固体基质的适宜形式包括由这些材料形成或包覆这些材料的珠、微米颗粒、纳米颗粒、管、织物或板、膜、片、孔。通常此固体基质包括微量滴定孔,例如96孔微量滴定板。

[0236] 根据本发明的模拟肽偶联或固定到根据本发明的试剂盒中的固体基质可通过吸附或化学偶联到固相支持物上来实现。可以使用本领域中任何已知的用于将蛋白质或肽固定到固体支持物的方法。根据本发明的肽可以通过共价或非共价连接于固体基质,通过例如通过酰胺或酯连接的共价键连或吸附的技术。

[0237] 肽可以使用结合对来结合,例如生物素和亲和素或抗体和抗原。在将肽固定于固

体基质之后,可以用封闭液(包括封闭蛋白例如牛血清白蛋白)孵育固体基质,以降低测试样本中抗体对支持物表面的非特异性吸附。根据一个方面,根据本发明的模拟肽可以被直接合成到本发明的试剂盒的固体基质上。

[0238] 根据一个实施方式,当试剂盒包括至少一种根据本发明的模拟肽或其变体或其组合物用于与作为固相支持物的固体基质偶联时,所述试剂盒进一步任选地包括用于实施免疫检测的偶联剂和/或固体基质。

[0239] 根据另一个进一步的实施方式,根据本发明的试剂盒进一步包括至少一种用于在检测前洗涤未结合材料的清洗剂,以避免检测到背景噪音。清洗剂通常包括本领域已知的标准缓冲液。

[0240] 根据另一个进一步的实施方式,根据本发明的试剂盒进一步包括任选地与用于对检测到的抗-ApoA-I抗体进行定量的校准信息一起的至少一种对照样本。

[0241] 根据另一个实施方式,本发明提供了一种包括至少一种与作为固相支持物的固体基质偶联的根据本发明的模拟肽或其变体或其组合物的免疫测试板。

[0242] 根据本发明的应用和方法

[0243] 根据一个方面,本发明提供了一种用于检测哺乳动物主体的生物流体样本中的内源性抗-ApoA-I抗体的方法,包括以下步骤:

[0244] (a) 提供来自哺乳动物主体生物流体样本;

[0245] (b) 使所述生物流体样本与固体基质接触,其中至少一种根据本发明的模拟肽偶联至所述固体基质,其中,所述接触是在足以使得在所述生物流体样本中存在的抗-ApoA-I抗体通过抗原-抗体相互作用结合至至少一个模拟肽的条件下进行;

[0246] (c) 从所述固体基质的表面去除任何未结合的抗体;

[0247] (d) 检测结合到所述固体基质的抗原-抗体复合体的存在;

[0248] 其中,所述复合体的存在表示所述生物流体样本包括内源性抗-ApoA-I抗体。

[0249] 根据另一方面,本发明提供了用于从哺乳动物主体的生物流体样本检测心血管疾病的方法,其包括如下步骤:

[0250] (a) 提供来自哺乳动物主体生物流体样本;

[0251] (b) 使所述生物流体样本与固体基质接触,其中至少一种根据本发明的模拟肽偶联至所述固体基质,其中,所述接触是在足以使得在所述生物流体样本中存在的抗-ApoA-I抗体通过抗原-抗体相互作用结合至所述至少一个模拟肽的条件下进行;

[0252] (c) 从所述固体基质的表面去除任何未结合的抗体;

[0253] (d) 检测结合到所述固体基质上的抗原-抗体复合体的存在;

[0254] 其中,所述复合体的存在表示所述生物流体样本包含一种或多种与心血管疾病相关的抗-ApoA-I自身抗体。

[0255] 根据一个进一步的实施方式,提供了一种根据本发明的方法,其中,所述至少一种模拟肽的氨基酸序列包括选自于下列各项的氨基酸序列:SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24,和SEQ ID NO:18,和其任意变体。

[0256] 根据一个具体的实施方式,提供了一种根据本发明的方法,其中,所述至少一种模拟肽的氨基酸序列包括选自下列各项的氨基酸序列:SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9,和其任意变体。

[0257] 在一个具体的实施方式中,提供了一种根据本发明的方法,其中,所述至少一种模拟肽的氨基酸序列包括选自于SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9和其任意变体的氨基酸序列。

[0258] 在一个具体的实施方式中,提供了一种根据本发明的方法,其中,所述至少一种模拟肽的氨基酸序列包括氨基酸序列SEQ ID NO:25。

[0259] 在另一个具体的实施方式中,提供了一种根据本发明的方法,其中,所述至少一种模拟肽的氨基酸序列包括选自于SEQ ID NO:5和其任意变体、尤其是包括缺失SEQ ID NO:5的C末端部分的最后两个氨基酸E和N的SEQ ID NO:5的变体的氨基酸序列。

[0260] 在一个具体的实施方式中,提供了一种根据本发明的方法,其中,所述至少一种模拟肽的氨基酸序列包括氨基酸序列SEQ ID NO:21。

[0261] 在一个具体的实施方式中,提供了一种根据本发明的方法,其中,所述至少一种模拟肽的氨基酸序列包括氨基酸序列SEQ ID NO:23。

[0262] 根据另一个具体的实施方式,提供了一种根据本发明的方法,其中,所述至少一种模拟肽的氨基酸序列包括选自下列各项的氨基酸序列:SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:18,和其任意变体。

[0263] 根据一个进一步的实施方式,提供了一种根据本发明的方法,其中,所述至少一种模拟肽的氨基酸序列包括选自下列各项的氨基酸序列:SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,和其任意变体。

[0264] 根据一个进一步的实施方式,提供了一种根据本发明的方法,其中,所述至少一种模拟肽的氨基酸序列包括选自下列各项的氨基酸序列:SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:24,和其任意变体。

[0265] 根据再一个进一步的实施方式,提供了一种根据本发明的方法,其中,所述至少一种模拟肽包括下列各项的至少一种:

[0266] (i) 具有连接所述序列上位点19处的E和位点23处的K的图2C的内酰胺桥的氨基酸序列SEQ ID NO:19;

[0267] (ii) 具有连接所述序列上位点16处的(R)-2-(7'-辛烯基)-丙氨酸和位点23处的(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸的图2B的烃连接的氨基酸序列SEQ ID NO:15;

[0268] (iii) 氨基酸序列SEQ ID NO:16,并且从属于c)的内部交联为连接所述序列上位点13处的(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸和位点17处的(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸的图2B的烃连接;

[0269] (iv) 氨基酸序列SEQ ID NO:17,并且从属于c)的内部交联为连接所述序列上位点9处的(R)-2-(7'-辛烯基)-丙氨酸和位点16处的(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸的图2B的烃连接。

[0270] 根据再一个进一步的实施方式,提供了一种根据本发明的方法,其中,所述至少一种模拟肽包括以下各项中的任意一种:

[0271] (i) 氨基酸序列SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:24;

[0272] (ii) 氨基酸序列SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:20。

[0273] 根据再一个实施方式,提供了一种根据本发明的方法,其中,所述至少一种模拟肽由下列各项中的任意一种构成:

[0274] (i) 具有连接所述序列上位点19处的E和位点23处的K的图2C的内酰胺桥的氨基酸序列SEQ ID NO:19;

[0275] (ii) 具有连接所述序列上位点16处的(R)-2-(7'-辛烯基)-丙氨酸和位点23处的(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸的图2B的烃连接的氨基酸序列SEQ ID NO:15;

[0276] (iii) 从属于b)的氨基酸序列包括SEQ ID NO:16,并且从属于c)的内部交联为连接所述序列上位点13处的(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸和位点17处的(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸的图2B的烃连接;

[0277] (iv) 从属于b)的氨基酸序列包括SEQ ID NO:17,并且从属于c)的内部交联为连接所述序列上位点9处的(R)-2-(7'-辛烯基)-丙氨酸和位点16处的(S)-2-(4'-戊烯基)-丙氨酸的图2B的烃连接。

[0278] 根据再一个进一步的实施方式,提供了一种根据本发明的方法,其中,所述至少一种模拟肽由以下各项中的任意一种构成:

[0279] (i) 氨基酸序列SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24;或其变体;

[0280] (ii) 氨基酸序列SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20;或其变体。

[0281] 根据再一个进一步的实施方式,提供了一种根据本发明的方法,其中,将所述生物流体样本与步骤(b)下的所述固体基质接触,其中至少一种模拟肽或其变体偶联于所述固体基质。

[0282] 根据另一个进一步的实施方式,提供了一种根据本发明的方法,其中,所述方法进一步包括将检测步骤(d)获得的信号与对至少一个对照样本获得的同样的信号进行比较,其中,对所述至少一个对照样本获得的信号在对所述生物流体样本的检测步骤(d)之前、同时或之后获得。

[0283] 在步骤(d)下检测捕获的/结合的抗体可以通过本领域已知的任何适宜的在表面检测捕获的抗体或蛋白质的方法,例如光学检测(例如ELISA)、质量变化检测(例如表面等离子体共振、质谱)、电检测(例如全电阻光谱学、电化学)方法来施行。

[0284] 检测的结果可以是定性的或定量的。与固体基质结合的被捕获的/结合的抗体的量可以与阳性和阴性对照比较。对照通常与被检测的样本同时进行操作。阳性对照可以是包括与ApoA-I具有免疫反应性的抗体的血清或溶液。阴性对照可以是不含与ApoA-I具有免疫反应性的抗体的血清或溶液。为了定量,可以产生和/或使用已知量的抗-ApoA-I抗体的校准曲线。用作阳性对照的抗体可以使用ApoA-I的氨基酸序列的全部或片段来制备。

[0285] 可以用不同方法来实现与正常健康的生物流体样本的比较。根据一个实施方式,其可以通过包括与非疾病性的血样的对照反应来实现。根据另一个实施方式,其可以通过使用对于来自健康主体的典型生物流体样本的内源性抗-ApoA-I抗体的浓度的值来实现。典型地,对研究中的样本中存在的内源性抗-ApoA-I抗体的水平的比较可以相对于在每个

单个测试步骤中确定的值或相对于预定值来进行。预定值可以针对总体的测试步骤来确定,或者该值同样可以仅对特定批次的测试试剂有效。例如,参考值可以仅对被限定的校准期间有效,或者可以在校准测试步骤时重新限定。

[0286] 根据本发明的方法、试剂盒和应用可适用于筛选目的,以及用于诊断目的,并可应用于初级诊断以及在治疗期间或之后的病程的监测。

[0287] 尤其是,根据本发明的方法、试剂盒和应用可以适用于:

[0288] i) 在患有急性胸痛的病人中用于诊断目的,以排除或划入心肌缺血,以此诊断急性冠脉综合征,

[0289] ii) 在患有急性胸痛、急性冠脉综合征、风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、颈动脉重度狭窄、晚期肾病或牙周炎的病人中用于预后以及(如果有可能)治疗的目的,因为本发明能够鉴定出对具有高心血管风险的病人的子集,因此能够鉴定出可以从目标为逆反抗-ApoA-I抗体的有害影响的特定疗法(如本文中所述)中受益的病人的子集。

[0290] 前述诊断、预后和治疗目的可以用于一级预防以及二级预防。

[0291] 根据本发明的方法、试剂盒和应用尤其还可适用于确定患有急性胸痛、急性冠脉综合征、风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、颈动脉重度狭窄、晚期肾病或牙周炎的病人能否从预防或治疗心血管疾病的疗法受益,例如包括施用至少一种根据本发明的模拟肽的方法;对于所述病人并没有观察到通常的心血管风险因素(包括吸烟、喝酒、高血压、高胆固醇、肥胖、体能活动不足和不健康的饮食)。

[0292] 本文所述的预后和/或诊断测验可用于确定主体是否能够从施用用于预防和/或治疗心血管疾病的试剂(例如药物)中受益。例如,该测验可用于确定施用适用于治疗心血管疾病的的治疗剂(例如ApoA-I、根据本发明的模拟肽、静脉注射免疫球蛋白(IVIG)或依普利酮)是否对主体有益。静脉注射免疫球蛋白(IVIG)是静脉注射施用的血产品。其包括从超过一千个供血者的血浆中提取的合并的、多价的IgG免疫球蛋白。通常,IVIG的剂量取决于指征。对于原发性免疫功能紊乱,每3-4周施用100-400mg/kg体重。对于神经性和自身免疫疾病,每月在一个5天周期施用2克每千克体重,持续3-6个月。然后,接着进行每3-4周使用100-400mg/kg体重的维持治疗。

[0293] 依普利酮(IUPAC系统命名:(7 α ,11 α ,17 α)-9,11-环氧-17-羟基-3-氧代孕甾-4-烯-7,21二羧酸 γ -内酯甲酯)是在慢性心衰竭的管理中用作辅药的醛固酮拮抗剂。其特异性地针对在心肌梗塞之后的病人中降低心血管风险的市场。因此,本发明的另一方面是一种确定主体(尤其是患有急性胸痛、急性冠脉综合征、风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、颈动脉重度狭窄、晚期肾病或牙周炎的主体)能否从施用用于预防和/或治疗心血管疾病的的治疗剂中受益。

[0294] 本发明的另一方面是一种在治疗期间或治疗后在主体中监测心血管疾病的病程的方法。出于此目的,在主体的生物样本中对抗-ApoA-I抗体的检测可以在来自经受治疗之前、期间或之后的主体的生物样本确定。在治疗后被检测的抗-ApoA-I抗体的量降低表示主体可以进一步通过同样的疗法治疗。在治疗后没有抗-ApoA-I抗体表示治疗可以被中断或以更低的频率和/或更低的剂量继续。

[0295] 从上述测验的实践中获得的信息在疾病和影响个体的健康状态的其他有害症状的预测、鉴定发展和临床管理方面有用。该信息更具体地有助于临床医师设计治疗心血管

疾病的疗法或其他治疗方法,尤其是在患有急性胸痛、急性冠脉综合征、风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、颈动脉重度狭窄、晚期肾病或牙周炎的病人的子集中。

[0296] 在本发明的另一个方面,提供了用于在需要其的主体中预防和/或治疗心血管疾病或失调的方法,包括对所述主体施用根据本发明的模拟肽,或其药物制剂。

[0297] 在本发明的另一个方面,提供了用于在需要其的主体中预防和/或治疗心血管疾病或失调的方法,包括施用根据本发明的模拟肽的三维结构类似物。

[0298] 在本发明的上下文中,模拟肽的三维结构类似物可以为任何化学分子,尤其是在化学图书馆中找到的或被设计而展示出与所述模拟肽的三维结构类似的三维结构的任何小分子。

[0299] 在一个具体的实施方式中,本发明提供了用于在主体中预防和/或治疗心血管疾病的方法,包括对已通过根据本发明的方法诊断为具有内源性抗-ApoA-I抗体的主体施用下列各项的至少一种:(i) 根据本发明的模拟肽,或其药物制剂,(ii) 根据本发明的模拟肽的三维结构类似物,(iii) 包括ApoA-I的药物组合物,和(iv) 适用于预防和/或治疗心血管疾病的制剂,例如静脉注射免疫球蛋白或依普利酮。

[0300] 在一个具体的实施方式中,上述方法用于患有急性胸痛、急性冠脉综合征、风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、颈动脉重度狭窄、晚期肾病或牙周炎的主体。

[0301] 在一个进一步的实施方式中,根据本发明的用于预防和/或治疗心血管疾病的方法施用在患有急性胸痛、急性冠脉综合征、风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、颈动脉重度狭窄、晚期肾病或牙周炎的主体中,所述主体已通过根据本发明的方法被诊断为具有内源性抗-ApoA-I抗体。

[0302] 在再一个进一步的实施方式中,主体并不表现通常观测到的心血管风险因素,例如吸烟、喝酒、高血压、高胆固醇、肥胖、体能活动不足和不健康的饮食。

[0303] 在另一方面,本发明提供了根据本发明的模拟肽用于制备药物,尤其是用于制备用于预防和/或治疗心血管疾病的药物。在一个进一步的方面,本发明提供了根据本发明的模拟肽用于制备诊断组合物或免疫测验制剂的应用,尤其是用于诊断心血管疾病。

[0304] 施用方式

[0305] 根据本发明的化合物、其组合物(尤其是药物组合物)和制剂可以以任何方式施用,包括口服、肠胃外、静脉注射、皮下、直肠或其组合的方式施用。肠胃外施用包括但不限于静脉注射、动脉内、腹膜内、皮下、皮内和肌内施用。本发明的组合物还可以以移植物的形式施用,其允许组合物的缓慢释放,以及缓慢的受控的静脉内输液。

[0306] 尤其是,根据本发明的化合物、其组合物(尤其是药物组合物)和制剂皮下施用。

[0307] 在本发明的一个实施方式中,本发明的组合物的施用要求多次连续注射。

[0308] 在本发明的一个具体的实施方式中,药物组合物可重复或连续施用。药物组合物可在至少1、2、3或4周;2、3、4、5、6、8、10或12个月;或2、3、4或5年的期间重复或连续地施用。

[0309] 联合

[0310] 根据本发明,根据本发明的模拟肽或其药物组合物可单独施用,或者与在预防和/或治疗心血管疾病方面有用的助剂联合施用。

[0311] 在另一个实施方式中,药物组合物可以与在预防或治疗心血管疾病方面有用的另一种治疗剂一起施用,例如阿司匹林、 β 受体阻滞剂、血管紧张素转换酶抑制剂和他汀类药

物。

[0312] 本发明包括施用根据本发明的模拟肽,其中在施用在预防和/或治疗心血管疾病方面有用的其他治疗剂或助剂之前、同时或随后以治疗有效量施用模拟肽(例如多药物治疗)。与所述助剂同时施用的根据本发明的模拟肽可以以相同或不同的组合物,以相同或不同的施用方式施用。

[0313] 病人

[0314] 在一个实施方式中,根据本发明的病人是患有心血管疾病或者被怀疑患有此疾病的病人。

[0315] 在一个具体的实施方式中,根据本发明的病人因急性胸痛进入急诊部门。

[0316] 在另一个实施方式中,根据本发明的病人是因急性胸痛进入急诊部门和在根据本发明的预后和/或诊断测验之后已被诊断为患有心血管疾病的病人。

[0317] 在再一个实施方式中,根据本发明的病人是患有急性胸痛、急性冠脉综合征、风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、颈动脉重度狭窄、晚期肾病或牙周炎的病人。

[0318] 在再一个进一步的实施方式中,根据本发明的病人并没有表现出通常观测到的心血管风险因素,例如吸烟、喝酒、高血压、高胆固醇、肥胖、体能活动不足和不健康的饮食。

[0319] 在一个进一步的实施方式中,根据本发明的病人是患有急性胸痛、急性冠脉综合征、风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、颈动脉重度狭窄、晚期肾病或牙周炎的病人,其在根据本发明的预后和/或诊断测验之后已被诊断为患有心血管疾病。

[0320] 本文中引用的参考文献全文通过引用结合到本文中。本发明并不局限于本文中所所述的、意在作为本发明的单个方面的个别阐述的具体的实施方式,并且功能上等价的方法和化合物属于本发明的范围内。事实上,除了本文中显示和描述的,本发明的多种变动将基于前述描述和附图而对于本领域技术人员来说是显而易见的。这些变动意在落入所附的权利要求书的范围内。

[0321] 本发明已被描述,下列实施例以阐述而非限定的方式呈现。

[0322] 实施例

[0323] 下列缩略语分别是指下列含义:

[0324] aa(氨基酸);AUC(曲线下的区域),h(小时), μ l(微升), μ M(微摩尔),mM(毫摩尔),mg(毫克),min(分钟),nm(纳米),BSA(牛血清白蛋白),CI(置信区间),CH₂Cl₂(二氯甲烷),DIPEA(二异丙基乙胺),DMF(二甲基甲酰胺),EDTA(乙二胺四乙酸),HCTU(2-(6-氯-1-H-苯并三氮唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脒六氟磷酸酯),HoBt(N-羟基-苯并三唑),OR(比值比),PBS(磷酸盐缓冲液),PyBOP(六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基-三-吡咯烷基),PyClock(六氟磷酸6-氯-苯并三唑-基-氧基-三-吡咯烷基),TFA(三氟乙酸),TIS(三异丙基硅烷)。

[0325] 材料和方法

[0326] 肽合成

[0327] 用于天然化学连接的直链肽、C末端硫酯衍生物(Dawson et al,1994, Science266:776-779)和某些内酰胺桥类似物(F3L1)通过使用基于Boc的Merrifield固相肽合成在适用于Boc化学的ABI 433A肽合成仪上合成(Wilken and Kent,1998,Curr Opin Biotechnol 9:412-426)。用氟化氢施行从树脂的切割。对于内酰胺桥结合,正交保护(O-Fm和Fmoc)分别用于Glu和Lys,在进行20%哌啶基调节的苄基甲基酯/氨基甲酸酯保护基团切

割1小时之后在树脂上形成内酰胺桥。肽内酰胺环化用3当量的Pyclock和9当量的DIEA进行2天,并用Kaiser茚三酮测试(Kaiser et al.,1970,Anal Biochem 34:595-598)监测。

[0328] 肽EF (Ala¹⁹⁰-Thr²⁴²Apo-I即残基53) 的长度使得通过两个片段 (Ala¹⁹⁰-Arg²¹⁵和Gln²¹⁶-Thr²⁴²) 来合成是必要的,其通过天然化学连接来组装(Dawson et al,1994,Science 266:776-779)。由于此方法要求N末端Cys在C末端片段上,有必要在Apo-I序列中用Cys残基替代Gln²¹⁶。在合成步骤之后,此残基被碘乙酰胺烷基化以产生Gln类似物(侧链CH₂-S-CH₂-CONH₂而不是CH₂-CH₂-CONH₂)。此外,由于肽的末端通过二硫桥环化,Cys (Acm) 残基被加入到Ala¹⁹⁰-Arg²¹⁵的N末端和Gln²¹⁶-Thr²⁴²的C末端。在连接产物的烷基化之后,其被HgOAc去保护,并被H₂O₂氧化。当使用20当量的H₂O₂在pH7.0的条件下进行30分钟,随后立即通过RP-HPLC纯化时,获得环化的最好结果。

[0329] 也可以使用基于Fmoc的固相合成产生具有内酰胺桥的一些直链肽。在此情况下,对谷氨酸和赖氨酸残基使用一对正交保护基团(烯丙基/烯丙氧羰基)。在肽环化之前,根据Kates等人(30)的方法,用CHCl₃-AcOH-N-甲基吗啉(37:2:1)中的3当量的Pd(PPh₃)₄去除这些保护基团2小时。

[0330] 用Prelude合成仪(Protein Technologies Inc.,图森,美国)在MBHA-Rink酰胺树脂(0.56mmol/g载量)上使用标准的Fmoc化学以100μmol的规模合成所有的肽连接的肽。肽延伸的一个循环由下列步骤构成:(i)先用DMF洗涤装载的树脂(3*30秒),用20%哌啶/DMF去除末端Fmoc保护基团(2*10min);(ii)然后用DMF洗涤去保护的树脂(6*30秒),用包括5当量的合适的Fmoc氨基酸、5当量的HCTU和10当量的DIPEA的溶液处理30分钟;(iii)然后用NMP洗涤树脂3次(3*30s),在用DMF中的10%v/v的无水醋酸处理时未反应的氨基酸被乙酰化(1*10min),用DMF洗涤加帽的树脂(6*30s)。重复这些步骤直至肽序列完整。

[0331] α-甲基、α-烯基甘氨酸的偶联如前人所述(Kim et al,2011,Nat Protoc6:761-771)、稍加修改地人工实施。去保护的树脂用包括2当量的氨基酸、2当量的Pyclock和4当量的DIPEA的溶液处理超过2小时。如果有必要进行两次偶联则重复此步骤。序列中的下列氨基酸也在用包括5当量的氨基酸、5当量的PyCLOCK和15当量的DIEA的溶液的超过1小时的两步偶联步骤中被人工加入。

[0332] 一旦去除了最后的Fmoc保护基团,用DMF中的10%(v/v)无水乙酸和1%(v/v)DIPEA处理树脂,以产生乙酰加帽的N末端。随后用DMF(5*30s)和CH₂Cl₂(5*30s)洗涤树脂,真空干燥20分钟,然后用在TFA中的包括2.5%(v/v)水、2.5%(v/v)三异丙基硅烷和5%苯酚的剪切溶液处理90分钟。

[0333] 关环复分解反应

[0334] 包括烯族氨基酸衍生物的所有肽的关环复分解反应(RCM)用二氯(邻-异丙氧基苯亚甲基)(三环己基膦)合钨(II)作为催化剂在MBHA-Rink酰胺树脂上在Fmoc保护的肽上进行,如所述Kim et al.,2011(Nat Protoc 6:761-771)。用DCM和DCE连续洗涤树脂,用DCE中的Grubbs'第一代催化剂的6mM溶液(4.9mg/ml,0.2当量,相对于树脂替代物)处理超过2小时,其伴随着通过溶液的低但连续的氮气气泡。重复RCM两次。当从树脂切掉小的样本时,复分解反应的过程通过HPLC和ESI-MS监测。最后的去保护(和乙酰化)和肽从树脂的后续切除使用上述方案实施。

[0335] 肽纯化和分析

[0336] 质谱在微质平台LCZ质谱仪上获得。分析反相高压液相色谱法 (HPLC) 在连接有214nm的UV检测器的Waters 2795HPLC模块上实施,其使用Phenomenex-Aeris widepore, 3.6 μ m XB C8,4.6mm x 150mm柱。制备型HPLC在连接有2487UV检测器的Delta 600模块上实施,其使用Vydac C8柱(250 \times 22mm i.d.,10 μ m颗粒尺寸)。洗脱液是0.1%TFA水溶液和乙腈:水(9:1,v:v)中的0.1%TFA。

[0337] 每次合成的产率先用对粗反应混合物的HPLC和的ESI-MS分析进行评估。然后通过反相HPLC纯化肽至均相。通过分析性HPLC和质谱评估纯化的肽的一致性和纯度。

[0338] 筛选来自具有或不具有抗-ApoA-I自身抗体的急性胸痛病人的血清

[0339] 与前人发表的涉及138名患有急性胸痛进入急诊部门(ED)的病人的研究(Keller et al,2012,J Intern Med 271:451-462)中描述同样地使用血清样本。本研究的目标是确定在ED收集的刚好第一个血浆样本的抗-ApoA-I的IgG免疫反应的诊断准确度,用于(i)非ST段抬高性心肌梗死(NSTEMI)和(ii)后续的肌钙蛋白I提高。样本收集和处理的细节、末端定义和包括/排除标准在Keller et al(2012,J Intern Med 271:451-462)中描述。由于六个病人的材料短缺,对于肽的分析在来自于剩余的132个病人的样本上进行。

[0340] 病人血清酶联免疫吸附实验(ELISA)

[0341] 通过如前人所描述(Vuilleumier et al,2010,Eur Heart J 31:815-823)的ELISA测定病人血清的免疫反应性。简而言之,在37 $^{\circ}$ C下用纯化的、来源于人的去脂ApoA-I(20 μ g/mL;50 μ L孔)或合成的ApoA-I衍生肽(20 μ g/mL;50 μ L孔)覆盖Maxisorp酶标板(NuncTM,罗斯基勒,丹麦)一小时。洗涤后,在37 $^{\circ}$ C下用含有2%BSA的PBS封闭孔1小时。然后,将1/50稀释的重复的血清样本加入孔中并孵育1小时。还将血清样本加入未覆盖的孔中,以评估单个非特异性结合。洗涤六次之后,将(50 μ L孔)在PBS/BSA中的1/1000稀释的碱性磷酸酶结合的抗人IgG(Sigma-Aldrich,St Louis,MO,美国)加入孔并在37 $^{\circ}$ C孵育1小时。再洗涤六次之后,通过加入溶解于二乙醇胺缓冲液(pH9.8)的碱性磷酸酶底物对硝基苯酚磷酸二钠(Sigma-Aldrich)来发展。在37 $^{\circ}$ C孵育20分钟之后,使用读板仪(Molecular Devices Versa MaxTM;Molecular Device,森尼维耳市,加利福尼亚州,美国)来确定ELISA信号(吸光度OD_{405nm})。对于每个样本,从平均吸光度减去相应的非特异性结合。

[0342] 还实施使用被选的合成肽的竞争ELISA实验。合成肽(以不同的浓度溶解在含有2%牛血清白蛋白(BSA)的PBS中)与包括高水平的抗-ApoA-I IgG的病人血清在室温下共孵育2小时,之后在发展上述实验之前,加入到上述载有纯化的、衍生于人的去脂ApoA-I的孔中。

[0343] 统计分析

[0344] 使用statisticaTM软件(StatSoft,Tulsa,OK,美国)进行分析。在合适的地方使用Fisher双边精确测试(Fisher's bilateral exact test)和曼惠特尼U检验(Mann Whitney U-test)。不同肽的免疫反应之间的结合和研究端点作为比值比(OR)和相应的95%置信区间(95%CI)呈现。逻辑回归的多变量分析被用于评估变量之间的关联性。在该模型中,端点作被设置成独立的变量,并且NSTEMI-TIMI评分(Antman et al,2000,JAMA 284:835-842)(允许在单个连续变量中在14天中调整病人结果的主要CV决定因素)被设置为唯一的混杂因素,因为样本大小有限。对Excel使用analyse-itTM软件(Microsoft,Redmond,WA,美国)进行ROC分析。曲线下面积(AUC)比较根据DeLong等人(1988,Biometrics 44:837-845)提出的

非参数方法进行。

[0345] 基于细胞的实验:抗-ApoA-I IgG相关的促炎反应

[0346] 人单核细胞衍生的巨噬细胞 (HMDM) 通过如前人所述 (Pagano et al, 2012, J Intern Med) 地用干扰素 (IFN)- γ 处理人单核细胞24小时来获得。然后用递增浓度 (5-40 μ g/ml) 的多克隆抗人ApoA-I (Academy Bio-Medical Company, Houston, TX, 美国) 或对照抗体 (Meridian Life Science, Saco, ME, 美国) 在96孔板中刺激HMDM24小时, IgG来自池+或池- (500 μ g/ml)。在该模型中, 无LPS的抗-ApoA-IIgG已显示出以剂量依赖的方式促进TNF- α 和IL-6的产生, 最佳刺激在40 μ g/ml (Pagano et al, 2012, J Intern Med)。

[0347] 对于竞争抑制实验, 在室温下将合成肽与40 μ g/ml的多克隆抗-ApoA-I IgG一起共孵育2小时, 之后加到96孔板中的HMDM, 随后使用Luminex MAP™ Technology评估细胞上清液中的IL-6和TNF- α 的水平。实验用来自三个不同的供者的血液进行。

[0348] 基于细胞的实验:抗-ApoA-I IgG相关的变时反应

[0349] 新生大鼠心室心肌细胞 (NRVC) 通过用低胰蛋白酶-EDTA和2型胶原酶消化而从1-2天大小的Wistar小鼠的心室分离。将动物通过无麻醉、止痛或施用神经肌肉阻碍剂的斩首来处死, 与NIH出版的Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (出版物85-23) 和当地县的兽医局的授权 (1012/3134/0-R) 一致。将新鲜分离的细胞种在塑料瓶中, 以使得心肌成纤维细胞能够选择性吸附。随后将心肌细胞从瓶内倒出, 分散于铝箔包覆的90mm培养皿中。

[0350] 培养1-2天之后, 将细胞在时间间隔中用适宜浓度的单克隆抗-ApoA-I IgG (Abcam, Nottingham, 英国) 或者无血清DMEM中的载体孵育。自动收缩的小细胞单层的搏动频率在预孵育期的末尾 ($t=0$) 以及在多种物质的添加之后的不同时间被立即确定。频率确定是通过技术员 (不清楚实验条件) 使用光学显微镜计数在培养皿的三个不同地方每时间单位内收缩的数量来进行。细胞收缩的规律性之前已通过用荧光钙探针监测无细胞溶质的钙波动来评价 (Maturana et al, 2009, Endocrinology 150:3726-3734)。由于之前已证明在10微克/毫升达到抗-ApoA-IIgG的最大变时效果 (Vuilleumier et al, 2010, Eur Heart J 31:815-823), 抗体的该浓度被保持在所有实验中。合成肽的竞争抑制实验用同样的实验条件进行。在室温下将合成肽与10微克/毫升的单克隆抗-ApoA-I (Abcam, Nottingham, 英国) 共同孵育2小时, 随后将其加入培养皿中的NRVC, 如上所述确定搏动频率。

[0351] 用于确定螺旋含量的CD光谱

[0352] 在20摄氏度下从185nm至240nm的圆二色性 (CD) 光谱从Jasco J-815分光偏振仪收集。通过将冻干的肽溶解在水中的25%三氟乙醇中来获得2mM的浓度而制备典型的样品, 然后将该溶液在水中稀释20倍, 并载入石英比色皿 (0.2cm路径长度) 中。从实验光谱中减去在水中的1.25%的TFE的底线CD光谱。通过计算波长222nm处的平均残基椭圆率 (θ)_{mrw, λ} 来对数据进行标准化。

[0353] 实施例1:根据本发明的模拟肽的例子

[0354] 描述于下表3的模拟肽如前面材料与方法部分所述地合成, 并进一步通过质谱表征。

[0355] 表3. 根据本发明的模拟肽和其氨基酸序列的例子

[0356]

Ac-VKDLXaaTVYVDVXaaKDSGRDYVSQFEGSAL-NH ₂ (SEQ ID NO: 10, 其中位点 5 处的 Xaa 被置换成式 (I) 的经修饰过的丙氨酸: -NH-C(CH ₃)(R)-C(O)-, 其中 R 是连接于位点 12 处的后续 Xaa 的烃连接 -(CH ₂) ₆ -CH=CH-(CH ₂) ₃ -, 并且其中位点 12 处的 Xaa 是式 (I) 的经修饰过的丙氨酸: -NH-C(CH ₃)(R')-C(O)-, 其中 R' 是连接于来自如上限定的位点 5 处的 Xaa 的烃连接的单键) 在 N 末端的自由氨基被乙酰化, 在 C 末端的自由羧基被酰胺化	A1S2
--	------

[0357]

Ac-DSVTSTXaaSKLREQXaaGPVTQEFWDNLEKETEG-L-NH ₂ (SEQ ID NO: 11, 其中位点 7 处的 Xaa 是式 (I) 的经修饰过的丙氨酸: -NH-C(CH ₃)(R)-C(O)-, 其中 R 是连接于位点 14 的后续 Xaa 的烃连接 -(CH ₂) ₆ -CH=CH-(CH ₂) ₃ -, 并且其中位点 14 处的 Xaa 是式 (I) 的经修饰过的丙氨酸: -NH-C(CH ₃)(R')-C(O)-, 其中 R' 是连接于来自如上限定的位点 7 处的 Xaa 的烃连接的单键) 在 N 末端的自由氨基被乙酰化, 在 C 末端的自由羧基被酰胺化	B1S2
Ac-YLDDFQKKWQEEEXaaELYRQKXaaEPLRAELQEGARQKLHEL-NH ₂ (SEQ ID NO: 12, 其中位点 13 处的 Xaa 是式 (I) 的经修饰过的丙氨酸: -NH-C(CH ₃)(R)-C(O)-, 其中 R 是连接于位点 20 处的后续 Xaa 的烃连接 -(CH ₂) ₆ -CH=CH-(CH ₂) ₃ -, 并且其中位点 20 处的 Xaa 是式 (I) 的经修饰过的丙氨酸: -NH-C(CH ₃)(R')-C(O)-, 其中 R' 是连接于来自如上限定的位点 13 处的 Xaa 的烃连接的单键) 在 N 末端的自由氨基被乙酰化, 在 C 末端的自由羧基被酰胺化	C1S2
Ac-EEMRDRARAHXaaDALRTHXaaAPYSDELQRRLAARLEALKEN-NH ₂ (SEQ ID NO: 13, 其中位点 11 处的 Xaa 是式 (I) 的经修饰过的丙氨酸: -NH-C(CH ₃)(R)-C(O)-, 其中 R 是连接于位点 18 处的后续 Xaa 的烃连接 -(CH ₂) ₆ -CH=CH-(CH ₂) ₃ -, 并且其中位点 18 处的 Xaa 是式 (I) 的经修饰过的丙氨酸: -NH-C(CH ₃)(R')-C(O)-, 其中 R' 是连接于来自如上限定的位点 11 处的 Xaa 的烃连接的单键) 在 N 末端的自由氨基被乙酰化, 在 C 末端的自由羧基被酰胺化	D1S2A
Ac-ATEHXaaSTLSEKXaaKPALED-NH ₂ (SEQ ID NO: 14, 其中位点 5 处的 Xaa 是式 (I) 的经修饰过的丙氨酸: -NH-C(CH ₃)(R)-C(O)-, 其中 R 是连接于位点 12 处的后续 Xaa 的烃连接 -(CH ₂) ₆ -CH=CH-(CH ₂) ₃ -, 并且其中位点 12 处的 Xaa 是式 (I) 的经修饰过的丙氨酸: -NH-C(CH ₃)(R')-C(O)-, 其中 R' 是连接于来自如上限定的位点 5 处的 Xaa 的烃连接的单键) 在 N 末端的自由氨基被乙酰化, 在 C 末端的自由羧基被酰胺化	E1S2
Ac-GLLPVLESFKVSFLSALEXaaYTKXaaLNT-NH ₂ (SEQ ID NO: 19, 其中位点 19 处的 Xaa 是式 (I) 的经修饰过的氨基酸: -NH-C(H)(R)-C(O)-, 其中 R 是连接于位点 23 处的后续 Xaa 的内酰胺桥 -(CH ₂) ₂ -CO-NH-(CH ₂) ₄ -, 并且其中位点 23 处的 Xaa 是式 (I) 的经修饰过的氨基酸: -NH-C(H)(R')-C(O)-, 其中 R' 是连接于来自如上限定的位点	F3L1

[0358]

19 处的 Xaa 的内酰胺桥的单键) 在 N 末端的自由氨基被乙酰化, 在 C 末端的自由羧基被酰胺化	
Ac-GLLPVLESFKVSFLS <u>Xaa</u> LEEYTK <u>Xaa</u> LNT-NH ₂ (SEQ ID NO: 15, 其中位点 16 处的 Xaa 是式 (I) 的经修饰过的丙氨酸: -NH-C(CH ₃)(R)-C(O)-, 其中 R 是连接于位点 23 处的后续 Xaa 的烃连接 -(CH ₂) ₆ -CH=CH-(CH ₂) ₃ -, 并且其中位点 23 处的 Xaa 是式 (I) 的经修饰过的丙氨酸: -NH-C(CH ₃)(R')-C(O)-, 其中 R' 是连接于来自如上限定的位点 16 处的 Xaa 的烃连接的单键) 在 N 末端的自由氨基被乙酰化, 在 C 末端的自由羧基被酰胺化	F3S2A
Ac-GLLPVLESFKVS <u>Xaa</u> LSA <u>Xaa</u> EEYTKKLNT-NH ₂ (SEQ ID NO: 16, 其中位点 13 处的 Xaa 是式 (I) 的经修饰过的丙氨酸: -NH-C(CH ₃)(R)-C(O)-, 其中 R 是连接于位点 17 处的后续 Xaa 的烃连接 -(CH ₂) ₃ -CH=CH-(CH ₂) ₃ -, 并且其中位点 17 处的 Xaa 是式 (I) 的经修饰过的丙氨酸: -NH-C(CH ₃)(R')-C(O)-, 其中 R' 是连接于来自如上限定的位点 13n 处的 Xaa 的烃连接的单键) 在 N 末端的自由氨基被乙酰化, 在 C 末端的自由羧基被酰胺化	F3S1B
Ac-VLESFKVS <u>Xaa</u> LSALEE <u>Xaa</u> TKKLNT-NH ₂ (SEQ ID NO: 17, 其中位点 9 处的 Xaa 是式 (I) 的经修饰过的丙氨酸: -NH-C(CH ₃)(R)-C(O)-, 其中 R 是连接于位点 16 处的后续 Xaa 的烃连接-(CH ₂) ₆ -CH=CH-(CH ₂) ₃ -, 并且其中位点 16 处的 Xaa 是式 (I) 的经修饰过的丙氨酸: -NH-C(CH ₃)(R')-C(O)-, 其中 R' 是连接于来自如上限定的位点 9 处的 Xaa 的烃连接的单键) 在 N 末端的自由氨基被乙酰化, 在 C 末端的自由羧基被酰胺化	F4S2B
Ac-VLESFKVSFLSALE <u>Xaa</u> YTK <u>Xaa</u> LNT-NH ₂ (SEQ ID NO: 20, 其中位点 15 处的 Xaa 是式 (I) 的经修饰过的氨基酸: -NH-C(H)(R)-C(O)-, 其中 R 是连接于位点 19 处的后续 Xaa 的内酰胺桥-(CH ₂) ₂ -CO-NH-(CH ₂) ₄ -, 并且其中位点 19 处的 Xaa 是式 (I) 的经修饰过的氨基酸: -NH-C(H)(R')-C(O)-, 其中 R' 是连接于来自如上限定的位点 15 处的 Xaa 的内酰胺桥的单键) 在 N 末端的自由氨基被乙酰化, 在 C 末端的自由羧基被酰胺化	F4L1
*CAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLR <u>Xaa</u> GLLPVLESFKVSFLSALE <u>Xaa</u> YTK <u>Xaa</u> LNTC-NH ₂ (SEQ ID NO: 18, 其中位点 28 处的 Xaa 是具有 CH ₂ -S-CH ₂ -CONH ₂ 作为侧链的 Gln 类似物,	EFL1

[0359]

<p>其中位点 47 处的 Xaa 是式(I)的经修饰过的氨基酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{H})(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$, 其中 R 是连接于位点 51 处的后续 Xaa 的内酰胺桥 $-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-$, 并且其中位点 51 处的 Xaa 是式 (I) 的经修饰过的氨基酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{H})(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$, 其中 R' 是连接于来自如上限定的位点 47 处的 Xaa 的内酰胺桥的单键)</p> <p>Cys 残基被氧化以形成二硫桥, 并且在 C 末端的自由羧基被酰胺化</p>	
---	--

[0360] 除了上面公开的内酰胺桥, 模拟肽EFL1还包括使得源自于ApoA-I螺旋E和F的两个区域紧密靠近的二硫桥。在EFL1的情况下, 通过二硫桥的肽环化由失去2Da以及通过分析性HPLC的峰位移证实。这也是内酰胺桥形成和关环复分解反应的情况, 伴随着18Da (去掉H₂O) 和28Da (去除乙烯) 的质量分别减少。

[0361] 在片段C1S2的关环复分解反应期间, 获得了具有预期质量但是具有不同RP-HPLC部分的两个异构体。将其分开纯化, 并独立地测试。

[0362] 衍生于ApoA-I的螺旋F的肽F3在实验部分被选作对照。肽F3具有SEQ ID NO: 9的氨基酸序列, 其在N末端的自由氨基被乙酰化, 在C末端的自由羧基被酰胺化, 其并不包括任何内部交联。

[0363] SEQ ID NO: 9: GLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNT

[0364] 实施例2: 本发明的模拟肽的 α -螺旋含量

[0365] 模拟肽F3L1、F3S2A、F3S1B、F4S2B和F4L1的 α -螺旋含量(见表3)通过如上述材料和方法部分所述的CD色谱法评估。图3中显示的结果表示相比于非连接的对照肽F3, 连接的(stapled) F3S2A和桥连的F3L1和F4L1以及连接的F3S1B和F4S2B显示出增加的 α -螺旋含量(在208nm和222nm处有特征谷)。

[0366] 实施例3: 本发明的模拟肽的抗原性和诊断潜力

[0367] 使用病人血清ELISA测验, 评估模拟肽F3L1、F3S2A、F3S1B和F4S2B(见表3)与源自于132名急性胸痛病人的群中的血清的反应性, 对结果进行统计分析。表4中显示的结果明确表明了经连接的F3S2A、F3S1B、F4S2B和内酰胺桥F3L1模拟肽提供了相对于未连接的对照肽(F3)提高的诊断准确性。事实上, 对于这些模拟肽(尤其是F3L1)的统计参数和和肽素的统计参数具有有利的可比性, 并接近可从完整ApoA-I获得的参数。和肽素是证实所用的病人的群确实能够代表急性胸痛病人的内参(Reichelin, et al, 2009, J Am Coll Cardiol. 54 (1): 60-8)。和肽素也称为C末端精氨酸加压素原(c-ter provasopressin), 是在水体内平衡中作为关键激素的加压素的前驱体, 其循环水平已显示为在急性冠状动脉综合症中产生强的预后值(Lippi et al, 2012, Clin Chem Lab Med. 50 (2): 243-5)。

[0368] 表4. 来源于病人血清ELISA测验的, 对NSTEMI诊断的模拟肽的诊断性质和在132名ACP病人的后续cTnI提升。对于完整ApoA-I与和肽素的结果被列入用于比较, 并且其从在同样时期实施的实验获得。统计显著性的结果($p < 0.05$)以粗体表示。*对NSTEMI-TIMI值调整过; 对于风险分析: 和肽素界限: $< 9 \text{ pmol/L}$ (Reichlin et al, 2009, JACC); **采用了界限, 并放在研究种群分布的80%处。

[0369]

捕获剂	NSTEMI 预测			后续的 cTnI 预测		
	AUC (95%CI)	单一变量 OR	被调整过的* OR	AUC (95%CI)	单一变量 OR	被调整过的* OR
F3	0.55 (0.41-0.68) p=0.25	1.92 p=0.41	2.53 p=0.33	0.58 (0.40-0.76) p=0.20	1.47 p=0.53	1.57 p=0.50
F3L1	0.64 (0.52-0.76) p=0.01	6.87 p=0.001	7.02 p=0.005	0.68 (0.51-0.85) p=0.01	4.32 p=0.05	3.68 p=0.10
F3S2A	0.64 (0.51-0.77) p=0.01	** 3.09 p=0.01	** 3.6 p=0.02	0.69 (0.51-0.87) p=0.01	**2.72 p=0.14	**2.69 p=0.17
F3S1B	0.56 (0.42-0.69) p=0.20	3.03 p=0.03	4.12 p=0.02	0.50 (0.29-0.72), p=0.48	1.42 p=0.66	1.43 p=0.67
F4S2B	0.62 (0.51-0.74) p=0.01	3.78* p=0.004	3.46* p=0.01	0.66 (0.52-0.80) p=0.01	2.21 p=0.23	1.70 p=0.45
ApoA-I	0.75 (0.64-0.85) p<0.0001	9.8 p<0.0001	6.43 p=0.005	0.80 (0.68-0.91) p<0.0001	6.4 p=0.009	3.82 p=0.07
和肽素	0.63 (0.51-0.75) p=0.01	2.12 p=0.11	3.40 p=0.10	0.72 (0.54-0.90) p=0.008	6.03 p=0.01	3.41 p=0.10

[0370] 在竞争性ELISA测验中,将来源于已知是抗-ApoA-I抗体阳性的病人的血清如图3所示地与不同浓度的肽F3L1预孵育,然后加入到覆盖有完整ApoA-I的ELISA板中,后续测验步骤根据标准方法实施。结果显示,模拟肽F3L1能够以剂量依赖的方式,竞争性地抑制结合至来源于对于抗-ApoA-I抗体已知为阳性的病人血清的IgG的完整ApoA-I (图4)。

[0371] 用F3、杂乱的F3和F3L1进行的竞争性ELISA测验的结果(图5)显示没有杂乱肽的剂量依赖性抑制,其加强了用F3L1和相应的没有内酰胺桥的肽观察到的效果的特异性。更普遍地,其强调了源自于螺旋F的相应区域的合适的二级结构的重要性。

[0372] 杂乱F3:Ac-KELYLLKFTVESKVGSTELPLNFSLA-NH₂

[0373] 对应于氨基酸序列SEQ ID NO:26,其在N末端的自由氨基被乙酰化,在C末端的自由羧基被酰胺化。

[0374] 实施例4:本发明的模拟肽F3L1抑制抗-ApoA-I IgG相关的促炎反应

[0375] 以最佳浓度40微克/毫升使用的多克隆抗-ApoA-I IgG (Academy Bio-Medical Company; 休斯顿, 德克萨斯州, 美国) 导致了由单核细胞衍生的人巨噬细胞生产的TNF- α 产量的显著增加(图6A)。在加入到细胞培养基之前,当在室温下将抗-ApoA-I IgG与肽F3L1预孵育2h时,该生产消失。使用从已知对抗-ApoA-I抗体呈阳性的病人获得的IgG池的第二个实验中观察到了同样的效果(图6B),尽管由形成池的IgG引发的TNF- α 产量的水平显著低于由多克隆抗-ApoA-I IgG引发的产量。

[0376] 这些结果表明模拟肽F3L1抑制抗-ApoA-I IgG相关的促炎反应。

[0377] 实施例5:模拟肽F3L1抑制抗-ApoA-I IgG相关的变时反应

[0378] 抗-ApoA-I抗体的加入在培养的大鼠心肌细胞中引发了强的变时反应(在图7的左边的第一组的棒)。当抗体与模拟肽F3L1 (75 μ g/ml) 在加入到培养的细胞(在图7的左边的第二组的棒)之前在室温下预孵育2小时时,反应完全消除。最后,当单独加入时,肽F3L1并不改变基础频率收缩速率或者在10nM醛固酮(在图7的右边的最后一组的棒)的存在下的收缩速率,表明其消除抗-ApoA-I IgG相关的变时反应的能力与其与抗-ApoA-I抗体相互作用的能力直接相关。

[0379] 这些结果显示了模拟肽F3L1抑制抗-ApoA-I IgG相关的变时反应。

[0380] 在实施例3和4中描述的结果表明了F3L1可能对于心血管疾病的治疗具有有益的效果。

[0381] 实施例6:通过质谱对与抗-ApoA-I抗体为免疫活性的ApoA-I的表位的鉴定

[0382] 为了鉴定ApoA-I的特异内源性表位,对纯化的ApoA-I进行酶切,特异性地在赖氨酸的羧基侧或者在精氨酸羧基侧水解蛋白质,然后进行肽分离并通过反向高效液相色谱法来进行纯化,并通过质谱进行肽鉴定。使用来自具有高滴度的自身抗体的3名病人的血清样本和来自具有低滴度的自身抗体的3名病人的血清样本,通过ELISA测试对被消化的蛋白质和每个部分的免疫反应性。

[0383] 对于在赖氨酸残基处被消化的ApoA-I来说,使用酶胞内蛋白酶Lys-C (Roche Applied Science) (酶的量1:50是按重量计的蛋白质的1/50,在37摄氏度下孵育18小时,pH 8.5)。用Lys-C的ApoA-I消化允许包括前面未报道的氨基酸序列的免疫活性肽表位的部分70和71(图8)的鉴定,其涉及SEQ ID NO:1的ApoA-I的成熟氨基酸序列,对应于氨基酸残基141-182,包括来源于SEQ ID NO:5的螺旋D的区域,SEQ ID NO:5的最后两个氨基酸缺失。该表位的氨基酸是SEQ ID NO:21。

[0384] 为了产生在精氨酸残基处切除了的肽片段,常规方式是使用酶ArgC。但是,ArgC酶公认缺乏特异性,产生胰蛋白酶肽,其消除免疫反应性。为了克服这一点,在消化之前ApoA-I在赖氨酸残基被用顺丁烯二酸酐反向阻止,并获得精氨酸特异性切割(Butler et al, 1967, Biochemical Journal, 103 (3): 78P-79P; Butler et al, Biochemical Journal, 112 (5): 679-689)。该方法允许包含氨基酸序列的另一免疫活性肽表位的部分74和80(图9)的鉴定,其涉及SEQ ID NO:1的ApoA-I的成熟氨基酸序列,对应于氨基酸残基216-243的氨基酸序列,包括来源于SEQ ID NO:8的螺旋F的区域1。该表位的氨基酸序列是SEQ ID NO:25。

[0385] 实施例6所述的结果表明在该实施例中鉴定的特定表位以及更通常地来源于SEQ ID NO:5的螺旋D的区域以及分别来源于SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的螺旋F的区域1和区域2,比包括其他螺旋的ApoA-I的其他片段对于抗-ApoA-I抗体更具有免疫反应性,尤其是包括在对应于较不具有免疫反应性的SEQ ID NO:1的成熟ApoA-I的氨基酸残基189-215的肽中的螺旋F。因此,氨基酸序列包括至少一种这些区域的肽可有利地用于检测抗-ApoA-I自身抗体。

[0386] 实施例4和5中描述的类似实验已用较高数目的样本(n=9)重复,其证实了在所述实施例中呈现的结果。

[0387] 序列表

[0388] 人体ApoA-I:SEQ ID NO:1

[0389] DEPPQSPWDRVKDLATVYVDVLKDSGRDYVSQFEGSALGKQLNLKLLDNWDSVTSTFSKLREQLG PVTQ
EFWDNLEKETEGRLQEMSKDLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQEEMELYRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLGE
EMRDRARAHVDALRTHLAPYSDELQRRLAARLEALKENG GARLA EYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQG LLPVLE
SFKVSFLSALEEYTKKLNTQ

[0390] 衍生于螺旋A的区域:SEQ ID NO:2:

[0391] VKDLATVYVDVLKDSGRDYVSQFEGSAL

[0392] 衍生于螺旋B的区域:SEQ ID NO:3:

[0393] DSVTSTFSKLREQLG PVTQEFWDNLEKETEGRL

[0394] 衍生于螺旋C的区域:SEQ ID NO:4:

[0395] YLDDFQKKWQEEMELYRQKVEPLRAELQEGARQKLHE

[0396] 衍生于螺旋D的区域:SEQ ID NO:5:

[0397] EEMRDRARAHVDALRTHLAPYSDELQRRLAARLEALKEN

[0398] 衍生于螺旋E的区域1:SEQ ID NO:6:

[0399] ATEHLSTLSEKAKPALE

[0400] 衍生于螺旋E的区域2:SEQ ID NO:7:

[0401] LAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLR

[0402] 衍生于螺旋F的区域1:SEQ ID NO:8:

[0403] VLESFKVSFLSALEEYTKKLNT

[0404] 衍生于螺旋F的区域2:SEQ ID NO:9:

[0405] GLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNT

[0406] 无乙酰化和酰胺化的A1S2:

[0407] VKDLR8TVYVDVS5KDSGRDYVSQFEGSAL

[0408] 具有连接在所述序列的位点5处的R8和在位点12处的S5的烃连接,由如下序列表示:

[0409] VKDLXaaTVYVDVXaaKDSGRDYVSQFEGSAL (SEQ ID NO:10,其中,位点5处的Xaa被置换成式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$,其中R是连接于位点12处的后续Xaa的烃连接 $-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$,并且其中位点12处的Xaa是式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$,其中R'是连接于来自上述限定的位点5处的Xaa的烃连接的单键)

[0410] 无乙酰化和酰胺化的B1S2:

[0411] DSVTSTR8SKLREQS5GPVTQEFWDNLEKETEGEGL

[0412] 具有连接在所述序列的位点7处的R8和在位点14处的S5的烃连接,由如下序列表示:

[0413] DSVTSTXaaSKLREQXaaGPVTQEFWDNLEKETEGEGL (SEQ ID NO:11,其中位点7处的Xaa是式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$,其中R是连接于位点14处的后续Xaa的烃连接 $-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$,并且其中位点14处的Xaa是式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$,其中R'是连接于来自上述限定的位点7处的Xaa的烃连接的单键)

[0414] 无乙酰化和酰胺化的C1S2:

[0415] YLDDFQKKWQEER8ELYRQKS5EPLRAELQEGARQKLHEL

[0416] 具有连接在所述序列的位点13处的R8和在位点20处的S5的烃连接,由如下序列表示:

[0417] YLDDFQKKWQEEEXaaELYRQKXaaEPLRAELQEGARQKLHEL (SEQ ID NO:12,其中位点13处的Xaa是式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$,其中R是连接于位点20处的后续Xaa的烃连接 $-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$,并且其中位点20处的Xaa是式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$,其中R'是连接于来自上述限定的位点13处的Xaa的烃连接的单键)

[0418] 无乙酰化和酰胺化的D1S2A:

[0419] EEMDRARAHHR8DALRTHS5APYSDELRLAARLEALKEN

[0420] 具有连接在所述序列的位点11处的R8和在位点18处的S5的烃连接,由如下序列表示:

[0421] EEMDRARAHXaaDALRTHXaaAPYSDELRLAARLEALKEN (SEQ ID NO:12,其中位点11处的Xaa是式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$,其中R是连接于位点18处的后续Xaa的烃连接 $-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$,并且其中位点18处的Xaa是式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$,其中R'是连接于来自上述限定的位点11处的Xaa的烃连接的单键)

[0422] 无乙酰化和酰胺化的E1S2:

[0423] ATEHR8STLSEKS5KPALED

[0424] 具有连接在所述序列的位点5处的R8和在位点12处的S5的烃连接,由如下序列表示:

[0425] ATEHXaaSTLSEKXaaKPALED (SEQ ID NO:14,其中位点5处的Xaa是式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$,其中R是连接于位点12处的后续Xaa的烃连接 $-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$,并且其中位点12处的Xaa是式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$,其中R'是连接于来自上述限定的位点5处的Xaa的烃连接的单键)

[0426] 无乙酰化和酰胺化的F3L1:

[0427] GLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNT

[0428] 具有连接在所述序列的位点19处的E和位点23处的K的内酰胺桥,由如下序列表示:

[0429] GLLPVLESFKVSFLSALEXaaYTKXaaLNT (SEQ ID NO:19,其中位点19处的Xaa是式(I)的经修饰的氨基酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{H})(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$,其中R是连接于位点23处的后续Xaa的内酰胺桥-

(CH₂)₂-CO-NH-(CH₂)₄-, 并且其中位点23处的Xaa是式(I)的经修饰的氨基酸:-NH-C(H)(R')-C(O)-, 其中R'是连接于来自上述限定的位点19处的Xaa的内酰胺桥的单键)

[0430] 无乙酰化和酰胺化的F3S2A:

[0431] GLLPVLESFKVSFLSR8LEEYTKS5LNT

[0432] 具有连接在所述序列的位点16处的R8和在位点23处的S5的烃连接, 由如下序列表示:

[0433] GLLPVLESFKVSFLSXaaLEEYTKXaaLNT (SEQ ID NO:15, 其中位点16处的Xaa是式(I)的经修饰的丙氨酸:-NH-C(CH₃)(R)-C(O)-, 其中R是连接于位点23处的后续Xaa的烃连接-(CH₂)₆-CH=CH-(CH₂)₃-, 并且其中位点23处的Xaa是式(I)的经修饰的丙氨酸:-NH-C(CH₃)(R')-C(O)-, 其中R'是连接于来自上述限定的位点16处的Xaa的烃连接的单键)

[0434] 无乙酰化和酰胺化的F3S1B:

[0435] GLLPVLESFKVSS5LSAS5EEYTKKLNT

[0436] 具有连接在所述序列的位点13处的S5和在位点17处的S5的烃连接, 由如下序列表示:

[0437] GLLPVLESFKVSXaaLSAXaaEEYTKKLNT (SEQ ID NO:16, 其中位点13处的Xaa是式(I)的经修饰的丙氨酸:-NH-C(CH₃)(R)-C(O)-, 其中R是连接于位点17处的后续Xaa的烃连接-(CH₂)₃-CH=CH-(CH₂)₃-, 并且其中位点17处的Xaa是式(I)的经修饰的丙氨酸:-NH-C(CH₃)(R')-C(O)-, 其中R'是连接于来自上述限定的位点13处的Xaa的烃连接的单键)

[0438] 无乙酰化和酰胺化的F4S2B:

[0439] VLESFKVSR8LSALEES5TKKLNT

[0440] 具有连接在所述序列的位点9处的R8和在位点16处的S5的烃连接, 由如下序列表示:

[0441] VLESFKVSXaaLSALEEXaaTKKLNT (SEQ ID NO:17, 其中位点9处的Xaa是式(I)的经修饰的丙氨酸:-NH-C(CH₃)(R)-C(O)-, 其中R是连接于位点16处的后续Xaa的烃连接-(CH₂)₆-CH=CH-(CH₂)₃-, 并且其中位点16处的Xaa是式(I)的经修饰的丙氨酸:-NH-C(CH₃)(R')-C(O)-, 其中R'是连接于来自上述限定的位点9处的Xaa的烃连接的单键)

[0442] 无酰胺化的直链EFL1:

[0443] CAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRXGLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTC, 在位点28处, X=Gln类似物(侧链为CH₂-S-CH₂-CONH₂而非CH₂-CH₂-CONH₂), 以及连接所述序列上的位点47处的E和位点51处的K的内酰胺桥, 其由如下序列表示:

[0444] CAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRXaaGLLPVLESFKVSFLSALEXaaYTKXaaLNTC (SEQ ID NO:18, 其中位点28处的Xaa是具有CH₂-S-CH₂-CONH₂作为侧链的Gln类似物, 其中位点47处的Xaa是式(I)的经修饰的氨基酸:-NH-C(H)(R)-C(O)-, 其中R是连接于位点51处的后续Xaa的内酰胺桥-(CH₂)₂-CO-NH-(CH₂)₄-, 并且其中位点51处的Xaa是式(I)的经修饰的氨基酸:-NH-C(H)(R')-C(O)-, 其中R'是连接于来自上述限定的位点47处的Xaa的内酰胺桥的单键)

[0445] 无乙酰化和酰胺化的F4L1: SEQ ID NO:20:

[0446] VLESFKVSFLSALEXaaYTKXaaLNT

[0447] 其中位点15处的Xaa是式(I)的经修饰的氨基酸:-NH-C(H)(R)-C(O)-, 其中R是连接于位点19处的后续Xaa的内酰胺桥-(CH₂)₂-CO-NH-(CH₂)₄-, 并且其中位点19处的Xaa是式

(I) 的经修饰的氨基酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{H})(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$, 其中 R' 是连接于来自上述限定的位点15处的 Xaa 的内酰胺桥的单键)

[0448] D2(aa 141-182):SEQ ID NO:21:

[0449] LSPLGEEMRDRARAHVDALRTHLAPYSDELQRRLAARLEALK

[0450] D2S2A:SEQ ID NO:22:

[0451] LSPLGEEMRDRARAHXaaDALRTHXaaAPYSDELQRRLAARLEALK

[0452] 其中位点16处的Xaa是式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$, 其中R是连接于位点23处的后续Xaa的烃连接 $-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$, 并且其中位点23处的Xaa是式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$, 其中 R' 是连接于来自上述限定的位点16处的Xaa的烃连接的单键)

[0453] D3:SEQ ID NO:23:

[0454] EEMRDRARAHVDALRTHLAPYSDELQRRLAARLEALK

[0455] D3S2A:SEQ ID NO:24:

[0456] EEMRDRARAHXaaDALRTHXaaAPYSDELQRRLAARLEALK

[0457] 其中位点11处的Xaa是式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$, 其中R是连接于位点18处的后续Xaa的烃连接 $-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$, 并且其中位点18处的Xaa是式(I)的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$, 其中 R' 是连接于来自上述限定的位点11处的Xaa的烃连接的单键)

[0458] F5:SEQ ID NO:25:

[0459] QGLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQ

[0460] 无乙酰化和酰胺化的杂乱的F3:SEQ ID NO:26:

[0461] KELYLLKFTVESKVGSTELPLNFSLA

[0462] 在本序列表中, R8对应于 $(\text{R})-2-(7'-\text{辛烯基})-\text{丙氨酸}$, S5对应于 $(\text{S})-2-(4'-\text{戊烯基})-\text{丙氨酸}$ 。

序列表

<110> 日内瓦大学附属医院
日内瓦大学
豪夫迈·罗氏有限公司

<120> 模拟肽

<130> P1347PC00

<150> EP12191474

<151> 2012-11-06

<160> 26

[0001]

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 243

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr
1 5 10 15

Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln

20	25	30
Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp		
35	40	45
Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu		
50	55	60
Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu		
65	70	75
80		
[0002]		
Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys		
85	90	95
Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met		
100	105	110
Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu		
115	120	125
Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu		
130	135	140

Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg
145 150 155 160

Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala
165 170 175

Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr
180 185 190

[0003] His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys
195 200 205

Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser
210 215 220

Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu
225 230 235 240

Asn Thr Gln

<210> 2

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生于ApoA-I的螺旋A的区域

<400> 2

Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp Ser Gly

1 5 10 15

[0004]

Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu

20 25

<210> 3

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生于ApoA-I的螺旋B的区域

<400> 3

Asp Ser Val Thr Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro

1 5 10 15

Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu

20 25 30

<210> 4

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

[0005]

<220>

<223> 衍生于ApoA-I的螺旋C的区域

<400> 4

Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr

1 5 10 15

Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg

20 25 30

Gln Lys Leu His Glu

35

<210> 5

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生于ApoA-I的螺旋D的区域

<400> 5

Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr

1

5

10

15

[0006]

His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg

20

25

30

Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn

35

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生于ApoA-I的螺旋E的区域1

<400> 6

Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu

1 5 10 15

Glu

<210> 7

<211> 27

[0007]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生于ApoA-I的螺旋E的区域2

<400> 7

Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser

1 5 10 15

Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg

20 25

<210> 8

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生于ApoA-I的螺旋F的区域1

<400> 8

Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr

1

5

10

15

[0008]

Thr Lys Lys Leu Asn Thr

20

<210> 9

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 衍生于ApoA-I的螺旋F的区域2

<400> 9

Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala
1 5 10 15

Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr
20 25

<210> 10

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0009] <223> 无乙酰化和酰胺化的A1S2

<220>

<221> 其他特征

<222> (5)..(5)

<223> Xaa被置换成式 (1) 的经修饰的丙氨酸:

$-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$, 其中R是连接于位点12处的后续Xaa的烃连接

$-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$

<220>

<221> 其他特征

<222> (12)..(12)

<223> Xaa是式 (I) 的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$

其中R'是连接来自于位点5处的Xaa的烃连接的单键

<400> 10

Val Lys Asp Leu Xaa Thr Val Tyr Val Asp Val Xaa Lys Asp Ser Gly

1 5 10 15

Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu

20 25

<210> 11

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

[0010]

<220>

<223> 无乙酰化和酰胺化的B1S2

<220>

<221> 其他特征

<222> (7)..(7)

<223> Xaa是式 (I) 的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(=\text{O})-$

其中R是连接于位点14处的后续Xaa的烃连接 $-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$

<220>

<221> 其他特征

<222> (14)..(14)

<223> Xaa是式 (I) 的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$
其中R'是来自连接于位点7处的Xaa的烃连接的单键

<400> 11

Asp Ser Val Thr Ser Thr Xaa Ser Lys Leu Arg Glu Gln Xaa Gly Pro
1 5 10 15

Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu
20 25 30

<210> 12

[0011] <211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 无乙酰化和酰胺化的C1S2

<220>

<221> 其他特征

<222> (13)..(13)

<223> Xaa是式 (I) 的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$
其中R是连接于位点20处的后续Xaa的烃连接 $-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$

<220>

<221> 其他特征

<222> (20)..(20)

<223> Xaa是式 (I) 的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$
其中R'是连接于来自位点13处的Xaa的烃连接的单键

<400> 12

Tyr	Leu	Asp	Asp	Phe	Gln	Lys	Lys	Trp	Gln	Glu	Glu	Xaa	Glu	Leu	Tyr
1				5				10					15		

Arg	Gln	Lys	Xaa	Glu	Pro	Leu	Arg	Ala	Glu	Leu	Gln	Glu	Gly	Ala	Arg
			20				25						30		

[0012]

Gln	Lys	Leu	His	Glu	Leu
			35		

<210> 13

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 无乙酰化和酰胺化的D1S2A

<220>

<221> 其他特征

<222> (11)..(11)

<223> Xaa是式 (I) 的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(0)-$

其中R是连接于位点18处的后续Xaa的烃连接 $-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$

<220>

<221> 其他特征

<222> (18)..(18)

<223> Xaa是式 (I) 的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')$ $-\text{C}(0)-$

其中R'是连接于来自于位点11处的Xaa的烃连接的单键

<400> 13

Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Xaa Asp Ala Leu Arg Thr

[0013] 1 5 10 15

His Xaa Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg

20 25 30

Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn

35

<210> 14

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

[0014]

<220>

<223> 无乙酰化和酰胺化的EIS2

<220>

<221> 其他特征

<222> (5)..(5)

<223> Xaa是式 (I) 的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$

其中R是连接于位点12处的后续Xaa的烃连接 $-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$

<220>

<221> 其他特征

<222> (12)..(12)

<223> 位点12处的Xaa是式 (I) 的经修饰的丙氨酸:

$-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$, 其中R'是连接于来自位点5处的Xaa的烃连接的单键

<400> 14

Ala Thr Glu His Xaa Ser Thr Leu Ser Glu Lys Xaa Lys Pro Ala Leu

1

5

10

15

Glu Asp

<210> 15

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 无乙酰化和酰胺化的F3S2A

<220>

<221> 其他特征

<222> (16)..(16)

<223> Xaa是式 (I) 的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$

其中R是连接于位点23处的后续Xaa的烃连接 $-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$

[0015] <220>

<221> 其他特征

<222> (23)..(23)

<223> Xaa是式 (I) 的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$

其中R'是连接于来自位点16处的Xaa的烃连接的单键

<400> 15

Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Xaa

1 5 10 15

Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Xaa Leu Asn Thr

20 25

<210> 16

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 无乙酰化和酰胺化的F3S1B

<220>

<221> 其他特征

<222> (13)..(13)

<223> Xaa是式 (I) 的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$

其中R是连接于位点17处的后续Xaa的烃连接 $-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$

[0016]

<220>

<221> 其他特征

<222> (17)..(17)

<223> 位点17处的Xaa是式 (I) 的经修饰的丙氨酸:

$-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$, 其中R'是连接于来自位点13处的Xaa的烃连接的单键

<400> 16

Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Xaa Leu Ser Ala

1 5 10 15

Xaa Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr

20 25

<210> 17

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 无乙酰化和酰胺化的F4S2B

<220>

<221> 其他特征

<222> (9)..(9)

[0017] <223> 其中Xaa是式 (I) 的经修饰的丙氨酸:
-NH-C(CH₃)(R)-C(O)-, 其中R是连接于位点16处的后续Xaa的烃连接
-(CH₂)₆-CH=CH-(CH₂)₃-

<220>

<221> 其他特征

<222> (16)..(16)

<223> Xaa是式 (I) 的经修饰的丙氨酸: -NH-C(CH₃)(R')-C(O)-
其中R'是连接于来自位点9处的Xaa的烃连接的单键

<400> 17

Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Xaa Leu Ser Ala Leu Glu Glu Xaa

1

5

10

15

Thr Lys Lys Leu Asn Thr

20

<210> 18

<211> 55

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 没有酰胺化的直链EFL1

[0018]

<220>

<221> 其他特征

<222> (28)..(28)

<223> X是具有CH₂-S-CH₂-CONH₂作为侧链的Gln类似物

<220>

<221> 其他特征

<222> (47)..(47)

<223> Xaa是式 (I) 的经修饰的氨基酸: -NH-C(H)(R)-C(=O)-

其中R是连接于位点51处的后续Xaa的内酰胺桥-(CH₂)₂-CO-NH-(CH₂)₄-

<220>

<221> 其他特征

<222> (51)..(51)

<223> Xaa是式 (I) 的经修饰的氨基酸: -NH-C(H)(R')-C(=O)-

其中R'是连接于来自位点47处的Xaa的内酰胺桥的单键

<400> 18

Cys Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser
1 5 10 15

Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Xaa Gly Leu Leu Pro
20 25 30

Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Xaa Tyr
[0019] 35 40 45

Thr Lys Xaa Leu Asn Thr Cys
50 55

<210> 19

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 无乙酰化和酰胺化的F3L1

<220>

<221> 其他特征

<222> (19)..(19)

<223> Xaa是式 (I) 的经修饰的氨基酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{H})(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$

其中R是连接于位点23处的后续Xaa的内酰胺桥 $-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-$

<220>

<221> 其他特征

<222> (23)..(23)

<223> Xaa是式 (I) 的经修饰的氨基酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{H})(\text{R}')$ $-\text{C}(\text{O})-$

其中R'是连接于来自位点19处的Xaa的内酰胺桥的单键

<400> 19

[0020] Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala

1 5 10 15

Leu Glu Xaa Tyr Thr Lys Xaa Leu Asn Thr

20 25

<210> 20

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 无乙酰化和酰胺化的F4L1

<220>

<221> 其他特征

<222> (15)..(15)

<223> Xaa是式 (I) 的经修饰的氨基酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{H})(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$

其中R是连接于位点19处的后续Xaa的内酰胺桥 $-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-$

<220>

<221> 其他特征

<222> (19)..(19)

<223> Xaa是式 (I) 的经修饰的氨基酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{H})(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$

其中R'是连接于来自位点15处的Xaa的内酰胺桥的单键

<400> 20

[0021] Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Xaa Tyr

1 5 10 15

Thr Lys Xaa Leu Asn Thr

20

<210> 21

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> D2

<400> 21

Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val
1 5 10 15

Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln
20 25 30

Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys
35 40

[0022]

<210> 22

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> D2S2A

<220>

<221> 其他特征

<222> (16)..(16)

<223> Xaa是式 (I) 的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$

其中R是连接于位点23处的后续Xaa的烃连接-(CH₂)₆-CH=CH-(CH₂)₃-

<220>

<221> 其他特征

<222> (23)..(23)

<223> Xaa是式 (I) 的经修饰的丙氨酸: -NH-C(CH₃)(R')-C(O)-
其中R'是连接于位点16处的Xaa的烃连接的单键

<400> 22

Leu	Ser	Pro	Leu	Gly	Glu	Glu	Met	Arg	Asp	Arg	Ala	Arg	Ala	His	Xaa
1			5					10					15		

[0023] Asp Ala Leu Arg Thr His Xaa Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln

			20					25					30		

Arg	Leu	Ala	Ala	Arg	Leu	Glu	Ala	Leu	Lys
			35					40	

<210> 23

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> D3

<400> 23

Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr
1 5 10 15

His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg
20 25 30

Leu Glu Ala Leu Lys
35

[0024]

<210> 24

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> D3S2A

<220>

<221> 其他特征

<222> (11)..(11)

<223> Xaa是式 (I) 的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$

其中R是连接于位点18处的后续Xaa的烃连接 $-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$

<220>

<221> 其他特征

<222> (18)..(18)

<223> Xaa是式 (I) 的经修饰的丙氨酸: $-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$
其中R'是连接于位点11处的Xaa的烃连接的单键

<400> 24

Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Xaa Asp Ala Leu Arg Thr
1 5 10 15

His Xaa Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg
[0025] 20 25 30

Leu Glu Ala Leu Lys
35

<210> 25

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F5

<400> 25

Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser
1 5 10 15

Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln
20 25

<210> 26

<211> 26

<212> PRT

[0026]

<213> 人工序列

<220>

<223> 无乙酰化和酰胺化的杂乱的F3

<400> 26

Lys Glu Leu Tyr Leu Leu Lys Phe Thr Val Glu Ser Lys Val Gly Ser
1 5 10 15

Thr Glu Leu Pro Leu Asn Phe Ser Leu Ala
20 25

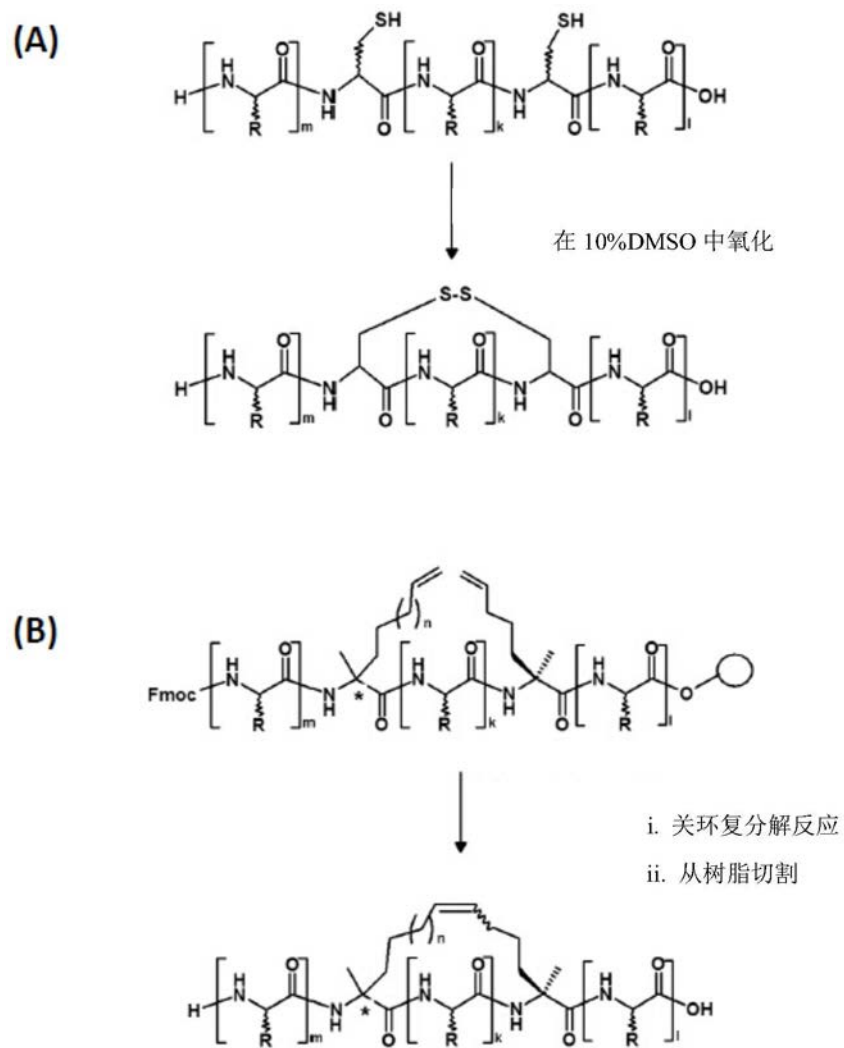


图1

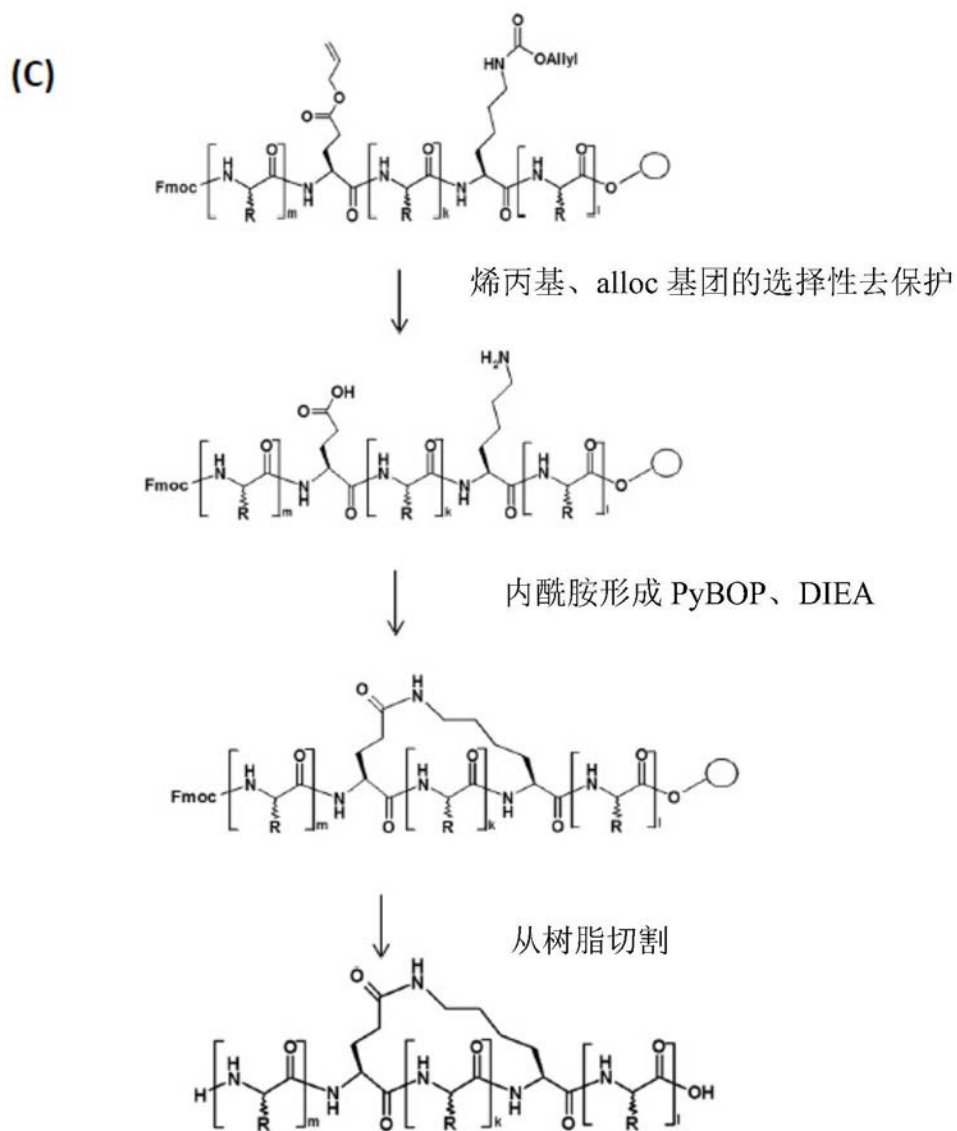


图1 (续)

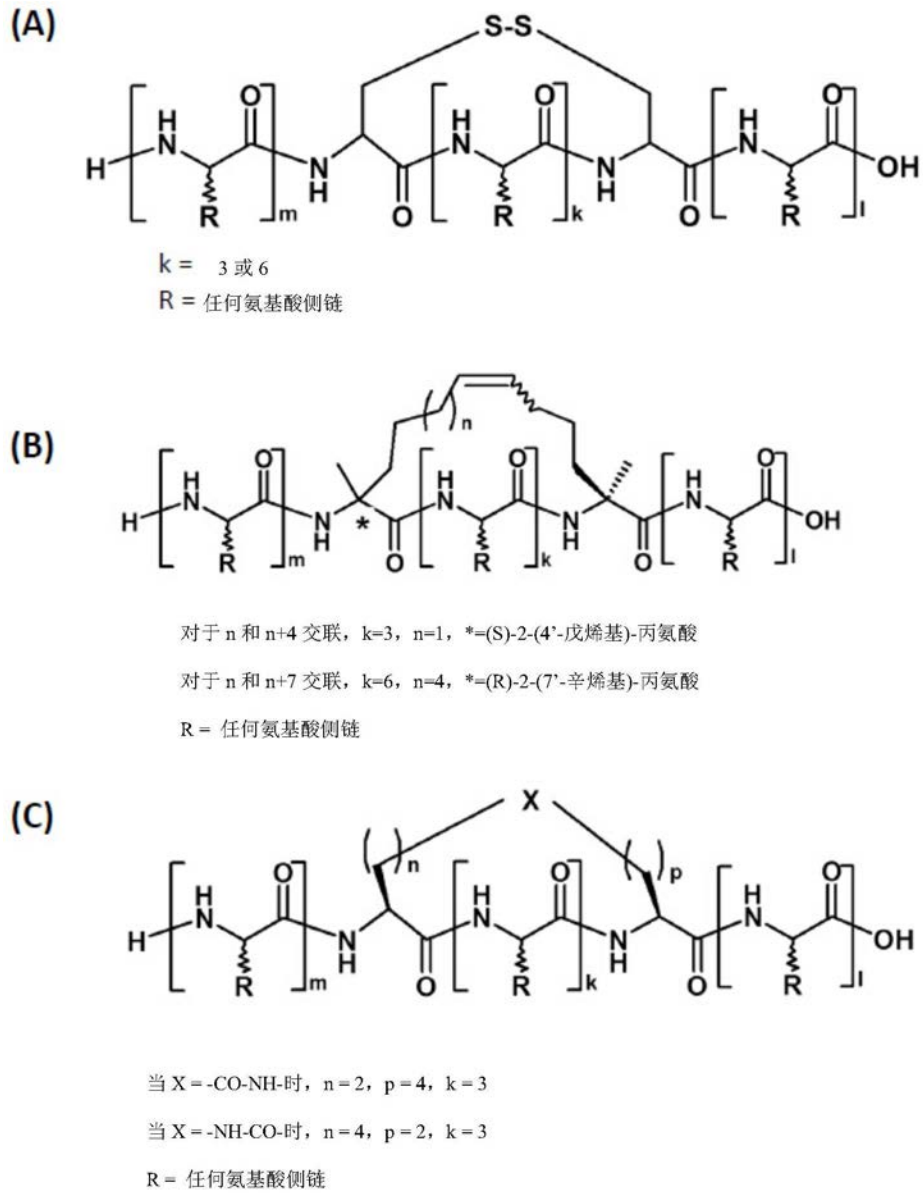


图2

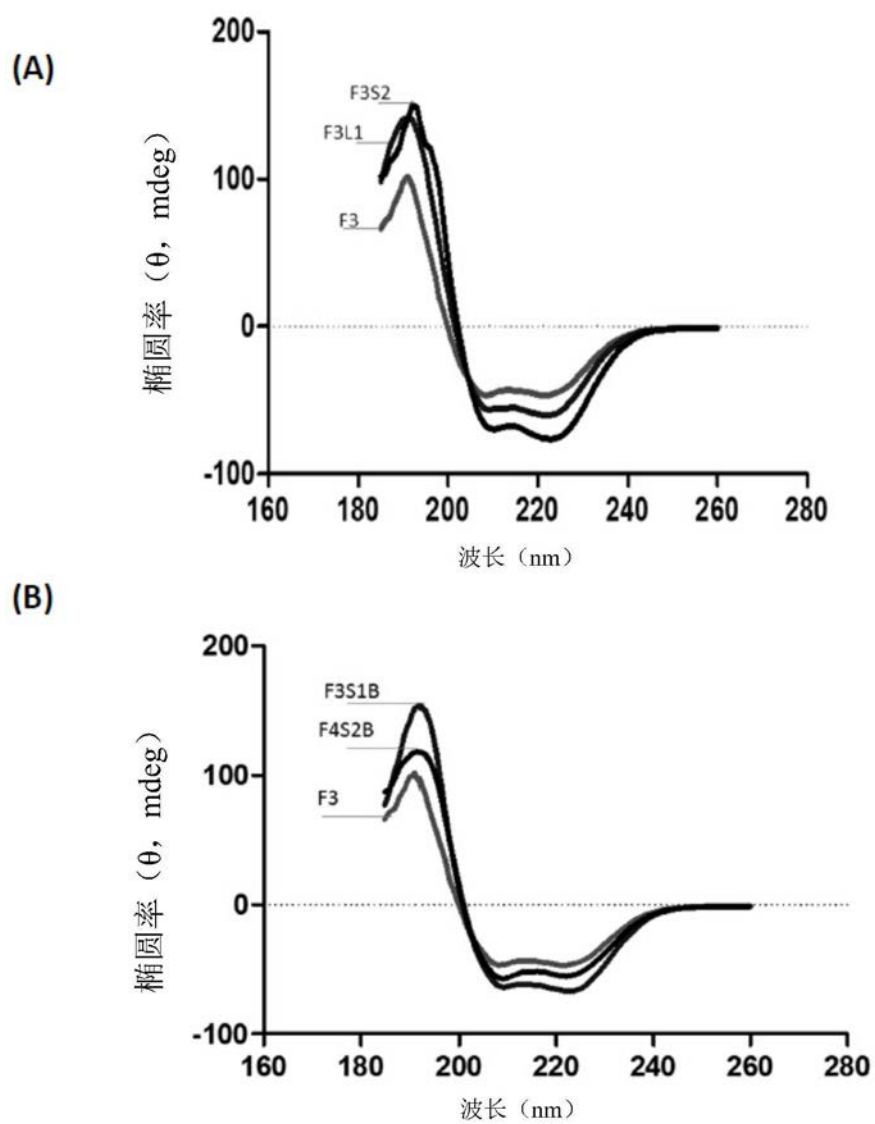


图3

(C)

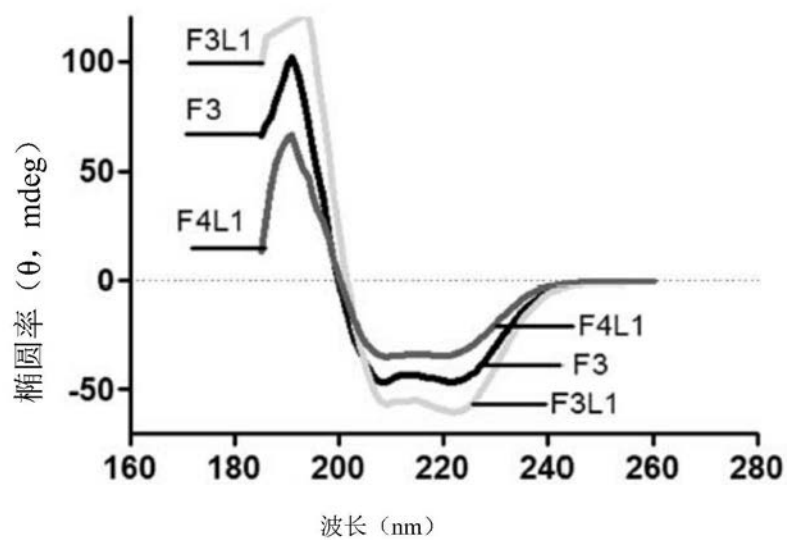


图3(续)

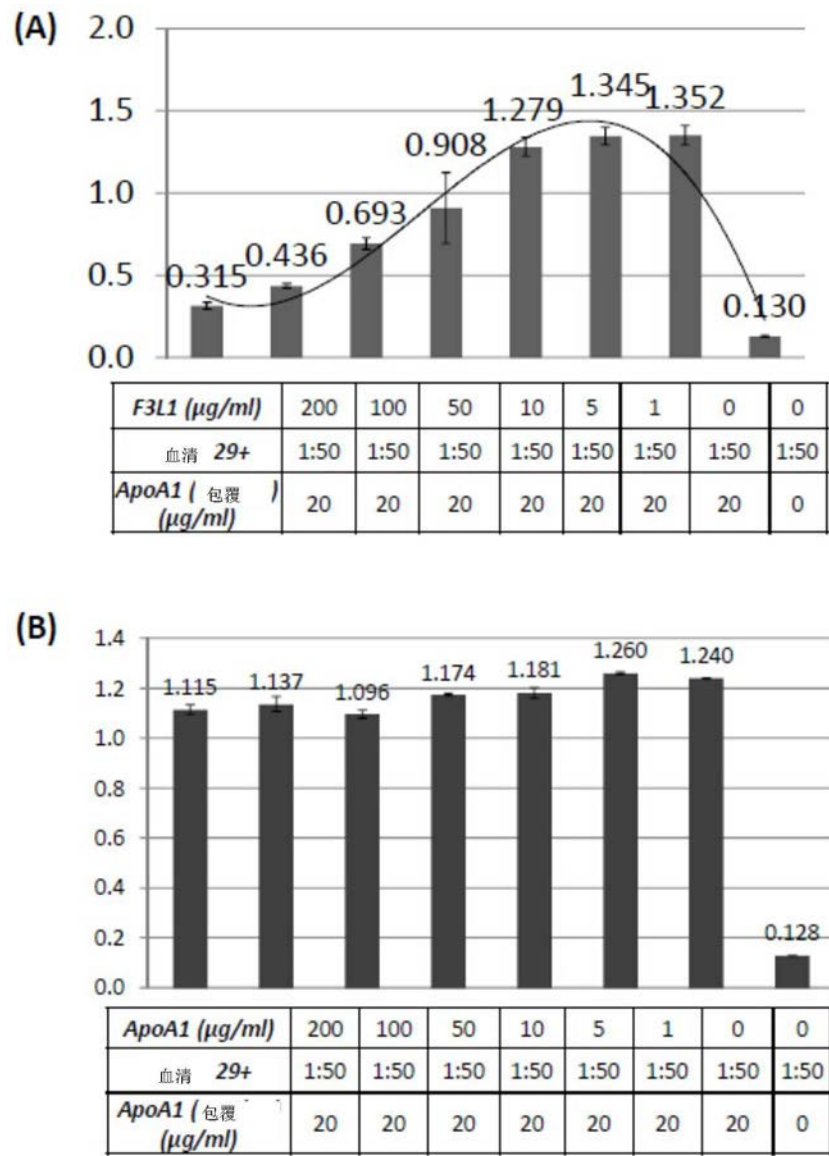


图4

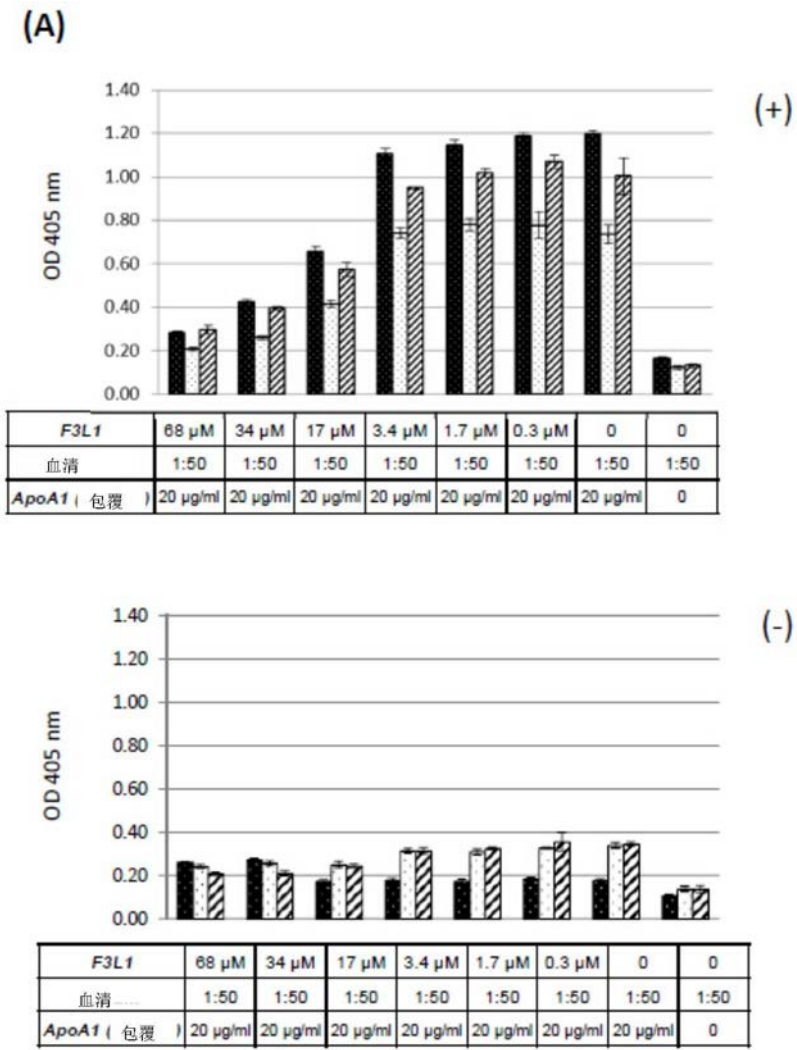


图5

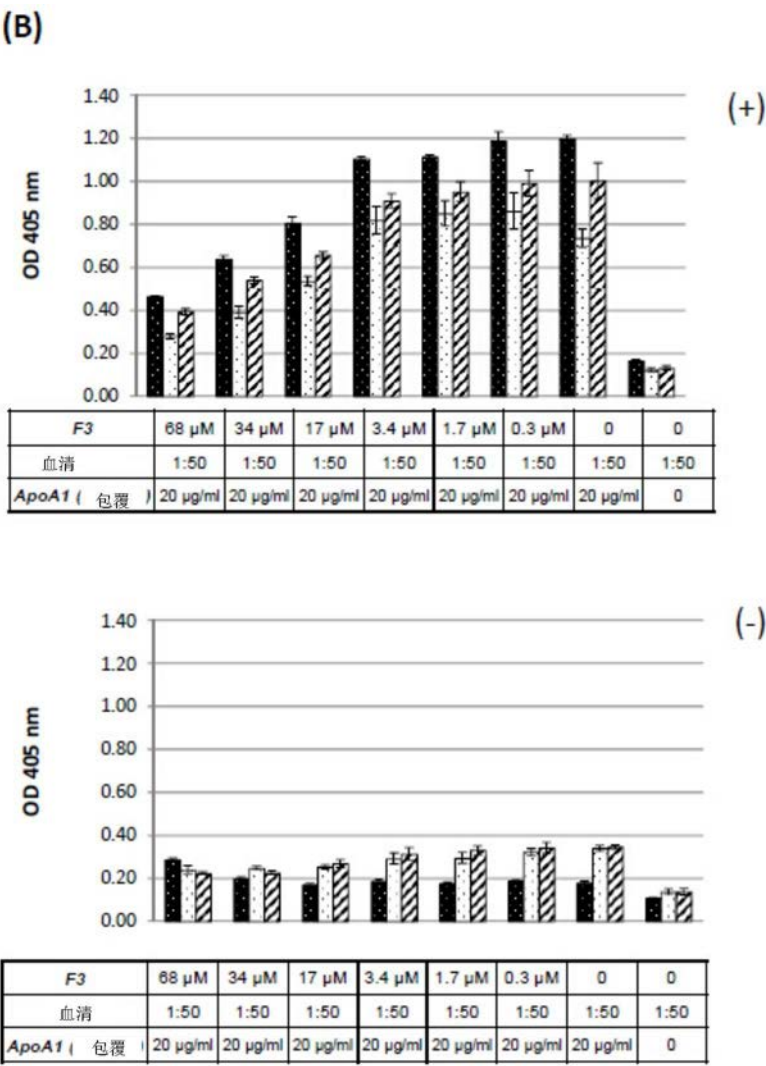


图5 (续)

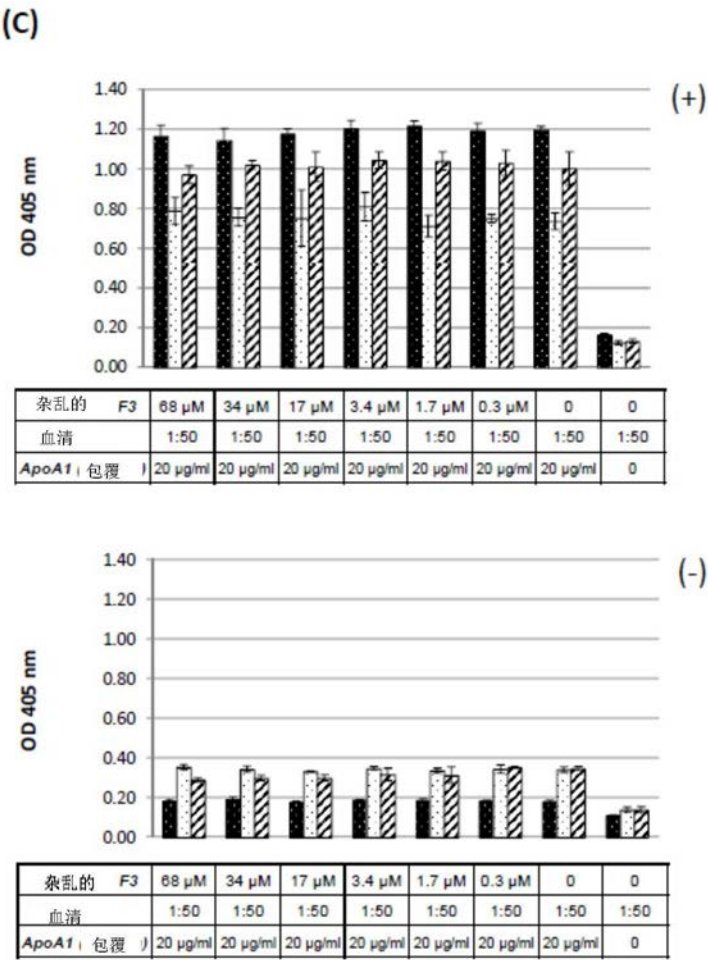


图5 (续)

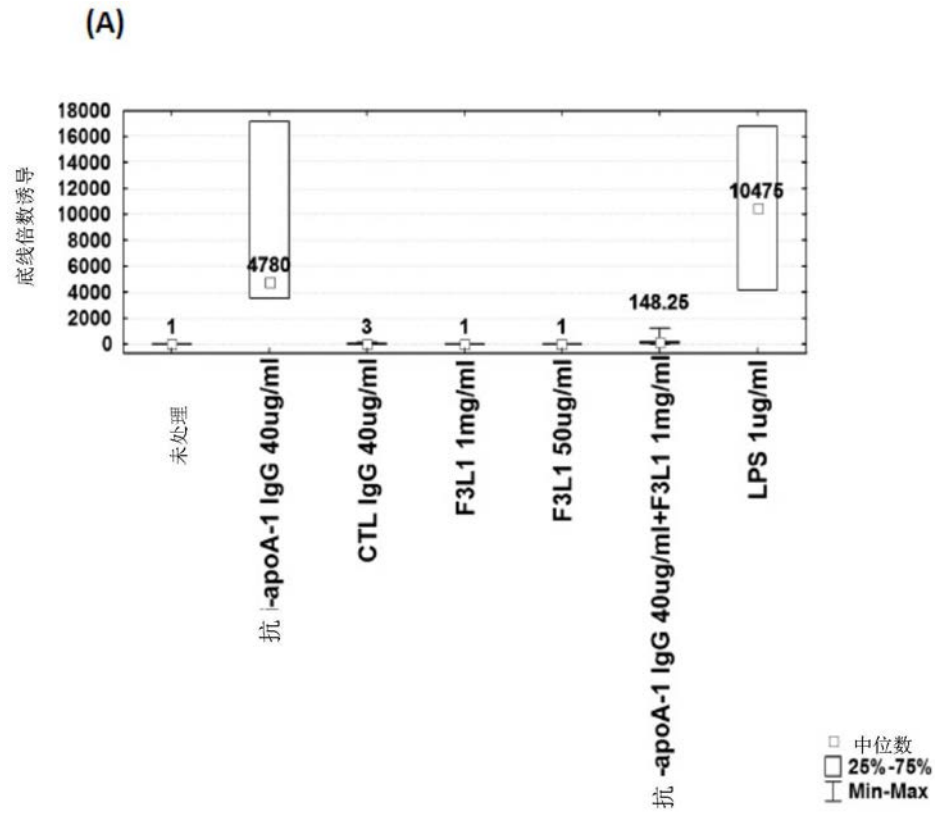


图6

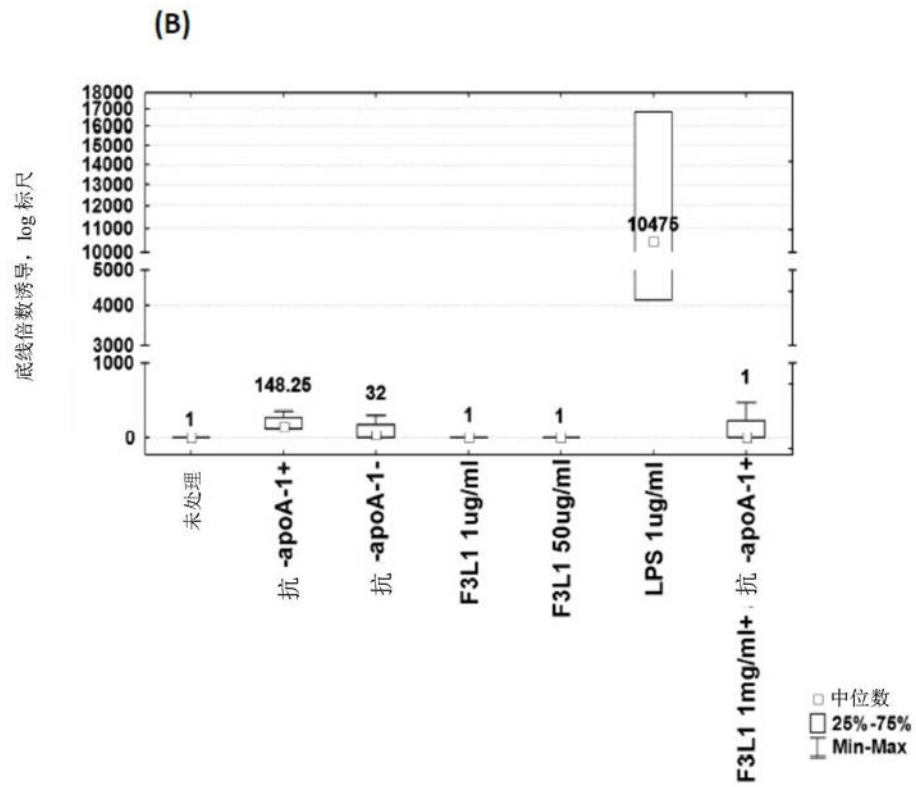


图6 (续)

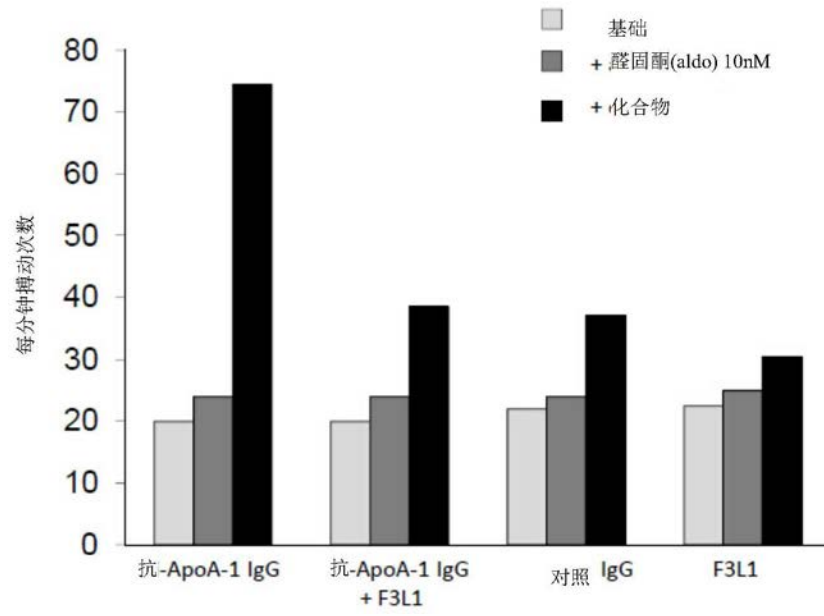


图7

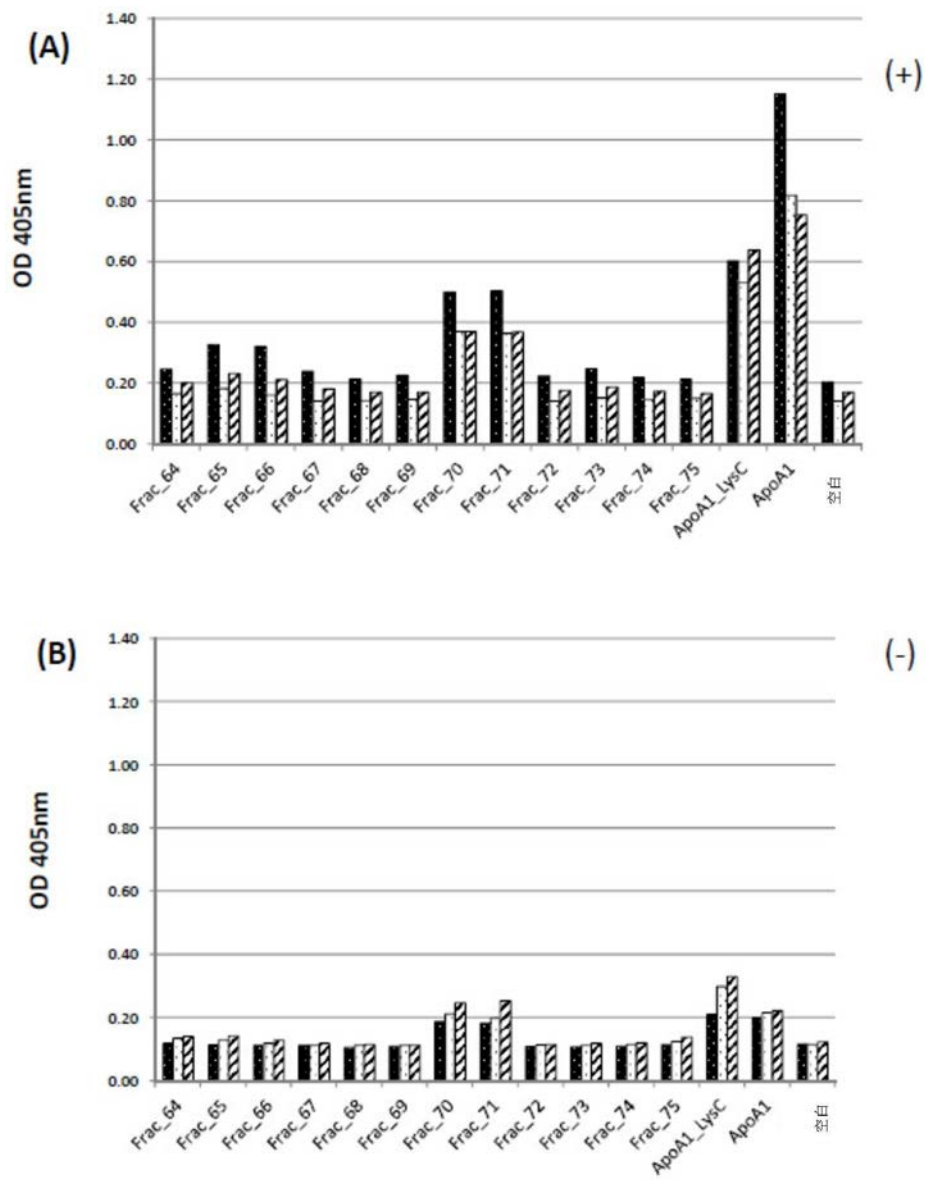


图8

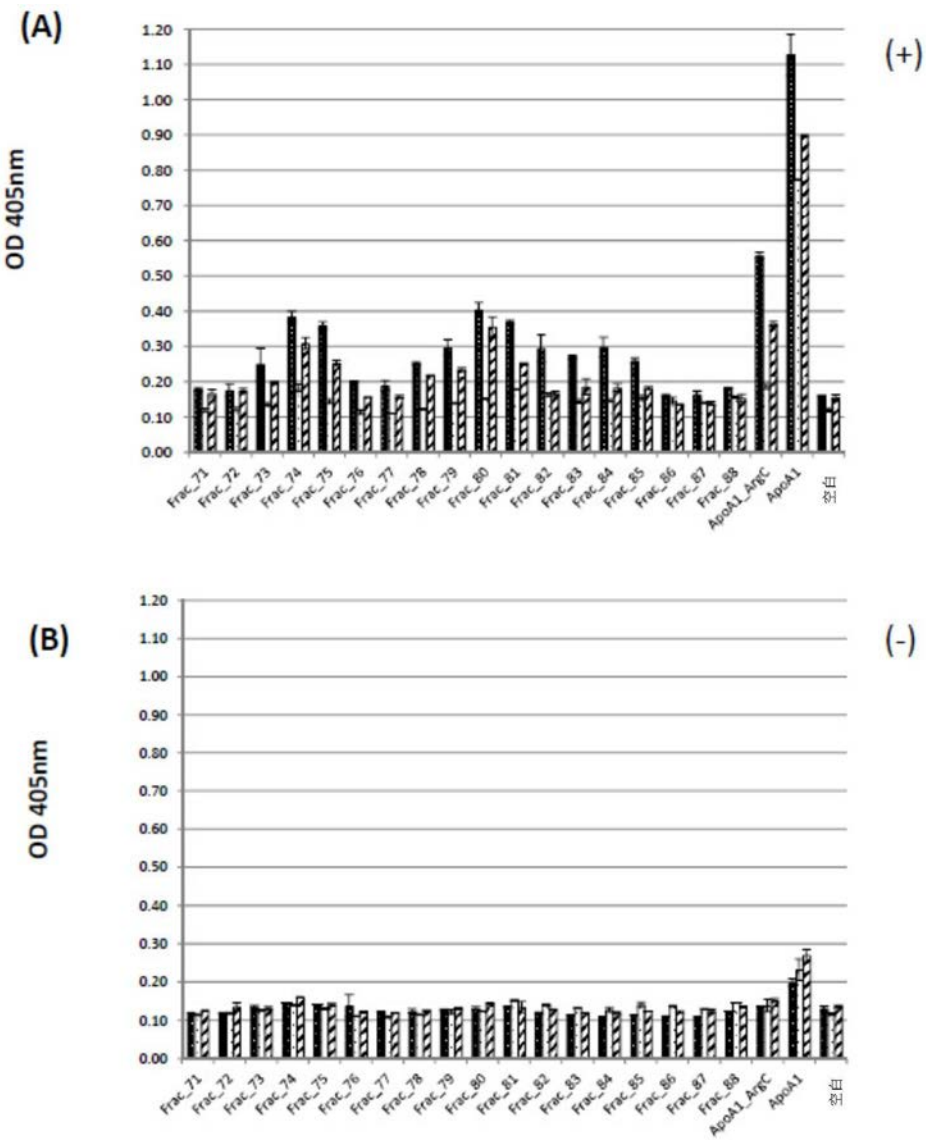


图9