



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116724059 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 08

(21) 申请号 202180062573.5

(22) 申请日 2021.07.23

(30) 优先权数据

FR2007849 2020.07.24 FR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.03.13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/043077 2021.07.23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/020782 EN 2022.01.27

(71) 申请人 阿迪根有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 N·P·德赛 G·迪维塔

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

专利代理师 张全信

(51) Int.Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 9/14 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 47/54 (2017.01)

A61K 38/08 (2019.01)

A61K 38/10 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C07K 14/705 (2006.01)

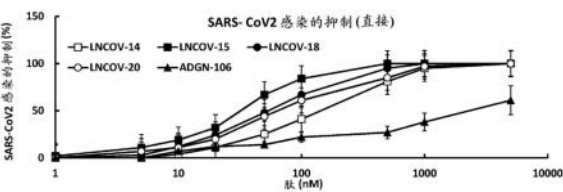
权利要求书3页 说明书77页  
序列表74页 附图40页

(54) 发明名称

用于治疗病毒感染的组合物和方法

(57) 摘要

本申请提供了可用于治疗病毒(例如,SARS-CoV-2)感染的肽和核酸。示例性肽包括嵌合肽和阻断SPIKE与ACE2之间的相互作用的阻断肽。示例性核酸包括特异性地靶向SARS-CoV-2的siRNA。本申请还提供复合物和纳米颗粒,所述复合物和纳米颗粒还包含促进所述肽和核酸的细胞内递送的第二肽(例如,细胞穿透肽)。



1. 一种嵌合肽,其包含与稳定肽连接的阻断肽,其中所述阻断肽特异性地阻断SPIKE与ACE2之间的相互作用,并且其中所述稳定肽使所述阻断肽的二级或三级结构稳定。

2. 如权利要求1所述的嵌合肽,其中所述阻断肽包含在SPIKE的受体结合结构域(RBD)内的环序列。

3. 如权利要求2所述的嵌合肽,其中所述环序列具有不超过约20个氨基酸的长度。

4. 如权利要求3所述的嵌合肽,其中所述环序列具有约7个氨基酸至约18个氨基酸的长度。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的嵌合肽,其中所述阻断肽包含在C端的赖氨酸(K)。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的嵌合肽,其中所述环序列选自由SEQ ID NO:1-11和42-46组成的组。

7. 如权利要求6所述的嵌合肽,其中所述环序列选自由SEQ ID NO:1、6、8-11、42和45组成的组。

8. 如权利要求1所述的嵌合肽,其中所述阻断肽包含源自ACE2的胞外域内的序列的序列。

9. 如权利要求8所述的嵌合肽,其中所述阻断肽包含选自由SEQ ID NO:23-31和47-52组成的组的序列。

10. 如权利要求9所述的嵌合肽,其中所述阻断肽包含选自由SEQ ID NO:23、24、26-28、31和47-52组成的组的序列。

11. 如权利要求2-10所述的嵌合肽,其中所述环序列是环状的。

12. 如权利要求1-11中任一项所述的嵌合肽,其中所述稳定肽连接至所述阻断肽的C端。

13. 如权利要求1-11中任一项所述的嵌合肽,其中所述稳定肽连接至所述阻断肽的N端。

14. 如权利要求12或权利要求13所述的嵌合肽,其中所述稳定肽具有约12个氨基酸至约30个氨基酸的长度。

15. 如权利要求8-14中任一项所述的嵌合肽,其中所述阻断肽和所述稳定肽各自包含源自ACE2的序列。

16. 如权利要求15所述的嵌合肽,其中所述稳定肽包含SEQ ID NO:49或50中所列的序列。

17. 如权利要求1-14中任一项所述的嵌合肽,其中所述稳定肽包含两亲性螺旋结构。

18. 如权利要求17所述的嵌合肽,其中所述稳定肽包含ADGN-100肽或VEPEP-6肽。

19. 如权利要求18所述的嵌合肽,其中所述稳定肽包含SEQ ID NO:53-107中任一个中所列的序列。

20. 如权利要求19所述的嵌合肽,其中所述稳定肽包含SEQ ID NO:55或97中所列的序列。

21. 如权利要求1-20中任一项所述的嵌合肽,其中所述阻断肽和所述稳定肽通过接头连接。

22. 如权利要求21所述的嵌合肽,其中所述接头选自由以下组成的组:脯氨酸、聚甘氨酸接头部分、PEG部分、Aun、Ava和Ahx。

23. 如权利要求19所述的嵌合肽,其中所述PEG部分由约两个至约七个乙二醇单元组成。

24. 如权利要求1-23中任一项所述的嵌合肽,其中所述嵌合肽包含SEQ ID NO:12-22、27、28和31-41中任一个的氨基酸序列。

25. 如权利要求24所述的嵌合肽,其中所述嵌合肽包含选自由SEQ ID NO:12、17、19-22、27、28、31-33、35和38-40组成的组的氨基酸序列。

26. 一种非天然存在的肽,其包含SEQ ID NO:12-22、24-41和151-160中任一个的氨基酸序列。

27. 如权利要求26所述的非天然存在的肽,其中所述肽包含SEQ ID NO:12、17、19-22、24、26-28、31-33、35、38-40、151、156和158-160中任一个的氨基酸序列。

28. 如权利要求26或27所述的非天然存在的肽,其中所述肽具有不超过约100个氨基酸的长度。

29. 一种siRNA,其包含选自由SEQ ID NO:161-180组成的组的核酸序列。

30. 如权利要求29所述的siRNA,其中所述siRNA包含SEQ ID NO:163、170、166或168中所列的核酸序列。

31. 一种复合物,其包含a) 包含如权利要求1-25中任一项所述的嵌合肽、如权利要求26或27所述的肽,或如权利要求28或权利要求29所述的siRNA的运载物,和b) 第二肽,其中所述肽或siRNA与所述第二肽复合。

32. 如权利要求31所述的复合物,其中所述第二肽是选自由以下组成的组的细胞穿透肽:CADY、PEP-1肽、PEP-2肽、PEP-3肽、LNCOV肽、VEPEP-3肽、VEPEP-6肽、VEPEP-9肽和ADGN-100肽。

33. 如权利要求31或权利要求32所述的复合物,其中所述第二肽与所述肽或siRNA的摩尔比介于约1:1与约80:1之间。

34. 如权利要求33所述的复合物,其中所述第二肽与所述肽的摩尔比介于约2:1至约10:1之间。

35. 如权利要求34所述的复合物,其中所述第二肽与所述siRNA的摩尔比介于约5:1至约50:1之间。

36. 如权利要求31-35中任一项所述的复合物,其中所述复合物包含a) 如权利要求1-25中任一项所述的嵌合肽或如权利要求26-28中任一项所述的肽,和/或b) 权利要求29或权利要求30所述的siRNA。

37. 如权利要求36所述的复合物,其中所述siRNA包含SEQ ID NO:166中所列的核酸序列。

38. 如权利要求37所述的复合物,其中所述复合物包含嵌合肽,所述嵌合肽包含SEQ ID NO:17或33中所列的氨基酸序列。

39. 一种纳米颗粒,其包含如权利要求30-38中任一项所述的复合物。

40. 如权利要求39所述的纳米颗粒,其中所述纳米颗粒具有不超过约100nm的直径。

41. 如权利要求40所述的纳米颗粒,其中所述纳米颗粒具有约40至约60nm的直径。

42. 一种药物组合物,其包含a) 如权利要求1-25中任一项所述的嵌合肽、如权利要求26-28中任一项所述的肽、如权利要求29或权利要求30所述的siRNA、如权利要求31-41中任

一项所述的复合物或纳米颗粒,和b)药学上可接受的载体。

43.如权利要求42所述的药物组合物,其中所述组合物包含两种或更多种复合物或纳米颗粒,其中所述两种或更多种复合物或纳米颗粒包含不同的运载物。

44.一种制备如权利要求31-41中任一项所述的复合物或纳米颗粒的方法,所述方法包括将所述运载物与所述第二肽组合。

45.一种治疗个体的SARS-CoV-2感染的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的如权利要求42或权利要求43所述的药物组合物。

46.如权利要求45所述的方法,其中所述药物组合物通过雾化或局部肺或鼻递送来施用。

47.如权利要求45或权利要求46所述的方法,其中所述个体是人。

## 用于治疗病毒感染的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年7月24日提交的法国申请号FR2007849的优先权,所述申请的内容出于所有目的以引用的方式整体并入。

[0003] 关于ASCII文本文件的序列表的提交

[0004] 关于ASCII文本文件的以下提交的内容以引用的方式整体并入本文:序列表的计算机可读形式(CRF)(文件名:737372001341SEQL IST.TXT,记录日期:2021年7月23日,大小:59KB)。

### 技术领域

[0005] 本申请涉及用于治疗病毒(例如,SARS-CoV-2)感染的抑制肽、核酸(例如,siRNA)、复合物、纳米颗粒和组合物。

### 背景技术

[0006] 新型人类冠状病毒SARS-CoV-2的出现已引起全球范围内的呼吸道疾病流行(COVID-19)。目前缺乏用于治疗这种疾病的疫苗和靶向治疗剂。

[0007] 本文所提及的所有公布、专利、专利申请和公布的专利申请的公开内容特此以引用的方式整体并入本文。

### 发明内容

[0008] 本申请在一个方面提供了一种嵌合肽,所述嵌合肽包含与稳定肽连接的阻断肽,其中所述阻断肽特异性地阻断刺突糖蛋白(“SPIKE”)与血管紧张素转化酶2(“ACE2”)之间的相互作用,并且其中所述稳定肽使所述阻断肽的二级或三级结构稳定。在一些实施方案中,阻断肽包含在SPIKE的受体结合结构域(RBD)内的环序列。在一些实施方案中,环序列具有不超过约20个氨基酸的长度。在一些实施方案中,环序列具有约7个氨基酸至约18个氨基酸的长度。

[0009] 在根据任何上述嵌合肽的一些实施方案中,阻断肽在C端包含赖氨酸(K)。

[0010] 在根据任何上述嵌合肽的一些实施方案中,环序列选自SEQ ID NO:1-11和42-46组成的组。在一些实施方案中,环序列选自SEQ ID NO:1、6、8-11、42和45组成的组。

[0011] 在根据任何上述嵌合肽的一些实施方案中,阻断肽包含源自ACE2的胞外域内的序列的序列。在一些实施方案中,阻断肽包含选自SEQ ID NO:23-31和47-52组成的组的序列。在一些实施方案中,阻断肽包含选自SEQ ID NO:23、24、26-28、31和47-52组成的组的序列。

[0012] 在根据任何上述嵌合肽的一些实施方案中,环序列是环状的。

[0013] 在根据任何上述嵌合肽的一些实施方案中,稳定肽连接至所述阻断肽的C端。

[0014] 在根据任何上述嵌合肽的一些实施方案中,稳定肽连接至所述阻断肽的N端。

[0015] 在根据任何上述嵌合肽的一些实施方案中,稳定肽具有约12个氨基酸至约30个氨

基酸的长度。

[0016] 在根据任何上述嵌合肽的一些实施方案中,阻断肽和所述稳定肽各自包含源自ACE2的序列。在一些实施方案中,稳定肽包含SEQ ID NO:49或50中所列的序列。

[0017] 在根据任何上述嵌合肽的一些实施方案中,稳定肽包含两亲性螺旋结构。在一些实施方案中,稳定肽包含ADGN-100肽或VEPEP-6肽。在一些实施方案中,稳定肽包含SEQ ID NO:53-107中任一个中所列的序列。在一些实施方案中,稳定肽包含SEQ ID NO:55或97中所列的序列。

[0018] 在根据任何上述嵌合肽的一些实施方案中,阻断肽和所述稳定肽通过接头连接。在一些实施方案中,接头选自由以下组成的组:脯氨酸、聚甘氨酸接头部分、PEG部分、Aun、Ava和Ahx。在一些实施方案中,PEG部分由约两个至约七个乙二醇单元组成。

[0019] 在根据任何上述嵌合肽的一些实施方案中,嵌合肽包含SEQ ID NO:12-22、27、28和31-41中任一个的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合肽包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:12、17、19-22、27、28、31-33、35和38-40。

[0020] 本申请在另一个方面提供了一种非天然存在的肽,所述非天然存在的肽包含SEQ ID NO:12-22、24-41和151-160中任一个的氨基酸序列。在一些实施方案中,肽包含SEQ ID NO:12、17、19-22、24、26-28、31-33、35、38-40、151、156和158-160中任一个的氨基酸序列。

[0021] 本申请在另一个方面提供了一种siRNA,所述siRNA包含选自由SEQ ID NO:161-180组成的组的核酸序列。在一些实施方案中,siRNA包含SEQ ID NO:163、166或168或170中所列的核酸序列。

[0022] 本申请在另一个方面提供了一种复合物,所述组合物包含a) 包含任何上述肽或siRNA的运载物,和b) 第二肽,其中所述肽或siRNA与所述第二肽复合。在一些实施方案中,第二肽是选自由以下组成的组的细胞穿透肽:CADY、PEP-1肽、PEP-2肽、PEP-3肽、LNCOV肽、VEPEP-3肽、VEPEP-6肽、VEPEP-9肽和ADGN-100肽。在一些实施方案中,第二肽与所述肽或siRNA的摩尔比介于约1:1与约80:1之间。在一些实施方案中,第二肽与所述肽的摩尔比介于约2:1至约10:1之间。在一些实施方案中,第二肽与所述siRNA的摩尔比介于约5:1至约50:1之间。在一些实施方案中,复合物包含a) 如权利要求1-25中任一项所述的嵌合肽、如权利要求26或27所述的肽,b) 权利要求28或权利要求29所述的siRNA。在一些实施方案中,siRNA包含SEQ ID NO:166中所列的核酸序列。在一些实施方案中,复合物包含嵌合肽,所述嵌合肽包含SEQ ID NO:17或33中所列的氨基酸序列。

[0023] 本申请在另一个方面提供了一种包含任何上述复合物的纳米颗粒。在一些实施方案中,纳米颗粒具有不超过约100nm的直径。在一些实施方案中,纳米颗粒具有约40至约60nm的直径。

[0024] 本申请在另一个方面提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含a) 任何上述肽、siRNA、复合物或纳米颗粒,和b) 药学上可接受的载体。在一些实施方案中,组合物包含两种或更多种复合物或纳米颗粒,其中所述两种或更多种复合物或纳米颗粒包含不同的运载物。

[0025] 本申请在另一个方面提供了一种制备任何上述复合物或纳米颗粒的方法,所述方法包括将所述运载物与所述第二肽组合。

[0026] 本申请在另一个方面提供了一种治疗个体的SARS-COV-2感染的方法,所述方法包

括施用有效量的任何上述药物组合物。在一些实施方案中,药物组合物通过雾化或局部肺或鼻递送来施用。在一些实施方案中,个体是人。

## 附图说明

[0027] 图1A-1D示出与ACE2结合的SARS-CoV-2受体结合结构域(RBD)的总体结构。所述结构是由Lan等人(Nature第581卷,第215-220页(2020))报道的基于与细胞受体ACE2结合的SARS-CoV-2的刺突蛋白的RBD的晶体结构。在图1A和图1B中,SARS-CoV-2RBM结构域与ACE2蛋白的N端螺旋相互作用的部分呈浅灰色。在图1C和1D中,突出显示了与SARS-CoV-2 RBD结构域相互作用的ACE2结构域。与SARS-CoV-2 RBD的RBM结构域接触的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 螺旋呈浅灰色。

[0028] 图2A-2E示出所选肽抑制剂的结构组构。使用Peplook-Zultim程序确定每个螺旋肽的结构动态和稳定性分析。ADGN肽呈黑色,并且抑制肽呈浅灰色。形成主要相互作用的残基以棒状形式报告。

[0029] 图3A-3B示出在ACE2:SARS-CoV-2刺突抑制剂测定中筛选的肽抑制剂。不同的肽在一系列浓度(0.1nM-10 $\mu$ M)中作为游离肽(图3A)或在以5/1摩尔比与ADGN-106形成的纳米颗粒复合物内进行评估(图3B)。结果对应于3个单独实验的平均值。

[0030] 图4A-4B示出在SARS-CoV-2刺突:ACE2抑制剂测定中筛选的肽抑制剂。不同的肽在一系列浓度(0.1nM-10 $\mu$ M)中作为游离肽(图4A)或在以5/1摩尔比与ADGN-106形成的纳米颗粒复合物内进行评估(图4B)。结果对应于3个单独实验的平均值。

[0031] 图5A-5D示出关于SARS-CoV-2病毒感染对肽抑制剂的评价。在感染前一天将细胞涂铺在96孔中。肽溶液在DMSO/水(2%)中制备,并从5mM的储备液稀释。将具有不同稀释浓度的肽在即将病毒感染前直接添加至单层Vero-E6细胞中(图5C),或与SARS-CoV-2混合30分钟,然后添加至单层Vero-E6细胞中(图5A)。ADGN-106、羟基-氯喹和缓冲液用作对照,并且所有处理一式三份进行。72小时后测量抑制百分比和细胞病变效应。使用CellTiter-Glo测定在Vero-6细胞上分析了不同肽的细胞毒性(图5B和5D)。

[0032] 图6A-6B示出靶向SARS-CoV-2核衣壳基因的siRNA的评估。用pcDNA3.1(+)-N-eGFP-NP质粒转染H1299肺上皮细胞,所述质粒编码用eGFP标记的SARS-COV-2核衣壳。然后用以摩尔比1/20与ADGN-100复合的siRNAs(1nM至200nM)处理细胞。靶向eGFP的siRNA和scr-siRNA分别用作阳性对照和阴性对照。转染后48小时评估核衣壳-eGFP蛋白的水平(图6A),并使用CellTiter Glow试剂盒在GlowMax上测定毒性(图6B)。

[0033] 图7A-7B示出靶向SARS-CoV-2ORF3a基因的siRNA的评估。用pcDNA3.1(+)-N-eGFP-ORF3a质粒转染H1299肺上皮细胞,所述质粒编码用eGFP标记的SARS-COV-2ORF3a。然后用以摩尔比1/20与ADGN-100复合的siRNA(1nM至200nM)处理细胞。靶向eGFP的siRNA和scr-siRNA分别用作阳性对照和阴性对照。转染后48小时评估ORF3A-eGFP蛋白的水平(图7A),并使用CellTiter Glow试剂盒在GlowMax上测定毒性(图7B)。

[0034] 图8A-8B示出靶向SARS-CoV-2ORF8基因的siRNA的评估。用pcDNA3.1(+)-N-eGFP-ORF8质粒转染H1299肺上皮细胞,所述质粒编码用eGFP标记的SARS-COV-2ORF8。然后用以摩尔比1/20与ADGN-100复合的siRNA(1nM至200nM)处理细胞。靶向eGFP的siRNA和scr-siRNA分别用作阳性对照和阴性对照。转染后48小时评估ORF8-eGFP蛋白的水平(图8A),并使用CellTiter Glow试剂盒在GlowMax上测定毒性(图8B)。

[0035] 图9A-9B示出关于SARS-CoV-2病毒感染对siRNA的评价。感染前一天将细胞涂铺在96孔中。将siRNA以摩尔比1/20与ADGN-100复合。在即将病毒感染前将具有不同稀释浓度的siRNA/ADGN-100直接添加至单层Vero-E6细胞(图9A)。ADGN-100和缓冲液用作对照,并且所有处理一式三份进行。72小时后测量抑制百分比和细胞病变效应。使用CellTiter-Glo测定在Vero-6细胞上分析了不同siRNA/ADGN复合物的细胞毒性(图9B)。

[0036] 图10示出关于SARS-CoV-2病毒感染对siRNA/抑制剂肽的评价。感染前一天将细胞涂铺在96孔中。siRNA溶液在DMSO/水(2%)中制备,并从5mM的储备液稀释。将siRNA/ADGN-100复合物和具有不同稀释浓度的LNCOV-15或LNCOV-18肽在病毒感染前直接添加至单层Vero-E6细胞中。ADGN-100和缓冲液用作对照,并且所有处理一式三份进行。72小时后测量抑制百分比和细胞病变效应。

[0037] 图11A示出对与LNCOV肽复合的靶向SARS-CoV-2核衣壳基因的DIVC-6 siRNA的评估。用pcDNA3.1(+)-N-eGFP-NP质粒转染H1299肺上皮细胞,所述质粒编码用eGFP标记的SARS-CoV-2核衣壳。然后用以摩尔比1/20与ADGN-100、LNCOV-15和LNCOV-18复合的siRNA(1nM至200nM)处理细胞。scr-siRNA分别用作阳性对照和阴性对照。转染后48小时评估核衣壳-eGFP蛋白的水平。

[0038] 图11B示出具有有所指示的二级结构的VEPEP-9肽。“H”代表“螺旋”,并且“t”代表转角。图12A-D示出肽抑制剂对ACE2:SARS-CoV-2刺突抑制剂测定的影响。在一系列浓度(0.1nM-10 $\mu$ M)下评估了不同的肽。在四种不同的SARS-CoV-2刺突蛋白变体上评估了肽抑制,所述变体含有主要突变,包括 $\alpha$ (图12A)、 $\beta$ (图12B)、 $\gamma$ (图12C)和 $\delta$ (图12D)变体摩尔比(图3B)。结果对应于3个单独实验的平均值。

[0039] 图12A-12E示出肽抑制剂对ACE2:SARS-CoV-2刺突抑制剂测定的影响。在一系列浓度(0.1nM-10 $\mu$ M)下评估了不同的肽。在四种不同的SARS-CoV-2刺突蛋白变体上评估了肽抑制,所述变体含有主要突变,包括 $\alpha$ (图12A)、 $\beta$ (图12B)、 $\gamma$ (图12C)、 $\delta$ (图12D)和 $\epsilon$ (图12E)变体。结果对应于3个单独实验的平均值。

[0040] 图13A-13C示出关于SARS-CoV-2变体病毒感染对肽抑制剂的评价。在感染前一天将细胞涂铺在96孔中。在Vero E6细胞上进行抗病毒测定。通过在含有Seq17、Seq28或Seq33肽(浓度范围从10nM至1 $\mu$ M)或6 $\mu$ M瑞德西韦(阳性对照RMD)或无抗病毒分子(阴性对照;“T-”)的培养基中温育1小时将细胞用SARS-CoV-2 $\alpha$ (图13A)或 $\beta$ (FIG13B)或 $\delta$ (图13c)变体以MOI 0.001一式三份感染。肽溶液在DMSO/水(2%)中制备,并从5mM的储备液稀释。感染后24小时收获上清液,并且病毒滴度通过TCID50方法在Vero E6细胞上测定并通过Spearman和Kärber算法计算。

[0041] 图14A-14C示出关于SARS-CoV2变体病毒感染对siRNA/抑制剂肽的评价。感染前一天将细胞涂铺在96孔中。siRNA溶液在DMSO/水(2%)中制备,并从5mM的储备液稀释。将siRNA/ADGN-100复合物和具有不同稀释浓度的LNCOV-15、LNCOV-20或LNCOV-18肽在病毒感染前直接添加至单层Vero-E6细胞中。6 $\mu$ M的瑞德西韦(阳性对照RMD)或无抗病毒分子(阴性对照;“T-”)。肽溶液在DMSO/水(2%)中制备,并从5mM的储备液稀释。感染后24小时收获上清液,并且病毒滴度通过TCID50方法在Vero E6细胞上测定并通过Spearman和Kärber算法计算。

[0042] 图15A-15E示出SARS-CoV-2的肽和肽/siRNA抑制剂的体内肺生物分布。所述研究

在健康4周龄雄性C57BL/6J小鼠中进行。单剂量的肽或肽/siRNA复合物通过气管内滴注(200 $\mu$ g)施用。在T0、滴注后1小时、2小时、6小时、24小时、48小时和72小时通过无创体内全身荧光成像评估荧光(图15A)。在滴注后6小时、12小时、48小时和72小时在器官上观察到离体荧光信号。通过使用Living image软件从荧光图像获得半定量数据。

[0043] 图16A-16B示出用SARS-COV-2的肽和肽/siRNA抑制剂处理的肺的共聚焦显微镜分析。所述研究在健康4周龄雄性C57BL/6J小鼠中进行。单剂量的肽或肽/siRNA复合物通过气管内滴注(200 $\mu$ g)施用。在施用后4小时、24小时和72小时收集肺,固定在葡萄糖5%中的甲醛4%中。将组织用Mito追踪剂红染色,并将细胞核用Hoesch染色。

[0044] 图17示出用SARS-COV-2的肽和肽/siRNA抑制剂处理的肺的定量共聚焦显微镜分析。所述研究在健康4周龄雄性C57BL/6J小鼠中进行。单剂量的肽或肽/siRNA复合物通过气管内滴注(200 $\mu$ g)施用。在施用后4小时、24小时和72小时收集肺,固定在葡萄糖5%中的甲醛4%中。将组织用Mito追踪剂红染色,并将细胞核用Hoesch染色。对于对数转换数据使用多重比较的单因素ANOVA,其中\*\*\*P=0.0005,\*\*P=0.001并且\*P=0.0011;NS,不显著。

[0045] 图18A-18G示出SARS-COV2抑制剂的体内表征、体重和器官重量分析。在气管内滴注前(第0天)、第1天、第2天和处死前(第3天)记录小鼠的体重。在第3天收集肺、肝、心脏、肾和脑并测定器官指数。

[0046] 图19A-19C示出肽和肽/siRNA复合物处理后的支气管肺泡灌洗分析。滴注后2天进行BAL。分析了BAL中细胞的百分比、总蛋白质和LDH水平。将结果与用作阴性对照的盐水缓冲液进行比较。

[0047] 图20A-20B示出肽和肽/siRNA复合物处理后的AST和ALT血液分析。单剂量的肽或肽/siRNA复合物通过气管内滴注(200 $\mu$ g)施用。盐水溶液用作阴性对照。滴注后2天测定血浆中的AST和ALT水平。

## 具体实施方式

[0048] 本申请在一个方面提供了新型抑制肽(即阻断肽),所述抑制肽阻断冠状病毒(如SARS-CoV-2)的刺突糖蛋白(SPIKE)与个体(如人)的各种细胞类型(如肺细胞)上表达的ACE2之间的相互作用。如实施例部分所示,示例性抑制肽在体外和感染细胞上有效阻断SPIKE与ACE2之间的相互作用。

[0049] 在一些实施方案中,抑制肽是嵌合肽,所述嵌合肽包含与稳定肽连接的阻断肽,其中所述稳定肽使所述阻断肽的二级或三级结构稳定。不受理论束缚,观察到采用两亲性螺旋结构的肽使螺旋阻断肽稳定,其主要涉及位于螺旋同一侧上的芳香族残基(例如,色氨酸基团残基)和静电相互作用。还观察到具有环序列的阻断肽的环化使阻断肽稳定,并且将环化的阻断肽与稳定肽融合进一步使阻断肽稳定。如实施例所示,示例性肽(如包含SEQ ID NO:17、28或33中所列的序列的肽)表现出有效抗病毒作用和穿透肺的能力。

[0050] 本申请在另一个方面提供了靶向SARS-CoV-2的新型核酸(siRNA)。在一些实施方案中,siRNA包含SEQ ID NO:163、166或170中所列的核酸序列。

[0051] 本申请在另一个方面提供了包含本文所述的任何抑制肽或核酸的复合物和纳米颗粒。在一些实施方案中,复合物或纳米颗粒包含第二肽,其中所述第二肽与任何一种或多

种抑制肽和/或核酸(如siRNA)复合。据观察,基于抑制肽和/或沉默RNA的复合物和纳米颗粒中和SARS-CoV-2细胞进入并通过递送沉默RNA来防止病毒产生。总之,本文所述的抑制肽、核酸、复合物、纳米颗粒提供了针对COVID-19疾病的简单且有效的治疗剂。

[0052] 本申请还提供了通过施用本文所述的嵌合肽、肽、siRNA、复合物和/或纳米颗粒来治疗COVID-19的方法。

[0053] I. 定义

[0054] 术语“非天然存在的”、“合成的”或“工程化的”可互换使用并且表示人为参与。这些术语,当指核酸分子或多肽时,表示该核酸分子或多肽至少基本上从它们在自然界中或如发现于自然界中的与其结合的至少另一种组分游离出来。

[0055] 如本文可互换使用的“多核苷酸”或“核酸”是指具有任何长度的核苷酸的聚合物,并且包括DNA和RNA。核苷酸可为脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经修饰核苷酸或碱基和/或其类似物或可通过DNA或RNA聚合酶并入聚合物中的任何底物。多核苷酸可包含经修饰的核苷酸,如甲基化核苷酸及其类似物。如本文所使用的术语“核酸”是指以单链或双链形式含有至少两个脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的聚合物并且包括DNA和RNA。DNA可呈以下形式:例如反义分子、质粒DNA、预先缩合的DNA、PCR产物、载体(PAC、BAC、YAC、人工染色体)、表达盒、嵌合序列、染色体DNA或这些组的衍生物和组合。RNA可呈以下形式:siRNA、不对称干扰RNA(aiRNA)、微小RNA(miRNA)、mRNA、tRNA、rRNA、RNA、病毒RNA(vRNA)以及它们的组合。核酸包括含有已知核苷酸类似物或经修饰的主链残基或键联的核酸,包括例如锁核酸(LNA)、解锁核酸(UNA)和拉链核酸(ZNA),它们可以是合成的、天然存在的和非天然存在的,并且具有与参考核酸相似的结合特性。此类类似物的实例包括,但不限于,硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、膦酸甲酯、手性膦酸甲酯、2'-O-甲基核糖核苷酸和肽-核酸(PNA)。除非确切地限制,否则术语涵盖具有与参考核酸类似的结合性质的含有天然核苷酸的已知类似物的核酸。除非另外指明,否则特定核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如,简并密码子取代)、等位基因、直向同源物、SNP和互补序列以及明确指明的序列。具体地说,简并密码子取代可通过产生其中一个或多个选择的(或所有)密码子的第三位置被混合型碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现(Batzer等人,Nucleic Acid Res.,19:5081(1991);Ohtsuka等人,j.Biol.Chern.,260:2605-2608(1985);Rossolini等人,Mol.Cell.Probes,8:91-98(1994))。“核苷酸”含有糖脱氧核糖(DNA)或核糖(RNA)、碱基和磷酸酯基团。核苷酸通过磷酸酯基团连接在一起。“碱基”包括嘌呤和嘧啶,所述嘌呤和嘧啶进一步包括天然化合物腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、肌苷和天然类似物;以及嘌呤和嘧啶的合成衍生物,其包括但不限于放置新反应性基团如但不限于胺、醇、硫醇、羧酸酯和烷基卤化物的修饰。如本文所用的“寡核苷酸”通常是指短的、通常合成的多核苷酸,所述多核苷酸的长度通常但不必少于约200个核苷酸。术语“寡核苷酸”和“多核苷酸”并非相互排斥的。对于多核苷酸的以上描述同样地并且完全地适用于寡核苷酸。

[0056] 术语“受试者”、“个体”和“患者”可在本文中互换使用,以指脊椎动物,优选哺乳动物,更优选人。哺乳动物包括但不限于鼠类、猿、人类、农场动物、运动动物和宠物。还涵盖在体内获得或在体外培养的生物实体的组织、细胞和它们的后代。

[0057] 术语“治疗剂(therapeutic agent)”、“可用于治疗的试剂(therapeutic capable agent)”或“处理剂(treatment agent)”可互换地使用,并且是指在施用于受试者时赋予某

种有益效果的分子或化合物。有益效果包括实现诊断确定；疾病、症状、病症或病理状况的改善；减少或预防疾病、症状、病症或疾患的发作；并且通常抵消疾病、症状、病症或病理状况。

[0058] 如本文所用，“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”是用于获得有益或所需结果(包括临床结果)的方法。出于本发明的目的，有益的或所需的临床结果包括但不限于以下中的一项或多项：减轻由疾病引起的一种或多种症状(例如，降低病毒载量，或与同样感染病毒的未治疗个体相比减缓病毒载量的增加)、降低疾病的程度(例如，减少感染的进程，如减少感染的发作，减少个体在重症监护室(ICU)或呼吸机中的天数)、稳定疾病(例如，预防或延迟疾病的恶化)、预防或延迟疾病的传播、预防或延迟疾病的复发、延迟或减缓疾病的进展、改善疾病状态、提供疾病的缓解(部分或完全)、减少治疗疾病所需的一种或多种其它药物的剂量、延迟疾病的进展、提高或改善生活质量、增加体质和/或延长存活期。“治疗”还涵盖减轻疾病的病理后果(如，例如冠状病毒感染中的呼吸道症状)。本发明的方法考虑这些治疗方面中的任何一种或多种。

[0059] 术语“有效量”或“治疗有效量”是指剂的足以实现有益或希望的结果的量。治疗有效量可依赖于正治疗的受试者和疾病状况、受试者的重量和年龄、疾病病况的严重度、施用方式等中的一项或多项而改变，并且可由本领域普通技术人员容易地确定。所述术语还适用于将提供用于通过本文描述的成像方法中的任一种进行检测的图像的剂量。具体的剂量可取决于所选的特定剂、遵循的给药方案、是否是与其它化合物组合施用、施用时机、待成像的组织 and 携带其的物理递送系统中的一项或多项而变化。

[0060] 如本文所用，“药学上可接受的”或“药理学上相容的”意指不是生物学上或其它方面不希望的材料，例如，所述材料可掺入至施用至患者的药物组合物中而不会以有害的方式与包含其的组合物的任何其它组分引起任何显著不希望的生物作用或相互作用。药学上可接受的载体或赋形剂优选地符合毒理学和生产测试所要求的标准，和/或包括由美国食品与药品管理局制定的非活性成分指南(Inactive Ingredient Guide)中。

[0061] 如本文所用，“药学上可接受的”或“药理学上相容的”意指不是生物学上或其它方面不希望的材料，例如，所述材料可掺入至施用至患者的药物组合物中而不会以有害的方式与包含其的组合物的任何其它组分引起任何显著不希望的生物作用或相互作用。药学上可接受的载体或赋形剂优选地符合毒理学和生产测试所要求的标准，和/或包括由美国食品与药品管理局制定的非活性成分指南(Inactive Ingredient Guide)中。

[0062] 应理解，本文所述的本发明的实施方案包括“由实施方案组成”和/或“基本上由实施方案组成”。

[0063] 如本文所使用，除非另外指出，否则单数形式“一个/一种(a/an)”和“所述(the)”包括复数个指示物。

[0064] 本文中对“约”某一个值或参数的提及包括(以及描述)针对所述值或参数本身的实施方案。例如，关于“约X”的描述包括“X”的描述。

[0065] 本申请的组合物和方法可包含以下、由或基本上由以下组成：本文所述的申请的基本要素和限制以及本文所述的或其它有用的任何额外或任选的成分、组分或限制。

[0066] 除非另有说明，否则根据常规用法使用技术术语。

[0067] 嵌合多肽

[0068] 本申请提供了嵌合肽,所述嵌合肽包含与稳定肽连接的阻断肽,其中所述阻断肽特异性地阻断SPIKE与ACE2之间的相互作用,并且其中所述稳定肽使所述阻断肽的二级或三级结构稳定。

[0069] 在一些实施方案中,嵌合肽具有约5至约100个氨基酸(如约10至约80个氨基酸、约10至约70个氨基酸、约10至约60个氨基酸、约10至约50个氨基酸)的长度。

[0070] 在一些实施方案中,提供了包含连接至稳定肽的阻断肽的嵌合肽,其中所述阻断肽特异性地阻断SPIKE与ACE2之间的相互作用,并且包含SPIKE的受体结合结构域(RBD)内的环序列,并且其中所述稳定肽包含两亲性螺旋。在一些实施方案中,稳定肽选自自由以下组成的组:CADY、VEPEP-106肽、ADGN-100肽和VEPEP-109肽。在一些实施方案中,稳定肽连接至阻断肽的C端。在一些实施方案中,环序列具有不超过约20个氨基酸(如约7-18个氨基酸)的长度。在一些实施方案中,阻断肽包含在C端处的赖氨酸(K)。在一些实施方案中,环序列是环状的。在一些实施方案中,环序列选自自由SEQ ID NO:1-11和42-46组成的组。在一些实施方案中,环序列选自自由SEQ ID NO:1、6、8-11、42和45组成的组。在一些实施方案中,阻断肽和稳定肽通过接头连接。在一些实施方案中,接头选自自由以下组成的组:脯氨酸、聚甘氨酸接头部分、PEG部分、Aun、Ava和Ahx。

[0071] 在一些实施方案中,提供了包含连接至稳定肽的阻断肽的嵌合肽,其中所述阻断肽特异性地阻断SPIKE与ACE2之间的相互作用,并且包含源自ACE2的胞外域内的序列的序列,并且其中所述稳定肽包含两亲性螺旋。在一些实施方案中,稳定肽选自自由以下组成的组:CADY、VEPEP-106肽、ADGN-100肽和VEPEP-109肽。在一些实施方案中,稳定肽连接至阻断肽的C端。在一些实施方案中,阻断肽包含选自自由SEQ ID NO:23-31和47-52组成的组的序列。在一些实施方案中,阻断肽包含选自自由SEQ ID NO:23、24、26-28、31和47-52组成的组的序列。在一些实施方案中,阻断肽和稳定肽通过接头连接。在一些实施方案中,接头选自自由以下组成的组:脯氨酸、聚甘氨酸接头部分、PEG部分、Aun、Ava和Ahx。

[0072] 在一些实施方案中,提供了包含连接至稳定肽的阻断肽的嵌合肽,其中所述阻断肽包含选自自由SEQ ID NO:1、6、8-11、23、24、26-28、31 42、45和47-52组成的组的序列,其中所述稳定肽包含ADGN-100肽或VEPEP-6肽。在一些实施方案中,阻断肽和稳定肽通过接头连接。在一些实施方案中,接头选自自由以下组成的组:脯氨酸、聚甘氨酸接头部分、PEG部分、Aun、Ava和Ahx。

[0073] 在一些实施方案中,提供了包含连接至稳定肽的阻断肽的嵌合肽,其中所述阻断肽包含选自自由SEQ ID NO:1、6和8-11组成的组的序列,其中所述稳定肽包含SEQ ID NO:55或97的氨基酸序列。在一些实施方案中,阻断肽是环状的。在一些实施方案中,阻断肽和稳定肽通过接头连接。在一些实施方案中,接头选自自由以下组成的组:脯氨酸、聚甘氨酸接头部分、PEG部分、Aun、Ava和Ahx。

[0074] 在一些实施方案中,提供了包含连接至稳定肽的阻断肽的嵌合肽,其中所述阻断肽包含选自自由SEQ ID NO:151、156和158-160组成的组的环状肽,其中所述稳定肽包含SEQ ID NO:55或97的氨基酸序列。在一些实施方案中,阻断肽和稳定肽通过接头连接。在一些实施方案中,接头选自自由以下组成的组:脯氨酸、聚甘氨酸接头部分、PEG部分、Aun、Ava和Ahx。

[0075] 在一些实施方案中,提供了包含连接至稳定肽的阻断肽的嵌合肽,其中所述阻断肽包含选自自由SEQ ID NO:23、24、26-28、31和47-52组成的组的序列,其中所述稳定肽包含

SEQ ID NO:55或97的氨基酸序列。在一些实施方案中,阻断肽包含选自由SEQ ID NO:23、24、26-28和31组成的组的序列。在一些实施方案中,阻断肽和稳定肽通过接头连接。在一些实施方案中,接头选自由以下组成的组:脯氨酸、聚甘氨酸接头部分、PEG部分、Aun、Ava和Ahx。

[0076] 在一些实施方案中,提供了嵌合肽,所述嵌合肽包含SEQ ID NO:17、20、21、27、28、33、39和40中所列的氨基酸序列。

[0077] 阻断肽

[0078] 本申请提供阻断肽和包含如本文所述的阻断肽和稳定肽的嵌合肽。

[0079] 在一些实施方案中,阻断肽包含SPIKE的受体结合结构域(RBD)内的环序列或源自ACE2(如人ACE2)的胞外域内的序列(如环序列、 $\alpha$ 螺旋、 $\beta$ 链或它们的组合)的序列。本文所述的环序列选自SPIKE或ACE蛋白的结构并且位于可以是 $\beta$ 链或 $\alpha$ 螺旋的两个二级结构基序之间。环序列可被环化。

[0080] 在一些实施方案中,环序列具有不超过约50个氨基酸(如不超过约40、35、30、25或22个氨基酸)的长度。在一些实施方案中,环序列具有不超过约20个氨基酸(如不超过约18、15、12或10个氨基酸)的长度。

[0081] 在一些实施方案中,环序列具有约5-40个氨基酸(如约5-30个氨基酸、5-25个氨基酸、5-20个氨基酸)的长度。在一些实施方案中,环序列具有约7个氨基酸至约18个氨基酸的长度。

[0082] 在一些实施方案中,环序列是环状的。

[0083] 在一些实施方案中,阻断肽包含在C端处的赖氨酸(K)。赖氨酸可用于通过赖氨酸侧链锚定来促进环的环化。

[0084] 在一些实施方案中,阻断肽包含在SPIKE的受体结合结构域(RBD)内的环序列。在一些实施方案中,环序列位于SPIKE的受体结合基序(RBM)内。在一些实施方案中,环序列位于选自由环 $\alpha$ 4- $\beta$ 5、环 $\beta$ 5- $\beta$ 6和环 $\beta$ 6- $\alpha$ 5组成的组的任何RBM结构基序内。

[0085] 在一些实施方案中,环序列选自由SEQ ID NO:1-11和42-46组成的组。在一些实施方案中,环序列选自由SEQ ID NO:1、6、8-11、42和45组成的组。在一些实施方案中,阻断肽包含选自由SEQ ID NO:1、6和8-11组成的组的序列。

[0086] 在一些实施方案中,阻断肽包含源自ACE2(如人ACE2)的胞外域内的序列(如环序列或 $\alpha$ 螺旋基序)的序列。在一些实施方案中,阻断肽包含源自人ACE2的 $\alpha$ 1螺旋内的序列的序列。在一些实施方案中,阻断肽包含源自人ACE2的 $\alpha$ 1和 $\alpha$ 2螺旋内的序列的序列。在一些实施方案中,阻断肽包含源自人ACE2的 $\beta$ 3链与 $\beta$ 4链之间的环序列的序列。

[0087] 在一些实施方案中,源自ACE2的胞外域内的序列的序列与ACE2的胞外域内的序列在所述序列的C端处的一个、两个或三个氨基酸中不同。

[0088] 在一些实施方案中,阻断肽包含在ACE2的胞外域内的序列。

[0089] 在一些实施方案中,阻断肽包含选自由SEQ ID NO:23-31和47-52组成的组的序列。在一些实施方案中,阻断肽包含选自由SEQ ID NO:23、24、26-28、31和47-52组成的组的序列。在一些实施方案中,阻断肽包含选自由SEQ ID NO:23、24、26-28和31组成的组的序列。

[0090] 在一些实施方案中,阻断肽包含选自SEQ ID NO:151-160中任一个的环状肽。在一

些实施方案中,阻断肽包含选自SEQ ID NO:151、156和158-160组成的组的环状肽。

[0091] 在一些实施方案中,阻断肽包含选自SEQ ID NO:12-22和24-41中任一个的非天然存在的肽。

[0092] 在一些实施方案中,阻断肽包含源自ACE2(例如人ACE2)的 $\alpha$ 1和 $\alpha$ 2螺旋的序列。在一些实施方案中,阻断肽包含源自ACE2(例如,人ACE2)的 $\alpha$ 1螺旋的第一序列和源自ACE2(例如,人ACE2)的 $\alpha$ 2螺旋的第二序列。在一些实施方案中,第一序列包含SEQ ID NO:47或48中所列的氨基酸序列,并且第二序列包含SEQ ID NO:49或50中所列的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一序列包含SEQ ID NO:51中所列的氨基酸序列,并且第二序列包含SEQ ID NO:52中所列的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二序列连接至第一序列的C端。在一些实施方案中,第二序列连接至第一序列的N端。在一些实施方案中,第一序列和第二序列通过接头(如本文所述的任何接头)连接。在一些实施方案中,接头选自以下组成的组:脯氨酸、聚甘氨酸接头部分、PEG部分、Aun、Ava和Ahx。在一些实施方案中,阻断肽包含SEQ ID NO:27、38、39、40中任一个的氨基酸序列。

[0093] 在一些实施方案中,本文所述的阻断肽被钉合。如本文所用的“钉合”是指肽中两个残基之间的化学键联。在一些实施方案中,阻断肽被钉合,包含肽的两个氨基酸之间的化学键联。在一些实施方案中,通过化学键联连接的两个氨基酸被3或6个氨基酸隔开。在一些实施方案中,通过化学键联连接的两个氨基酸被3个氨基酸隔开。在一些实施方案中,通过化学键联连接的两个氨基酸被6个氨基酸隔开。在一些实施方案中,通过化学键联连接的两个氨基酸中的每一个均是R或S。在一些实施方案中,通过化学键联连接的两个氨基酸中的每一个均是R。在一些实施方案中,通过化学键联连接的两个氨基酸中的每一个均是S。在一些实施方案中,通过化学键联连接的两个氨基酸中的一个R,并且另一个是S。在一些实施方案中,化学键联是烃键联。

[0094] 在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:1-52和151-160中任一个的氨基酸序列的阻断肽,其中至少一个或多个氨基酸是D-氨基酸。在一些实施方案中,阻断肽中至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的氨基酸是D-氨基酸或呈D-氨基酸形式。在一些实施方案中,阻断肽包含100% D-氨基酸。在一些实施方案中,阻断肽的至少一部分呈环状形式。在一些实施方案中,阻断肽的至少一部分具有 $\alpha$ -螺旋结构。在一些实施方案中,阻断肽包含SEQ ID NO:12-22、24-41和151-160中任一个的氨基酸序列。在一些实施方案中,阻断肽包含SEQ ID NO:151-160中任一个的氨基酸序列。在一些实施方案中,阻断肽包含SEQ ID NO:12、17、19-22、24、26-28、31-33、35、38-40、151、156和158-160中任一个的氨基酸序列。

[0095] 在一些实施方案中,提供了阻断肽,所述阻断肽包含SEQ ID NO:1-22、42-46和151-160中任一个的氨基酸序列。在一些实施方案中,阻断肽的至少一部分呈环状形式。在一些实施方案中,阻断肽中至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的氨基酸是D-氨基酸或呈D-氨基酸形式。在一些实施方案中,阻断肽包含100% D-氨基酸。在一些实施方案中,阻断肽包含选自SEQ ID NO:151、156和158-160组成的组的环状肽。

[0096] 在一些实施方案中,提供了阻断肽,所述阻断肽包含SEQ ID NO:23-41和47-52中任一个的氨基酸序列。在一些实施方案中,阻断肽的至少一部分(例如,约20%、30%、40%、

50%、60%、70%、80%或90%)具有 $\alpha$ -螺旋结构。在一些实施方案中,非螺旋结构上至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%或约100%的氨基酸是D-氨基酸或呈D-氨基酸形式。在一些实施方案中,至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%或约100%的氨基酸(例如,非螺旋结构上的氨基酸)包含逆向-反转肽。在一些实施方案中,阻断肽的至少一部分(例如,非螺旋结构的一部分)被钉合。在一些实施方案中,阻断肽被钉合,包含肽的两个氨基酸之间的化学键联。在一些实施方案中,通过化学键联连接的两个氨基酸被3或6个氨基酸隔开。在一些实施方案中,通过化学键联连接的两个氨基酸被3个氨基酸隔开。在一些实施方案中,通过化学键联连接的两个氨基酸被6个氨基酸隔开。在一些实施方案中,通过化学键联连接的两个氨基酸中的每一个均是R或S。在一些实施方案中,通过化学键联连接的两个氨基酸中的每一个均是R。在一些实施方案中,通过化学键联连接的两个氨基酸中的每一个均是S。在一些实施方案中,通过化学键联连接的两个氨基酸中的一个R,并且另一个是S。在一些实施方案中,化学键联是烃键联。

[0097] 在一些实施方案中,提供了阻断肽(或非天然存在的肽),其包含SEQ ID NO:12-22、24-41和151-160中任一个的氨基酸序列。在一些实施方案中,阻断肽包含SEQ ID NO:12、17、19-22、24、26-28、31-33、35、38-40、151、156和158-160中任一个的氨基酸序列。在一些实施方案中,阻断肽(或非天然存在的肽)具有约5至约100个氨基酸(如约10至约80个氨基酸、约10至约70个氨基酸、约10至约60个氨基酸、约10至约50个氨基酸)的长度。

[0098] 本申请还提供与第二部分连接的本文所述的任何阻断肽。第二部分使阻断肽的结构(如二级结构,例如环或螺旋结构)稳定。在一些实施方案中,第二部分是PEG部分。在一些实施方案中,第二部分是脂质。在一些实施方案中,第二部分是纳米颗粒。在一些实施方案中,第二部分是抗体。在一些实施方案中,阻断肽的至少一部分呈环状形式。在一些实施方案中,阻断肽包含选自由SEQ ID NO:151-160(例如,SEQ ID NO:151、156和158-160)组成的组的环状肽。

[0099] 在一些实施方案中,第二部分是PEG部分(如本文所述的任何PEG部分)。肽的PEG化提供了多种优点,如促进 $\alpha$ -螺旋的二级结构、促进缀合物的药物递送和体内循环时间。参见例如,Hamed等人(Biomacromolecules 2013,14,4053-4060);Hamley(Biomacromolecules 2014,15,1543-1559);和Lawrence等人,(Curr Opin Chem Biol.2016年10月;34:88-94)。将PEG部分连接至肽的方法在本领域中是已知的,例如,如在Hamed和Hamley中描述的那些。在一些实施方案中,PEG部分由不超过约7、6、5、4、3或2个单元组成。在一些实施方案中,PEG部分由两个或四个单元组成。

[0100] 在一些实施方案中,第二部分是靶向或中和病毒(例如,冠状病毒,例如SARS-CoV-2)的抗体。在一些实施方案中,抗体是纳米抗体。示例性抗体可在例如,Wang等人(Nature Communications,第11卷,文章编号:2251(2020));和Pinto等人,(Nature第583卷,第290-295页(2020))中找到。

[0101] 在一些实施方案中,第二部分是纳米颗粒。在一些实施方案中,纳米颗粒是金纳米颗粒(例如,Au-纳米颗粒)。将肽连接至纳米颗粒的一般原理和方法在本领域中是已知且了解的,例如,如Brancolini等人(Current Opinion in Colloid&Interface Science 2019,

41:86-94)中所述。

[0102] 在一些实施方案中,第二部分是脂质。肽脂化促进基于肽的药物的药代动力学和药效学特征。参见例如,Kowalczyk等人(Adv Exp Med Biol.2017;1030:185-227)和Ward等人(Molecular Metabolism 2(2013)468-479)。将脂质连接至肽的方法在本领域中是已知的,例如,如在Kowalczyk和Ward中描述的那些。在一些实施方案中,脂质是酰化剂。在一些实施方案中,阻断肽是酰化的。在一些实施方案中,阻断肽用C8或C16脂肪酸酰化。在一些实施方案中,C8或C16脂肪酸在直链烃链中。

[0103] 在一些实施方案中,第二部分连接至肽的N端。在一些实施方案中,第二部分连接至肽的C端。在一些实施方案中,将第二部分添加至肽内的一个或多个氨基酸(如添加至半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸或赖氨酸的脂质)。

[0104] 在一些实施方案中,阻断肽和第二部分通过接头(如本文所述的任何接头)连接。

[0105] 稳定肽

[0106] 一些实施方案中的稳定肽包含两亲性 $\alpha$ 螺旋(或两亲性螺旋)结构。两亲性螺旋是在与极性/非极性界面接触时折叠成 $\alpha$ 螺旋结构的肽序列。两亲性螺旋是在许多蛋白质中发现的第二特征,由它们的结构和所述螺旋的两个面之间的疏水性和极性残基的分离来定义。这种分离允许AH吸附在极性-非极性界面。

[0107] 在一些实施方案中,稳定肽连接至阻断肽的C端。在一些实施方案中,稳定肽连接至阻断肽的N端。在一些实施方案中,稳定肽通过接头(如本文所述的任何接头)连接至阻断肽。

[0108] 在一些实施方案中,稳定肽具有约8个氨基酸至约50个氨基酸(如约10至约40个氨基酸,如约12至约30个氨基酸)的长度。

[0109] 在一些实施方案中,稳定肽包含单核心螺旋基序。在一些实施方案中,稳定肽包含两个或更多个螺旋基序。示例性稳定肽包含CADY(例如,SEQ ID NO:150)、VEPEP-106肽、ADGN-100肽和VEPEP-109肽。所有四种肽都在模拟膜环境中采用二级两亲性螺旋构象,在一侧上暴露Trp基团,在另一侧上暴露带电残基,并且在另一侧上暴露疏水性残基。CADY和VEPEP-6采用相同的二级结构,在肽的核心、C端和N端具有螺旋基序(表1)。相比之下,ADGN-100和VEPEP-9肽含有单核心螺旋基序,所述基序在VEPEP-9中更长,并且与Konate等人2010(Biochemistry)、Crowlet等人2014(BBA)一致。

[0110] 表1

|        | 肽        | 二级结构预测                                                  |
|--------|----------|---------------------------------------------------------|
|        |          |                                                         |
| [0111] | ADGN-100 | KWRSAGWRWRLWRVRSWSR (SEQ ID NO: 61)<br>hhhhhhhhhhhhhhhh |
|        | CADY     | GLWRALWRLRLSLWRLWLV (SEQ ID NO: 150)<br>hhh hhhhh hhhh  |
|        | VEPEP-6  | LWRALWRLWRLWRLWKA (SEQ ID NO: 92)<br>hhh hhhhh hhhh     |

---

|        |                                                                          |
|--------|--------------------------------------------------------------------------|
| [0112] | VEPEP-9<br>LRWWLRWASRWFSRWAWWR (SEQ ID NO:<br>120)<br>hhhhhhhhhhhhhhhhhh |
|--------|--------------------------------------------------------------------------|

---

[0113] h:螺旋基序

[0114] 在一些实施方案中,稳定肽包含ADGN-100肽或VEPEP-6肽。

[0115] 在一些实施方案中,稳定肽是本文所述的任何稳定肽的逆向-反转肽(例如,由反向序列中的D-氨基酸组成的肽,并且在延伸时呈现与其母体分子相似的侧链拓扑结构,但具有反向酰胺肽键)。

[0116] 在一些实施方案中,本文所述的稳定肽(例如,CADY、VEPEP-3肽、VEPEP-4肽、VEPEP-5肽、VEPEP-6肽、VEPEP-9肽或ADGN-100肽)被钉合。在一些实施方案中,稳定肽被钉合,包含肽的两个氨基酸之间的化学键联。在一些实施方案中,通过化学键联连接的两个氨基酸被3或6个氨基酸隔开。在一些实施方案中,通过化学键联连接的两个氨基酸被3个氨基酸隔开。在一些实施方案中,通过化学键联连接的两个氨基酸被6个氨基酸隔开。在一些实施方案中,通过化学键联连接的两个氨基酸中的每一个均是R或S。在一些实施方案中,通过化学键联连接的两个氨基酸中的每一个均是R。在一些实施方案中,通过化学键联连接的两个氨基酸中的每一个均是S。在一些实施方案中,通过化学键联连接的两个氨基酸中的一个R,并且另一个是S。在一些实施方案中,化学键联是炔键联。

[0117] 在一些实施方案中,稳定肽包含源自ACE2(例如人ACE2)的序列。在一些实施方案中,阻断肽和稳定肽各自包含源自ACE2(例如人ACE2)的序列。在一些实施方案中,稳定肽包含SEQ ID NO:49或50中所列的序列。在一些实施方案中,稳定肽连接至阻断肽的N端。在一些实施方案中,稳定肽连接至阻断肽的C端。在一些实施方案中,稳定肽通过接头(如本文所述的任何接头)连接至阻断肽。

[0118] 在一些实施方案中,稳定肽包含SEQ ID NO:49、50和53-150中任一个的氨基酸序列。

[0119] ADGN-100肽

[0120] 在一些实施方案中,本文所述的ADGN-100肽包含核心基序,其中所述核心基序是氨基酸序列RWRLWRX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>SR (SEQ ID NO:53),并且其中X<sub>1</sub>是V或S,X<sub>2</sub>是R、V或A,X<sub>3</sub>是S或L,并且X<sub>4</sub>是W或Y。在一些实施方案中,肽贯穿超过约50%(如超过约55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%和95%中的任一个)的其长度采用 $\alpha$ -螺旋结构。示例性ADGN-100肽在例如以引用的方式整体并入本文的US20190002499A1、EP3237436和W02016/102687中进行了描述。

[0121] 在一些实施方案中,螺旋结构被配置为使得至少2个(如至少3、4、5、6、7或8个中的任一个)S和R残基在螺旋结构的一侧上并且至少1个(如至少2、3、4或5个中的任一个)W残基在螺旋结构的相对侧上。在一些实施方案中,大部分S和R残基在螺旋结构的一侧上,并且大部分W残基在螺旋结构的相对侧上。在一些实施方案中,所有S和R残基在螺旋结构的一侧上,并且所有W残基在螺旋结构的相对侧上。在一些实施方案中,螺旋结构被配置成使得静电接触贴片在螺旋结构的一侧上形成并且疏水接触贴片在螺旋结构的另一侧上形成。在一些实施方案中,肽在运载物分子存在下采用单螺旋。

[0122] 在一些实施方案中,ADGN-100肽包含SEQ ID NO:53-79中任一个中所列的序列。

[0123] 在一些实施方案中,ADGN-100细胞穿透肽包含氨基酸序列 $R S X_1 X_2 X_3 R W R L W R X_4 X_5 X_6 X_7 S R$ (SEQ ID NO:54),其中 $X_1$ 是A或V, $X_2$ 是G或L, $X_3$ 是W或Y, $X_4$ 是V或S, $X_5$ 是R、V或A, $X_6$ 是S或L,并且 $X_7$ 是W或Y。在一些实施方案中,ADGN-100肽包含氨基酸序列RSAGWRWRLWVRWSR(SEQ ID NO:55)、RSALYR WRLWVRWSR(SEQ ID NO:56)、RSALYRWLRWSRWSR(SEQ ID NO:57)或RSALYRWLRWSALYSR(SEQ ID NO:58)。在一些实施方案中,ADGN-100肽包含氨基酸序列RSAGWRWRLWVRWSR(SEQ ID NO:55)。

[0124] 在一些实施方案中,ADGN-100细胞穿透肽包含 $X_1 K W R S X_2 X_3 X_4 R W R L W R X_5 X_6 X_7 X_8 S R$ (SEQ ID NO:59),其中 $X_1$ 是任何氨基酸或不存在,并且 $X_2-X_8$ 是任何氨基酸。在一些实施方案中,ADGN-100细胞穿透肽包含 $X_1 K W R S X_2 X_3 X_4 R W R L W R X_5 X_6 X_7 X_8 S R$ ,其中 $X_1$ 是 $\beta$ A、S或不存在, $X_2$ 是A或V, $X_3$ 是G或L, $X_4$ 是W或Y, $X_5$ 是V或S, $X_6$ 是R、V或A, $X_7$ 是S或L,并且 $X_8$ 是W或Y。在一些实施方案中,ADGN-100细胞穿透肽包含SEQ ID NO:61-64中任一个的氨基酸序列。

[0125] 在一些实施方案中,本文所述的ADGN-100肽包含核心基序,其中所述核心基序是氨基酸序列RWRLWRSR(SEQ ID NO:65)。

[0126] 在一些实施方案中,ADGN-100肽是逆向-反转肽(例如,由反向序列中的D-氨基酸组成的肽,并且在延伸时呈现与其母体分子相似的侧链拓扑结构,但具有反向酰胺肽键)。在一些实施方案中,逆向-反转肽包含SEQ ID NO:66或67的序列。

[0127] 在一些实施方案中,ADGN-100肽包含由通过烃键联连接的两个或六个残基隔开的两个残基。在一些实施方案中,此键联增加嵌合肽的稳定性。在一些实施方案中,ADGN-100肽包含氨基酸序列 $R S_5 A G W R_5 W R L W R V R S W S R$ (SEQ ID NO:68)、 $R_5 S A G W R W R_5 L W R V R S W S R$ (SEQ ID NO:69)、 $R S A G W R_5 W R L W R V R_5 S W S R$ (SEQ ID NO:70)、 $R S_5 A L Y R_5 W R L W R S R S W S R$ (SEQ ID NO:71)、 $R_5 S A L Y R W R_5 L W R S R S W S R$ (SEQ ID NO:72)、 $R S A L Y R_5 W R L W R S R_5 S W S R$ (SEQ ID NO:73)、 $R S A L Y R W R_5 L W R S_5 R S W S R$ (SEQ ID NO:74)、 $R S A L Y R W R L W R S_5 R S W S_5 R$ (SEQ ID NO:75)、 $R_5 S A L Y R W R_5 L W R S A L Y S R$ (SEQ ID NO:76)、 $R S_5 A L Y R_5 W R L W R S A L Y S R$ (SEQ ID NO:77)、 $R S A L Y R W R_5 L W R S_5 A L Y S R$ (SEQ ID NO:78)或 $R S A L Y R W R L W R S_5 A L Y S_5 R$ (SEQ ID NO:79),其中用下标“S”标记的残基通过烃键联连接。

[0128] VEPEP-6肽

[0129] 在一些实施方案中,稳定肽是VEPEP-6肽(也称为ADGN-106肽或VEPEP-106肽)。本文所述的VEPEP-6肽是二级两亲性肽。它们用途广泛,并表现出强烈结构多态性。VEPEP-6在溶液中解折叠为游离形式,并在脂质或人工细胞膜存在下以及在运载物(如siRNA/单链和双链寡核苷酸)存在下采用 $\alpha$ 螺旋构象。关于示例性VEPEP-6肽,参见以引用的方式整体并入本文的US20140227344和EP2694529。

[0130] 在一些实施方案中,VEPEP-6肽包含选自以下组成的组的氨基酸序列: $L X_1 R A L W X_8 L X_2 X_8 X_3 L W X_8 L X_4 X_5 X_6 X_7$ (SEQ ID NO:80)、 $L X_1 L A R W X_8 L X_2 X_8 X_3 L W X_8 L X_4 X_5 X_6 X_7$ (SEQ ID NO:81)、 $L X_1 A R L W X_8 L X_2 X_8 X_3 L W X_8 L X_4 X_5 X_6 X_7$ (SEQ ID NO:82)、 $L X_1 R A L W R L X_2 R X_3 L W R L X_4 X_5 X_6 X_7$ (SEQ ID NO:83),其中 $X_1$ 是F或W, $X_2$ 是L、W、C或I, $X_3$ 是S、A、N或T, $X_4$ 是L或W, $X_5$ 是W或R, $X_6$ 是K或R, $X_7$ 是A或不存在,并且 $X_8$ 是R或S。在一些实施方案中,VEPEP-6肽包含 $L X_1 R A L W R L X_2 R X_3 L W R L X_4 X_5 K X_6$ (SEQ ID NO:84)的氨基酸,其中 $X_1$ 是F或W, $X_2$ 是L或W, $X_3$ 是S、A或N, $X_4$ 是L或W, $X_5$ 是W或R, $X_6$ 是A或不存在。在一些实施方案中,VEPEP-6肽包含SEQ ID NO:85-90中任一个中所列的氨基酸。在一些实施方案中,VEPEP-6肽包含SEQ ID NO:91-97中任一个中所列的氨基酸。在一些实

实施方案中,VEPEP-6肽包含LWRALWRLWRSW RLLWK(SEQ ID NO:97)的氨基酸。

[0131] 在一些实施方案中,VEPEP-6肽是逆向-反转肽。在一些实施方案中,逆向-反转肽包含SEQ ID NO:98的序列。

[0132] 在一些实施方案中,VEPEP-6肽包含由通过烃键联连接的两个或六个残基隔开的两个残基。在一些实施方案中,VEPEP-6肽包含位置7和11处的两个残基之间的烃键联。在一些实施方案中,VEPEP-6肽包含位置10和14处的两个残基之间的烃键联。在一些实施方案中,VEPEP-6肽包含位置4和11处的两个残基之间的烃键联。在一些实施方案中,VEPEP-6肽包含SEQ ID NO:99-107中任一个中所列的氨基酸序列。

[0133] VEPEP-9肽

[0134] 在一些实施方案中,稳定肽包含VEPEP-9肽(也称为VEPEP-109肽)。除VEPEP-9c和VEPEP-9e外的VEPEP-9肽是二级两亲性肽;它们用途广泛,并表现出强烈的结构多态性。参见图11B。VEPEP-9在溶液中解折叠为游离形式,并在脂质或人工细胞膜存在下以及在运载物(如肽、SMH和小寡核苷酸)存在下采用 $\alpha$ 螺旋构象。相比之下,由于序列中存在脯氨酸残基,VEPEP-9c和VEPEP-9e采用螺旋/转角结构。VEPEP-9c的N端结构域在脂质或人工细胞膜存在下以及在运载物存在下采用 $\alpha$ 螺旋构象。预期VEPEP-9c和VEPEP-9e也可起到稳定肽的作用。参见以引用的方式整体并入本文的WO2014/053624、US20160060296A1和EP2928908中描述的示例性VEPEP-9肽。

[0135] 在一些实施方案中,本文所述的复合物或纳米颗粒包含VEPEP-9细胞穿透肽,所述VEPEP-9细胞穿透肽包含氨基酸序列 $X_1X_2X_3WWX_4X_5WAX_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}WX_{13}R$ (SEQ ID NO:108),其中 $X_1$ 是 $\beta$ -A、S或不存在, $X_2$ 是L或不存在, $X_3$ 是R或不存在, $X_4$ 是L、R或G, $X_5$ 是R、W或S, $X_6$ 是S、P或T, $X_7$ 是W或P, $X_8$ 是F、A或R, $X_9$ 是S、L、P或R, $X_{10}$ 是R或S, $X_{11}$ 是W或不存在, $X_{12}$ 是A、R或不存在,并且 $X_{13}$ 是W或F,并且其中如果 $X_3$ 不存在,则 $X_2$ 、 $X_{11}$ 和 $X_{12}$ 也不存在。在一些实施方案中,VEPEP-9肽包含氨基酸序列 $X_1X_2RWWRWAX_6RWX_8X_9X_{10}WX_{12}WX_{13}R$ (SEQ ID NO:109),其中 $X_1$ 是 $\beta$ -A、S或不存在, $X_2$ 是L或不存在, $X_6$ 是S或P, $X_8$ 是F或A, $X_9$ 是S、L或P, $X_{10}$ 是R或S, $X_{12}$ 是A或R,并且 $X_{13}$ 是W或F。在一些实施方案中,VEPEP-9肽包含选自以下组成的组的氨基酸序列: $X_1LRWWRWASRWFSRWAWWR$ (SEQ ID NO:110)、 $X_1LRWWRWASRWASRWAWFR$ (SEQ ID NO:111)、 $X_1RWWRWASRWALSWRWWR$ (SEQ ID NO:112)、 $X_1RWWRWASRWFLSWRWWR$ (SEQ ID NO:113)、 $X_1RWWRWAPRWFPSRWWR$ (SEQ ID NO:114)和 $X_1RWWRWASRWAPSWRWWR$ (SEQ ID NO:115),其中 $X_1$ 是 $\beta$ -A、S或不存在。在一些实施方案中,VEPEP-9肽包含 $X_1WWX_4X_5WAX_6X_7X_8RX_{10}WWR$ (SEQ ID NO:116)的氨基酸序列,其中 $X_1$ 是 $\beta$ -A、S或不存在, $X_4$ 是R或G, $X_5$ 是W或S, $X_6$ 是S、T或P, $X_7$ 是W或P, $X_8$ 是A或R,并且 $X_{10}$ 是S或R。在一些实施方案中,VEPEP-9肽包含选自以下组成的组的氨基酸序列: $X_1WWRWWASRWWR$ (SEQ ID NO:117)、 $X_1WGWATPRRRWWR$ (SEQ ID NO:118)和 $X_1WWRWWAPRWWR$ (SEQ ID NO:119),其中 $X_1$ 是 $\beta$ -A、S或不存在。在一些实施方案中,VEPEP-9肽包含SEQ ID NO:120或121中所列的氨基酸序列。

[0136] VEPEP-3肽

[0137] 在一些实施方案中,稳定肽包含VEPEP-3肽。VEPEP-3肽是一级两亲性肽;它们用途广泛,并表现出强烈的结构多态性。VEPEP-3肽在溶液中解折叠为游离形式,并在脂质或人工细胞膜存在下以及在运载物(如肽或蛋白质)存在下在N端部分中采用 $\alpha$ 螺旋构象。示例性VEPEP-3肽在例如以引用的方式整体并入本文的WO 2014/053622、US20160089447和

EP2951196中进行了描述。

[0138] 在一些实施方案中,VEPEP-3肽包含氨基酸序列 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}$  (SEQ ID NO:122),其中 $X_1$ 是 $\beta$ -A、S或不存在, $X_2$ 是K、R或L(彼此独立), $X_3$ 是F或W(彼此独立), $X_4$ 是F、W或Y(彼此独立), $X_5$ 是E、R或S, $X_6$ 是R、T或S, $X_7$ 是E、R或S, $X_8$ 是不存在、F或W, $X_9$ 是P或R, $X_{10}$ 是R或L, $X_{11}$ 是K、W或R, $X_{12}$ 是R或F,并且 $X_{13}$ 是R或K。在一些实施方案中,VEPEP-3肽包含氨基酸序列 $X_1X_2WX_4EX_6WX_7X_3PRX_{11}RX_{13}$  (SEQ ID NO:123),其中 $X_1$ 是 $\beta$ -A、S或不存在, $X_2$ 是K、R或L, $X_3$ 是F或W, $X_4$ 是F、W或Y, $X_5$ 是E、R或S, $X_6$ 是R、T或S, $X_7$ 是E、R或S, $X_8$ 是不存在、F或W, $X_9$ 是P或R, $X_{10}$ 是R或L, $X_{11}$ 是K、W或R, $X_{12}$ 是R或F,并且 $X_{13}$ 是R或K。在一些实施方案中,VEPEP-3肽包含氨基酸序列 $X_1KWFERWFREWPRKRR$  (SEQ ID NO:124)、 $X_1KWWERWWREWPRKRR$  (SEQ ID NO:125)、 $X_1KWWERWWREWPRKRK$  (SEQ ID NO:126)、 $X_1RWWEKWWTRWPRKRK$  (SEQ ID NO:127)或 $X_1RWYEKWYTEFPRRRR$  (SEQ ID NO:128),其中 $X_1$ 是 $\beta$ -A、S或不存在。在一些实施方案中,VEPEP-3肽包含氨基酸序列 $X_1KX_{14}WWERWWRX_{14}WPRKRK$  (SEQ ID NO:129),其中 $X_1$ 是 $\beta$ -A、S或不存在,并且 $X_{14}$ 是非天然氨基酸,并且其中在两个非天然氨基酸之间存在烃键联。在一些实施方案中,VEPEP-3肽包含氨基酸序列 $X_1X_2X_3WX_5X_{10}X_3WX_6X_7WX_8X_9X_{10}WX_{12}R$  (SEQ ID NO:130),其中 $X_1$ 是 $\beta$ -A、S或不存在, $X_2$ 是K、R或L, $X_3$ 是F或W, $X_5$ 是R或S, $X_6$ 是R或S, $X_7$ 是R或S, $X_8$ 是F或W, $X_9$ 是R或P, $X_{10}$ 是L或R,并且 $X_{12}$ 是R或F。在一些实施方案中,VEPEP-3肽包含氨基酸序列 $X_1RWWRLWWSWFRLWRR$  (SEQ ID NO:131)、 $X_1LWWRWWSRWPRWRR$  (SEQ ID NO:132)、 $X_1LWWSRWWSWFRLWFR$  (SEQ ID NO:133)或 $X_1KFWSRFWSWFRLWRR$  (SEQ ID NO:134),其中 $X_1$ 是 $\beta$ -A、S或不存在。在一些实施方案中,VEPEP-3肽包含SEQ ID NO:122-134中任一个的氨基酸序列,其中细胞穿透肽通过用非天然氨基酸替代位置5和12中的氨基酸来进行修饰,并在两个非天然氨基酸之间添加烃键联。在一些实施方案中,VEPEP-3肽包含氨基酸序列 $X_1RWWX_{14}LWWSWX_{14}RLWRR$  (SEQ ID NO:135),其中 $X_1$ 是 $\beta$ -丙氨酸、丝氨酸或不存在,并且 $X_{14}$ 是非天然氨基酸,并且其中在两个非天然氨基酸之间存在烃键联。在一些实施方案中,VEPEP-3肽包含SEQ ID NO:136或137中所列的氨基酸序列。

[0139] VEPEP-4肽

[0140] 在一些实施方案中,稳定肽包含VEPEP-4肽。VEPEP-4肽是两亲性肽;它们用途广泛,并表现出强烈的结构多态性。VEPEP-4肽在溶液中以游离形式以及在脂质或人工细胞膜或诸如肽或小分子的运载物存在下解折叠。示例性VEPEP-4肽在例如以引用的方式整体并入本文的US20160115199A1、WO 2014/053628和EP2928906中进行了描述。

[0141] 在一些实施方案中,VEPEP-4肽包含氨基酸序列XWXRLXXXXXX (SEQ ID NO:138),其中位置1中的X是 $\beta$ -A、S或不存在;位置3、9和10中的X彼此独立地是W或F;如果位置8中的X为S时,则位置6中的X为R,并且如果位置8中的X为R时,则位置6中的X为S;位置7中的X为L或不存在;如果位置11中的X不存在,则位置11中的X为R或不存在,且位置7中的X为L。在一些实施方案中,VEPEP-4肽包含SEQ ID NO:138-142中任一个的氨基酸序列。

[0142] VEPEP-5肽

[0143] 在一些实施方案中,稳定肽包含VEPEP-5肽。VEPEP-5是与诸如肽、肽-类似物、PNA和小疏水分子的分子形成稳定纳米颗粒的短的一级且在某些情况下二级两亲性肽,下文称为“SHM”。示例性VEPEP-5肽在例如以引用的方式整体并入本文的US20160145299A1、WO 2014/053629和EP2928907中进行了描述。

[0144] 在一些实施方案中,VEPEP-5肽包含氨基酸序列RXWXRLWXRLR(SEQ ID NO:143),其中位置2中的X是R或S;并且位置4和8中的X彼此独立地是W或F。在一些实施方案中,VEPEP-5肽包含SEQ ID NO:144-149中任一个的氨基酸序列。

[0145] 接头

[0146] 在一些实施方案中,稳定肽通过接头连接至阻断肽。

[0147] 在一些实施方案中,接头包含聚甘氨酸接头。在一些实施方案中,接头包含 $\beta$ -丙氨酸。在一些实施方案中,接头包含至少约两个、三个或四个甘氨酸,任选地为连续甘氨酸。在一些实施方案中,接头还包含丝氨酸。在一些实施方案中,接头包含GGGGS(SEQ ID NO:186)或SGGGG(SEQ ID NO:187)序列。在一些实施方案中,接头包含甘氨酸- $\beta$ -丙氨酸基序。

[0148] 在一些实施方案中,一个或多个部分包含聚合物(例如,PEG、聚赖氨酸、PET)。在一些实施方案中,聚合物缀合至CPP的N端。在一些实施方案中,聚合物缀合至CPP的C端。在一些实施方案中,第一聚合物缀合至CPP的N端,并且第二聚合物缀合至CPP的C端。在一些实施方案中,聚合物是PEG。在一些实施方案中,PEG是线性PEG。在一些实施方案中,PEG是支链PEG。在一些实施方案中,PEG的分子量不超过约5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、30kDa或40kDa。在一些实施方案中,PEG的分子量是至少约5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、30kDa或40kDa。在一些实施方案中,PEG的分子量是约5kDa至约10kDa、约10kDa至约15kDa、约15kDa至约20kDa、约20kDa至约30kDa或约30kDa至约40kDa。在一些实施方案中,PEG的分子量是约5kDa、10kDa、20kDa或40kDa。在一些实施方案中,PEG的分子量选自自由以下组成的组:5kDa、10kDa、20kDa或40kDa。在一些实施方案中,PEG的分子量是约5kDa。在一些实施方案中,PEG的分子量是约10kDa。在一些实施方案中,PEG包含至少约1、2或3个乙二醇单元。在一些实施方案中,PEG由不超过约10、9、8或7个乙二醇单元组成。在一些实施方案中,PEG由约1、2或3个乙二醇单元组成。在一些实施方案中,PEG部分由约一个至八个或约两个至约七个乙二醇单元组成。

[0149] 在一些实施方案中,接头选自自由以下组成的组: $\beta$ 丙氨酸、半胱氨酸、半胱酰胺桥、聚甘氨酸(如G2或G4)、Aun(11-氨基-十一烷酸)、Ava(5-氨基戊酸)和Ahx(氨基己酸)。在一些实施方案中,接头部分包含Aun(11-氨基-十一烷酸)。在一些实施方案中,接头部分包含Ava(5-氨基戊酸)。在一些实施方案中,接头部分包含Ahx(氨基己酸)。

[0150] 在一些实施方案中,接头包含脯氨酸。脯氨酸在阻断结构域与稳定结构域之间的二级结构中产生冲击。

[0151] 在一些实施方案中,接头选自自由以下组成的组:脯氨酸、聚甘氨酸接头部分、PEG部分(例如,由约2-7个乙二醇单元组成)、Aun、Ava和Ahx。

[0152] 还考虑了编码本文所述的任何嵌合肽、阻断肽或稳定肽的核酸。

[0153] siRNA

[0154] 本申请提供了靶向SARS-CoV-2病毒的新型siRNA。

[0155] 在一些实施方案中,siRNA靶向SARS-CoV-2核衣壳。在一些实施方案中,siRNA包含SEQ ID NO:161-170中任一个的核酸序列。在一些实施方案中,siRNA包含选自SEQ ID NO 163、166、168和170组成的组的核酸序列。在一些实施方案中,siRNA包含SEQ ID NO:166的核酸序列。

[0156] 在一些实施方案中,siRNA靶向SARS-CoV-2ORF 3A基因。在一些实施方案中,siRNA

包含SEQ ID NO:171-175中任一个的核酸序列。在一些实施方案中,siRNA包含选自由SEQ ID NO 171、173和174组成的组的核酸序列。

[0157] 在一些实施方案中,siRNA靶向SARS-CoV-2ORF 8基因。在一些实施方案中,siRNA包含SEQ ID NO:176-179中任一个的核酸序列。在一些实施方案中,siRNA包含选自由SEQ ID NO 177、178和180组成的组的核酸序列。

[0158] 在一些实施方案中,siRNA可进行修饰(例如,化学修饰)。示例性修饰包括但不限于3'末端脱氧胸腺嘧啶、2'0甲基、2'脱氧修饰、2'氨基修饰、2'烷基修饰、吗啉代修饰、氨基磷酸酯修饰、5'-硫代磷酸酯基团修饰、5'磷酸或5'磷酸模拟修饰、胆固醇基衍生物或十二烷酸双癸酰胺基团修饰。经修饰的核苷酸可以是锁核苷酸、无碱基核苷酸或包含非天然碱基的核苷酸中的任一种。

[0159] 本文还提供了包含任何上述嵌合肽、阻断肽或siRNA的复合物、纳米颗粒、组合物,包括但不限于如下所述的复合物、纳米颗粒和组合物。

[0160] 许多递送系统可用于递送本申请中描述的任何嵌合肽、阻断肽或siRNA、复合物、纳米颗粒和组合物,包括但不限于病毒、脂质体、电穿孔、显微注射和缀合,以实现将嵌合肽、阻断肽和/或siRNA引入宿主细胞中。常规的基于病毒和非病毒的基因转移方法可用于将核酸引入哺乳动物细胞或靶组织中。此类方法可用于将编码本发明的嵌合肽或阻断肽的核酸施用于培养物中或宿主生物体中的细胞。非病毒载体递送系统包括DNA质粒、RNA(例如本文所述的构建体的转录物)、裸核酸以及与诸如脂质体的递送媒介物复合的核酸。

[0161] 核酸的非病毒递送方法包括脂转染、核转染、显微注射、生物弹道、病毒颗粒、脂质体、免疫脂质体、聚阳离子或脂质:核酸缀合物、电穿孔、纳米颗粒、外泌体、微泡或基因枪、裸DNA和人工病毒体。

[0162] 使用基于RNA或DNA病毒的系统递送核酸具有将病毒靶向特定细胞和/或将病毒有效载荷运输至细胞核方面具有高效率。

[0163] 复合物和纳米颗粒

[0164] 本申请提供了复合物,所述复合物包含a)包含嵌合肽、阻断肽或siRNA(如本文所述的那些中的任一种)的运载物,和b)第二肽,其中所述嵌合肽、阻断肽或siRNA与所述第二肽复合。还提供了包含本文所述的任何复合物的纳米颗粒。在一些实施方案中,提供了纳米颗粒,所述纳米颗粒包含a)包含嵌合肽、阻断肽或siRNA(如本文所述的那些中的任一种)的运载物,和b)第二肽。

[0165] 在一些实施方案中,提供了复合物或纳米颗粒,所述复合物或纳米颗粒包含a)包含嵌合肽的运载物,所述嵌合肽包含阻断肽和稳定肽,其中所述阻断肽特异性地阻断SPIKE与ACE2之间的相互作用并且包含SPIKE的受体结合结构域(RBD)内的环序列,其中所述稳定肽包含两亲性螺旋;和b)第二肽,其中所述第二肽选自由以下组成的组:CADY、MPG、PEP-1肽、PEP-2肽、PEP-3肽(例如,SEQ ID NO:183)、LNCOV肽、VEPEP-3肽、VEPEP-4肽、VEPEP-5肽、VEPEP-6肽、VEPEP-9肽和ADGN-100肽。在一些实施方案中,稳定肽选自由以下组成的组:CADY、VEPEP-6肽、ADGN-100肽和VEPEP-9肽。在一些实施方案中,稳定肽连接至阻断肽的C端。在一些实施方案中,环序列具有不超过约20个氨基酸(如约7-18个氨基酸)的长度。在一些实施方案中,阻断肽包含在C端处的赖氨酸(K)。在一些实施方案中,环序列是环状的。在一些实施方案中,环序列选自由SEQ ID NO:1-11和42-46组成的组。在一些实施方案中,环

序列选自自由SEQ ID NO:1、6、8-11、42和45组成的组。在一些实施方案中,阻断肽和稳定肽通过接头连接。在一些实施方案中,接头选自自由以下组成的组:脯氨酸、聚甘氨酸接头部分、PEG部分、Aun、Ava和Ahx。在一些实施方案中,第二肽选自自由以下组成的组:ADGN-100肽(例如,SEQ ID NO:55)、VEPEP-6肽(例如,SEQ ID NO:97)或VEPEP-9肽(例如,SEQ ID NO:120或121)。在一些实施方案中,第二肽包含选自自由SEQ ID NO:53-79组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽包含选自自由SEQ ID NO:80-107组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽包含选自自由SEQ ID NO:108-121组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽与嵌合肽的摩尔比介于约1:1至约80:1之间(例如,约2:1至约10:1、约5:1)。在一些实施方案中,第二肽与嵌合肽复合。

[0166] 在一些实施方案中,提供了复合物或纳米颗粒,所述复合物或纳米颗粒包含a) 包含嵌合肽的运载物,所述嵌合肽包含阻断肽和稳定肽,其中所述阻断肽特异性地阻断SPIKE与ACE2之间的相互作用并且包含源自ACE2的胞外域内的序列的序列,其中所述稳定肽包含两亲性螺旋;和b) 第二肽,其中所述第二肽选自自由以下组成的组:CADY、MPG、PEP-1肽、PEP-2肽、PEP-3肽(例如,SEQ ID NO:183)、LNCOV肽、VEPEP-3肽、VEPEP-4肽、VEPEP-5肽、VEPEP-6肽、VEPEP-9肽和ADGN-100肽。在一些实施方案中,稳定肽选自自由以下组成的组:CADY、VEPEP-106肽、ADGN-100肽和VEPEP-109肽。在一些实施方案中,稳定肽连接至阻断肽的C端。在一些实施方案中,阻断肽包含选自自由SEQ ID NO:23-31和47-52组成的组的序列。在一些实施方案中,阻断肽包含选自自由SEQ ID NO:23、24、26-28、31和47-52组成的组的序列。在一些实施方案中,阻断肽和稳定肽通过接头连接。在一些实施方案中,接头选自自由以下组成的组:脯氨酸、聚甘氨酸接头部分、PEG部分、Aun、Ava和Ahx。在一些实施方案中,第二肽选自自由以下组成的组:ADGN-100肽(例如,SEQ ID NO:55)、VEPEP-6肽(例如,SEQ ID NO:97)或VEPEP-9肽(例如,SEQ ID NO:120或121)。在一些实施方案中,第二肽包含选自自由SEQ ID NO:53-79组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽包含选自自由SEQ ID NO:80-107组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽包含选自自由SEQ ID NO:108-121组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽与嵌合肽的摩尔比介于约1:1至约80:1之间(例如,约2:1至约10:1、约5:1)。在一些实施方案中,第二肽与嵌合肽复合。

[0167] 在一些实施方案中,提供了复合物或纳米颗粒,所述复合物或纳米颗粒包含a) 包含嵌合肽的运载物,所述嵌合肽包含连接至稳定肽的阻断肽,其中所述阻断肽包含选自自由SEQ ID NO:1、6、8-11、23、24、26-28、31 42、45和47-52组成的组的序列,其中所述稳定肽包含通过接头连接至所述阻断肽的C端的ADGN-100肽或VEPEP-6肽;和b) 第二肽,其中所述第二肽选自自由以下组成的组:CADY、MPG、PEP-1肽、PEP-2肽、PEP-3肽(例如,SEQ ID NO:183)、LNCOV肽、VEPEP-3肽、VEPEP-4肽、VEPEP-5肽、VEPEP-6肽、VEPEP-9肽和ADGN-100肽。在一些实施方案中,稳定肽选自自由以下组成的组:CADY、VEPEP-106肽、ADGN-100肽和VEPEP-109肽。在一些实施方案中,接头选自自由以下组成的组:脯氨酸、聚甘氨酸接头部分、PEG部分、Aun、Ava和Ahx。在一些实施方案中,第二肽选自自由以下组成的组:ADGN-100肽(例如,SEQ ID NO:55)、VEPEP-6肽(例如,SEQ ID NO:97)或VEPEP-9肽(例如,SEQ ID NO:120或121)。在一些实施方案中,第二肽包含选自自由SEQ ID NO:53-79组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽包含选自自由SEQ ID NO:80-107组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽包含选自自由SEQ ID NO:108-121组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽与嵌

合肽的摩尔比介于约1:1至约80:1之间(例如,约2:1至约10:1、约5:1)。在一些实施方案中,第二肽与嵌合肽复合。

[0168] 在一些实施方案中,提供了复合物或纳米颗粒,所述复合物或纳米颗粒包含a) 包含嵌合肽的运载物,所述嵌合肽包含通过接头连接至稳定肽的阻断肽(例如,连接至阻断肽的C端),其中所述阻断肽包含选自由SEQ ID NO:1、6和8-11组成的组的序列,其中所述稳定肽包含SEQ ID NO:55或97的氨基酸序列;和b) 第二肽,其中所述第二肽选自由以下组成的组:CADY、MPG、PEP-1肽、PEP-2肽、PEP-3肽(例如,SEQ ID NO:183)、LNCOV肽、VEPEP-3肽、VEPEP-4肽、VEPEP-5肽、VEPEP-6肽、VEPEP-9肽和ADGN-100肽。在一些实施方案中,稳定肽选自由以下组成的组:CADY、VEPEP-106肽、ADGN-100肽和VEPEP-109肽。在一些实施方案中,接头选自由以下组成的组:脯氨酸、聚甘氨酸接头部分、PEG部分、Aun、Ava和Ahx。在一些实施方案中,第二肽选自由以下组成的组:ADGN-100肽(例如,SEQ ID NO:55)、VEPEP-6肽(例如,SEQ ID NO:97)或VEPEP-9肽(例如,SEQ ID NO:120或121)。在一些实施方案中,第二肽包含选自由SEQ ID NO:53-79组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽包含选自由SEQ ID NO:80-107组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽包含选自由SEQ ID NO:108-121组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽与嵌合肽的摩尔比介于约1:1至约80:1之间(例如,约2:1至约10:1、约5:1)。在一些实施方案中,第二肽与嵌合肽复合。

[0169] 在一些实施方案中,提供了复合物,所述复合物包含a) 包含嵌合肽的运载物,所述嵌合肽包含通过接头连接至稳定肽的阻断肽(例如,连接至阻断肽的C端),其中所述阻断肽包含选自由SEQ ID NO:151、156和158-160组成的组的环状肽,其中所述稳定肽包含SEQ ID NO:55或97的氨基酸序列;和b) 第二肽,其中所述第二肽选自由以下组成的组:CADY、MPG、PEP-1肽、PEP-2肽、PEP-3肽(例如,SEQ ID NO:183)、LNCOV肽、VEPEP-3肽、VEPEP-4肽、VEPEP-5肽、VEPEP-6肽、VEPEP-9肽和ADGN-100肽。在一些实施方案中,稳定肽选自由以下组成的组:CADY、VEPEP-106肽、ADGN-100肽和VEPEP-109肽。在一些实施方案中,接头选自由以下组成的组:脯氨酸、聚甘氨酸接头部分、PEG部分、Aun、Ava和Ahx。在一些实施方案中,第二肽选自由以下组成的组:ADGN-100肽(例如,SEQ ID NO:55)、VEPEP-6肽(例如,SEQ ID NO:97)或VEPEP-9肽(例如,SEQ ID NO:120或121)。在一些实施方案中,第二肽包含选自由SEQ ID NO:53-79组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽包含选自由SEQ ID NO:80-107组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽包含选自由SEQ ID NO:108-121组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽与嵌合肽的摩尔比介于约1:1至约80:1之间(例如,约2:1至约10:1、约5:1)。在一些实施方案中,第二肽与嵌合肽复合。

[0170] 在一些实施方案中,提供了复合物或纳米颗粒,所述复合物或纳米颗粒包含a) 包含嵌合肽的运载物,所述嵌合肽包含通过接头连接至稳定肽的阻断肽(例如,连接至阻断肽的C端),其中所述阻断肽包含选自由SEQ ID NO:23、24、26-28、31和47-52组成的组的序列,其中所述稳定肽包含SEQ ID NO:55或97的氨基酸序列;和b) 第二肽,其中所述第二肽选自由以下组成的组:CADY、MPG、PEP-1肽、PEP-2肽、PEP-3肽(例如,SEQ ID NO:183)、LNCOV肽、VEPEP-3肽、VEPEP-4肽、VEPEP-5肽、VEPEP-6肽、VEPEP-9肽和ADGN-100肽。在一些实施方案中,稳定肽选自由以下组成的组:CADY、VEPEP-106肽、ADGN-100肽和VEPEP-109肽。在一些实施方案中,接头选自由以下组成的组:脯氨酸、聚甘氨酸接头部分、PEG部分、Aun、Ava和Ahx。

在一些实施方案中,第二肽选自由以下组成的组:ADGN-100肽(例如,SEQ ID NO:55)、VEPEP-6肽(例如,SEQ ID NO:97)或VEPEP-9肽(例如,SEQ ID NO:120或121)。在一些实施方案中,第二肽包含选自由SEQ ID NO:53-79组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽包含选自由SEQ ID NO:80-107组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽包含选自由SEQ ID NO:108-121组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽与嵌合肽的摩尔比介于约1:1至约80:1之间(例如,约2:1至约10:1、约5:1)。在一些实施方案中,第二肽与嵌合肽复合。

[0171] 在一些实施方案中,提供了复合物或纳米颗粒,所述复合物或纳米颗粒包含a)包含嵌合肽的运载物,所述嵌合肽包含SEQ ID NO:17、20、21、27、28、33、39和40中所列的氨基酸序列;和b)第二肽,其中所述第二肽选自由以下组成的组:CADY、MPG、PEP-1肽、PEP-2肽、PEP-3肽(例如,SEQ ID NO:183)、LNCOV肽、VEPEP-3肽、VEPEP-4肽、VEPEP-5肽、VEPEP-6肽、VEPEP-9肽和ADGN-100肽。在一些实施方案中,稳定肽选自由以下组成的组:CADY、VEPEP-106肽、ADGN-100肽和VEPEP-109肽。在一些实施方案中,接头选自由以下组成的组:脯氨酸、聚甘氨酸接头部分、PEG部分、Aun、Ava和Ahx。在一些实施方案中,第二肽选自由以下组成的组:ADGN-100肽(例如,SEQ ID NO:55)、VEPEP-6肽(例如,SEQ ID NO:97)或VEPEP-9肽(例如,SEQ ID NO:120或121)。在一些实施方案中,第二肽包含选自由SEQ ID NO:53-79组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽包含选自由SEQ ID NO:80-107组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽包含选自由SEQ ID NO:108-121组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽与嵌合肽的摩尔比介于约1:1至约80:1之间(例如,约2:1至约10:1、约5:1)。在一些实施方案中,第二肽与嵌合肽复合。

[0172] 在一些实施方案中,提供了复合物,所述复合物包含a)包含阻断肽的运载物,所述阻断肽包含SEQ ID NO:27、38、39、40中任一个的氨基酸序列;和b)第二肽,其中所述第二肽选自由以下组成的组:CADY、MPG、PEP-1肽、PEP-2肽、PEP-3肽(例如,SEQ ID NO:183)、LNCOV肽、VEPEP-3肽、VEPEP-4肽、VEPEP-5肽、VEPEP-6肽、VEPEP-9肽和ADGN-100肽。在一些实施方案中,第二肽选自由以下组成的组:ADGN-100肽(例如,SEQ ID NO:55)、VEPEP-6肽(例如,SEQ ID NO:97)或VEPEP-9肽(例如,SEQ ID NO:120或121)。在一些实施方案中,第二肽包含选自由SEQ ID NO:53-79组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽包含选自由SEQ ID NO:80-107组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽包含选自由SEQ ID NO:108-121组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽与阻断肽的摩尔比介于约1:1至约80:1之间(例如,约2:1至约10:1、约5:1)。在一些实施方案中,第二肽与阻断肽复合。

[0173] 在一些实施方案中,提供了复合物或纳米颗粒,所述复合物或纳米颗粒包含a)包含阻断肽的运载物,所述阻断肽包含SEQ ID NO:12-22、24-41和151-160中任一个的氨基酸序列;和b)第二肽,其中所述第二肽选自由以下组成的组:CADY、MPG、PEP-1肽、PEP-2肽、PEP-3肽(例如,SEQ ID NO:183)、LNCOV肽、VEPEP-3肽、VEPEP-4肽、VEPEP-5肽、VEPEP-6肽、VEPEP-9肽和ADGN-100肽。在一些实施方案中,第二肽选自由以下组成的组:ADGN-100肽(例如,SEQ ID NO:55)、VEPEP-6肽(例如,SEQ ID NO:97)或VEPEP-9肽(例如,SEQ ID NO:120或121)。在一些实施方案中,第二肽包含选自由SEQ ID NO:53-79组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽包含选自由SEQ ID NO:80-107组成的组的氨基酸序列。在一些实

施方案中,第二肽包含选自由SEQ ID NO:108-121组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽与阻断肽的摩尔比介于约1:1至约80:1之间(例如,约2:1至约10:1、约5:1)。在一些实施方案中,第二肽与阻断肽复合。

[0174] 在一些实施方案中,提供了复合物或纳米颗粒,所述复合物或纳米颗粒包含a) 包含阻断肽的运载物,所述阻断肽包含SEQ ID NO:12、17、19-22、24、26-28、31-33、35、38-40、151、156和158-160中任一个的氨基酸序列;和b) 第二肽,其中所述第二肽选自由以下组成的组:CADY、MPG、PEP-1肽、PEP-2肽、PEP-3肽(例如,SEQ ID NO:183)、LNCOV肽、VEPEP-3肽、VEPEP-4肽、VEPEP-5肽、VEPEP-6肽、VEPEP-9肽和ADGN-100肽。在一些实施方案中,第二肽选自由以下组成的组:ADGN-100肽(例如,SEQ ID NO:55)、VEPEP-6肽(例如,SEQ ID NO:97)或VEPEP-9肽(例如,SEQ ID NO:120或121)。在一些实施方案中,第二肽包含选自由SEQ ID NO:53-79组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽包含选自由SEQ ID NO:80-107组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽包含选自由SEQ ID NO:108-121组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽与阻断肽的摩尔比介于约1:1至约80:1之间(例如,约2:1至约10:1、约5:1)。在一些实施方案中,第二肽与阻断肽复合。

[0175] 在一些实施方案中,提供了复合物或纳米颗粒,所述复合物或纳米颗粒包含a) 包含靶向SARS-CoV-2核衣壳的siRNA的运载物;和b) 第二肽,其中所述第二肽选自由以下组成的组:CADY、MPG、PEP-1肽、PEP-2肽、PEP-3肽(例如,SEQ ID NO:183)、LNCOV肽、VEPEP-3肽、VEPEP-4肽、VEPEP-5肽、VEPEP-6肽、VEPEP-9肽和ADGN-100肽。在一些实施方案中,第二肽选自由以下组成的组:ADGN-100肽(例如,SEQ ID NO:55)、VEPEP-6肽(例如,SEQ ID NO:97)或VEPEP-9肽(例如,SEQ ID NO:120或121)。在一些实施方案中,第二肽包含选自由SEQ ID NO:53-79组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽包含选自由SEQ ID NO:80-107组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽包含选自由SEQ ID NO:108-121组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽与siRNA的摩尔比介于约1:1至约80:1之间(例如,约5:1至约50:1、约20:1)。在一些实施方案中,第二肽与阻断肽复合。在一些实施方案中,siRNA包含SEQ ID NO:161-170中任一个的核酸序列。在一些实施方案中,siRNA包含选自由SEQ ID NO 163、166、168和170组成的组的核酸序列。在一些实施方案中,siRNA包含SEQ ID NO:166的核酸序列。

[0176] 在一些实施方案中,提供了复合物或纳米颗粒,所述复合物或纳米颗粒包含a) 包含siRNA的运载物,所述siRNA包含选自由SEQ ID NO 163、166、168和170(例如,SEQ ID NO:66)组成的组的核酸序列;和b) 选自由ADGN-100肽(例如,SEQ ID NO:55)、VEPEP-6肽(例如,SEQ ID NO:97)或VEPEP-9肽(例如,SEQ ID NO:120或121)组成的组的第二肽,其中所述siRNA与所述第二肽复合。在一些实施方案中,第二肽与siRNA的摩尔比介于约1:1至约80:1之间(例如,约5:1至约50:1、约20:1)。

[0177] 在一些实施方案中,提供了复合物或纳米颗粒,所述复合物或纳米颗粒包含a) 运载物,所述运载物包含i) 嵌合肽,所述嵌合肽包含SEQ ID NO:17、20、21、27、28、33、39和40中所列的氨基酸序列,ii) siRNA,所述siRNA包含选自由SEQ ID NO 163、166、168和170(例如,SEQ ID NO:166)组成的组的核酸序列;和b) 第二肽,其中所述第二肽选自由以下组成的组:CADY、MPG、PEP-1肽、PEP-2肽、PEP-3肽(例如,SEQ ID NO:183)、LNCOV肽、VEPEP-3肽、VEPEP-4肽、VEPEP-5肽、VEPEP-6肽、VEPEP-9肽和ADGN-100肽。在一些实施方案中,第二肽选

自由以下组成的组:ADGN-100肽(例如,SEQ ID NO:55)、VEPEP-6肽(例如,SEQ ID NO:97)或VEPEP-9肽(例如,SEQ ID NO:120或121)。在一些实施方案中,第二肽包含选自SEQ ID NO:53-79组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽包含选自SEQ ID NO:80-107组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽包含选自SEQ ID NO:108-121组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽与siRNA的摩尔比介于约1:1至约80:1之间(例如,约5:1至约50:1、约20:1)。在一些实施方案中,第二肽与嵌合肽的摩尔比介于约1:1至约80:1之间(例如,约2:1至约10:1、约5:1)。

[0178] 在一些实施方案中,提供了复合物或纳米颗粒,所述复合物或纳米颗粒包含a)运载物,所述运载物包含i)阻断肽,所述阻断肽包含SEQ ID NO:12、17、19-22、24、26-28、31-33、35、38-40、151、156和158-160中任一个的氨基酸序列,ii)siRNA,所述siRNA包含选自SEQ ID NO 163、166、168和170(例如,SEQ ID NO:166)组成的组的核酸序列;和b)第二肽,其中所述第二肽选自自由以下组成的组:CADY、MPG、PEP-1肽、PEP-2肽、PEP-3肽(例如,SEQ ID NO:183)、LNCOV肽、VEPEP-3肽、VEPEP-4肽、VEPEP-5肽、VEPEP-6肽、VEPEP-9肽和ADGN-100肽。在一些实施方案中,第二肽选自自由以下组成的组:ADGN-100肽(例如,SEQ ID NO:55)、VEPEP-6肽(例如,SEQ ID NO:97)或VEPEP-9肽(例如,SEQ ID NO:120或121)。在一些实施方案中,第二肽包含选自SEQ ID NO:53-79组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽包含选自SEQ ID NO:80-107组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽包含选自SEQ ID NO:108-121组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二肽与siRNA的摩尔比介于约1:1至约80:1之间(例如,约5:1至约50:1、约20:1)。在一些实施方案中,第二肽与阻断肽的摩尔比介于约1:1至约80:1之间(例如,约2:1至约10:1、约5:1)。

[0179] 运载物分子

[0180] 在一些实施方案中,如上所述的复合物或纳米颗粒的运载物分子选自自由以下组成的组:核酸(如本文所述的任何siRNA)、肽(如本文所述的任何嵌合肽或阻断肽)和肽/核酸复合物。

[0181] 核酸

[0182] 在一些实施方案中,如上所述的复合物或纳米颗粒的运载物分子包含核酸。在一些实施方案中,核酸选自自由以下组成的组:寡核苷酸、多核苷酸、单链或双链寡核苷酸和多核苷酸、反义寡核苷酸、各种形式的RNAi,包括例如siRNA、shRNA等、微小RNA(miRNA)、antagomir、核酶、适体、质粒DNA等以及其一种或多种的合适组合。在一些实施方案中,核酸选自自由以下组成的组:siRNA、miRNA、shRNA、gRNA、mRNA、DNA、DNA质粒、寡核苷酸以及它们的类似物。在一些实施方案中,核酸包含mRNA。在一些实施方案中,核酸包含RNAi。在一些实施方案中,核酸包含mRNA和RNAi,并且其中所述mRNA编码用于治疗疾病或疾患的治疗性蛋白质,并且其中所述RNAi靶向RNA,其中所述RNA的表达与SARS-CoV-2相关或与SARS-CoV-2相关的疾病或疾患相关。在一些实施方案中,细胞穿透肽与核酸的摩尔比介于约1:1与约100:1之间。

[0183] 在一些实施方案中,核酸是单链寡核苷酸。在一些实施方案中,核酸是双链寡核苷酸。本文所述的核酸可以是在反义寡核苷酸、RNAi、siRNA、shRNA、iRNA、antagomir的情况下至多但不必是200个核苷酸或在质粒DNA的情况下至多1000千碱基的任何长度范围。

[0184] 在一些实施方案中,核酸是干扰RNA,如siRNA(如本文描述的任何siRNA)或shRNA。

术语“干扰RNA”或“RNAi”或“干扰RNA序列”是指在干扰RNA处于与靶基因或序列相同的细胞中时,能够减少或抑制靶基因或序列的表达(例如,通过介导降解或抑制与干扰RNA序列互补的mRNA的翻译)的单链RNA(例如,成熟miRNA)或双链RNA(即,双链体RNA,如siRNA、aiRNA或前体miRNA),干扰RNA因此是指与靶mRNA序列或与由两条互补链或由单一自互补链形成的双链RNA互补的单链RNA。干扰RNA可与靶基因或序列基本同一或完全同一,或者可包含错配区(即,错配基序)。干扰RNA的序列可对应于全长靶基因或其子序列。干扰RNA包括“小干扰RNA”或“siRNA”,例如长度为约15-60、15-50或5-40个(双链体)核苷酸的干扰RNA,更通常地长度为约15-30、15-25或19-25个(双链体)核苷酸,并且优选地长度为约20-24、21-22或21-23个(双链体)核苷酸(例如,双链siRNA的每个互补序列的长度均为15-60、15-50、15-40、15-30、15-25或19-25个核苷酸,优选地长度为约20-24、21-22或21-23个核苷酸,并且双链siRNA的长度为约15-60、15-50、15-40、5-30、5-25或19-25个碱基对,优选地长度为约8-22、9-20或19-21个碱基对)。

[0185] 在一些实施方案中,核酸是双链反义RNA。干扰RNA的合适长度是约5至约200个核苷酸,或10-50个核苷酸或碱基对,或15-30个核苷酸或碱基对。在一些实施方案中,干扰RNA与相应的靶基因基本上是互补的(如至少约60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%或更高同一)。在一些实施方案中,对反义RNA进行修饰,例如通过并入非天然存在的核苷酸。

[0186] 在一些实施方案中,核酸是编码参与SARS-COV-2或与SARS-COV-2相关的疾病的蛋白质的干扰RNA,如特异性地靶向RNA分子(如mRNA)的siRNA。

[0187] 在一些实施方案中,siRNA靶向SARS-CoV-2核衣壳。在一些实施方案中,siRNA包含SEQ ID NO:161-170中任一个的核酸序列。在一些实施方案中,siRNA包含选自由SEQ ID NO 163、166、168和170组成的组的核酸序列。在一些实施方案中,siRNA包含SEQ ID NO:166的核酸序列。

[0188] 在一些实施方案中,siRNA靶向SARS-CoV-2ORF 3A基因。在一些实施方案中,siRNA包含SEQ ID NO:171-175中任一个的核酸序列。在一些实施方案中,siRNA包含选自由SEQ ID NO 171、173和174组成的组的核酸序列。

[0189] 在一些实施方案中,siRNA靶向SARS-CoV-2ORF 8基因。在一些实施方案中,siRNA包含SEQ ID NO:176-179中任一个的核酸序列。在一些实施方案中,siRNA包含选自由SEQ ID NO 177、178和180组成的组的核酸序列。

[0190] 在一些实施方案中,核酸是miRNA。微小RNA(缩写为miRNA)是在真核细胞中发现的短核糖核酸(RNA)分子。与其它RNA相比,微小RNA分子的核苷酸很少(平均22个)。miRNA是转录后调控因子,它们与靶信使RNA转录物(mRNA)上的互补序列结合,通常导致翻译抑制或靶标降解和基因沉默。人基因组可编码超过1000种miRNA,所述miRNA可靶向约60%的哺乳动物基因,并且在许多人类细胞类型中丰富。miRNA的合适长度是约5至约200个核苷酸,或0-50个核苷酸或碱基对,或15-30个核苷酸或碱基对。在一些实施方案中,miRNA与相应的靶基因基本上互补(如至少约60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%或更高同一)。在一些实施方案中,对反义RNA进行修饰,例如通过并入非天然存在的核苷酸。

[0191] 在一些实施方案中,核酸是质粒DNA或DNA片段(例如长度至多约1000bp的DNA片段)。此外,质粒DNA或DNA片段可以是高甲基化或低甲基化的。在一些实施方案中,质粒DNA或DNA片段编码一种或多种基因,并且可含有表达所述一种或多种基因所必需的调控元件。

在一些实施方案中,质粒DNA或DNA片段可包含一种或多种编码选择性标记的基因,从而允许在适当的宿主细胞中维持质粒DNA或DNA片段。

[0192] 肽

[0193] 在一些实施方案中,运载物分子包含抑制ACE2与SPIKE之间的相互作用的阻断肽(如本文所述的任何阻断肽)。在一些实施方案中,运载物分子包含嵌合肽,如本文所述的任何嵌合肽。

[0194] 在一些实施方案中,运载物分子包含特异性地靶向ACE2(例如,人ACE2)的阻断肽。在一些实施方案中,阻断肽包含源自刺突蛋白(例如,人ACE2)的氨基酸序列。在一些实施方案中,氨基酸序列包含在SPIKE的受体结合结构域(RBD)内的环序列。在一些实施方案中,环序列位于SPIKE的受体结合基序(RBM)内。在一些实施方案中,环序列位于选自自由环 $\alpha 4$ - $\beta 5$ 、环 $\beta 5$ - $\beta 6$ 和环 $\beta 6$ - $\alpha 5$ 组成的组的任何RBM结构基序内。

[0195] 在一些实施方案中,环序列选自自由SEQ ID NO:1-11和42-46组成的组。在一些实施方案中,环序列选自自由SEQ ID NO:1、6、8-11、42和45组成的组。在一些实施方案中,阻断肽包含选自自由SEQ ID NO:1、6和8-11组成的组的序列。

[0196] 在一些实施方案中,运载物分子包含特异性地靶向刺突蛋白的抑制肽。在一些实施方案中,抑制肽包含源自ACE2(例如,人ACE2)的氨基酸序列。

[0197] 在一些实施方案中,阻断肽包含源自ACE2(如人ACE2)的胞外域内的序列(如环序列或 $\alpha$ 螺旋基序)的序列。在一些实施方案中,阻断肽包含源自人ACE2的 $\alpha 1$ 螺旋内的序列的序列。在一些实施方案中,阻断肽包含源自人ACE2的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 螺旋内的序列的序列。在一些实施方案中,阻断肽包含源自人ACE2的 $\beta 3$ 链与 $\beta 4$ 链之间的环序列的序列。

[0198] 在一些实施方案中,源自ACE2的胞外域内的序列的序列与ACE2的胞外域内的序列在所述序列的C端处的一个、两个或三个氨基酸中不同。

[0199] 在一些实施方案中,阻断肽包含在ACE2的胞外域内的序列。

[0200] 在一些实施方案中,阻断肽包含选自自由SEQ ID NO:23-31和47-52组成的组的序列。在一些实施方案中,阻断肽包含选自自由SEQ ID NO:23、24、26-28、31和47-52组成的组的序列。在一些实施方案中,阻断肽包含选自自由SEQ ID NO:23、24、26-28和31组成的组的序列。

[0201] 在一些实施方案中,阻断肽包含选自SEQ ID NO:151-160中任一个的环状肽。在一些实施方案中,阻断肽包含选自自由SEQ ID NO:151、156和158-160组成的组的环状肽。

[0202] 在一些实施方案中,阻断肽包含选自SEQ ID NO:12-22和24-41中任一个的非天然存在的肽。

[0203] 肽/核酸复合物

[0204] 在一些实施方案中,运载物包含两个或更多个运载物分子,所述运载物分子包含:  
a) 编码参与SARS-COV-2或与SARS-COV-2相关的疾病的蛋白质的核酸(如特异性地靶向RNA分子(如mRNA)的siRNA);和b) 抑制ACE2与SPIKE之间的相互作用的阻断肽。在一些实施方案中,核酸是靶向SARS-CoV-2核衣壳的siRNA。

[0205] 在一些实施方案中,阻断肽与siRNA的摩尔比介于约1:5至约50:1之间(例如,约1:1至约20:1、约2:1至约10:1、约4:1)。

[0206] 示例性核酸包括本文所述的任何siRNA。在一些实施方案中,核酸包含siRNA,所述

siRNA包含选自SEQ ID NO 163、166、168和170组成的组的核酸序列。在一些实施方案中，siRNA包含SEQ ID NO:166的核酸序列。

[0207] 示例性阻断肽包括本文所述的任何嵌合肽或阻断肽。在一些实施方案中，阻断肽包含a) 选自SEQ ID NO:151、156和158-160组成的组的环状肽；或b) 包含选自SEQ ID NO:1、6、8-11、12、17、19-24、26-28、31-33、35、38-40、45、47、48、50和52组成的组的序列的肽。

[0208] 第二肽

[0209] 在一些实施方案中，本文所述的第二肽在与运载物复合后能够自组装在纳米结构（例如，具有不超过200nm的直径）。

[0210] 第二肽可以是任何上述稳定肽。

[0211] 细胞穿透肽

[0212] 在一些实施方案中，第二肽是细胞穿透肽。细胞穿透肽(CPP)是有前景的非病毒策略之一。尽管CPP的定义在不断发展，但它们通常被描述为源自蛋白质或源自嵌合序列的少于30个氨基酸的短肽。它们通常是两亲性的并且带有净正电荷(Langel U(2007) Handbook of Cell-Penetrating Peptides(CRC Taylor&Francis,Boca Raton);Heitz等人(2009)Br J Pharmacol 157,195-206)。CPP能够穿透生物膜，以触发各种生物分子移动跨过细胞膜进入细胞质，并改善它们的细胞内路线，从而促进与靶标的相互作用。CPP可分为两大类，第一类需要与运载物的化学键联，并且第二类涉及形成稳定的非共价复合物。据报道，来自两种策略的CPP有利于将大量运载物(质粒DNA、寡核苷酸、siRNA、PNA、蛋白质、肽、脂质体、纳米颗粒……)递送至多种细胞类型和体内模型中(Langel U(2007) Handbook of Cell-Penetrating Peptides(CRC Taylor&Francis,Boca Raton);Heitz等人(2009)Br J Pharmacol 157,195-206;Mickan等人(2014)Curr Pharm Biotechnol 15,200-209;Shukla等人(2014)Mol Pharm 11,3395-3408)。

[0213] 蛋白质转导结构域(PTD)的概念最初是基于以下观察结果提出的：一些蛋白质(主要是转录因子)可在细胞内穿梭以及从一个细胞穿梭至另一个细胞(关于综述，参见Langel U(2007) Handbook of Cell-Penetrating Peptides(CRC Taylor&Francis,Boca Raton);Heitz等人(2009)Br J Pharmacol 157,195-206)。第一次观察是在1988由Frankel和Pabo进行的。他们表明，HIV-1的转录反式激活(Tat)蛋白可进入细胞并转移至细胞核中。在1991年，Prochiantz小组对果蝇触角足同源结构域得出了相同的结论，并证明此结构域被神经元细胞内化。这些工作是1994年发现第一个蛋白质转导结构域的起源：源自称为穿膜肽的触角足的同源结构域的第三螺旋的16聚体肽。在1997年，Lebleu小组鉴定了细胞摄取所需的最小Tat序列，并且Dowdy小组报告了PTD在体内应用于递送小肽和大蛋白质的第一个概念验证(Gump JM和Dowdy SF(2007)Trends Mol Med 13,443-448.)。从历史上看，细胞穿透肽(CPP)的概念是由Langel小组于1998年引入的，其中设计了第一嵌合肽载体转运肽(Transportan)，其源自连接至蜂毒肽(一种黄蜂毒肽)的神经肽甘丙肽的N端片段。转运肽最初据报道可改善培养细胞和体内的PNA(肽核酸)的递送(Langel U(2007) Handbook of Cell-Penetrating Peptides(CRC Taylor&Francis,Boca Raton))。在1997年，Heitz和Divita小组提出了涉及CPP与其运载物形成稳定但非共价复合物的一种新策略(Morris等人(1997)Nucleic Acids Res 25,2730-2736)。所述策略首先基于由两个结构域组成的短

肽载体(MPG):亲水性(极性)结构域和疏水性(非极性)结构域。MPG被设计用于递送核酸。然后提出将主要的两亲性肽Pep-1用于蛋白质和肽的非共价递送(Morris等人(2001) *Nat Biotechnol* 19,1173-1176)。然后Wender和Futaki的小组证明聚精氨酸序列(Arg8)足以将小分子和大分子驱动到细胞和体内(Nakase等人(2004) *Mol Ther* 10,1011-1022;Rothbard等人(2004) *J Am Chem Soc* 126,9506-9507)。从那以后,许多源自天然或非天然序列的CPP已被鉴定出,并且列表还在不断增加。肽来源于单纯疱疹病毒的VP22蛋白、降钙素、抗菌肽或毒素肽、参与细胞周期调控的蛋白质以及富含聚脯氨酸的肽(Heitz等人(2009) *Br J Pharmacol* 157,195-206)。最近,描述了基于二级两亲性CPP的新非共价策略。这些肽如上述CADY和VEPEP家族能够自组装成螺旋形状,在分子的不同侧上具有亲水性和疏水性残基(即,两亲性螺旋)。WO2014/053879公开了VEPEP-3肽;WO2014/053881公开了VEPEP-4肽;WO2014/053882公开了VEPEP-5肽;WO2012/137150公开了VEPEP-6肽;WO2014/053880公开了VEPEP-9肽;WO 2016/102687公开了ADGN-100肽;US2010/0099626公开了CADY肽;并且美国专利号7,514,530公开了MPG肽;其公开内容特此以引用的方式整体并入本文。

[0214] 在一些实施方案中,第二肽选自自由以下组成的组:CADY、MPG、PEP-1肽(例如,SEQ ID NO:181)、PEP-2肽(例如,SEQ ID NO:182)、PEP-3肽(例如,SEQ ID NO:183)、LNCOV肽、VEPEP-3肽、VEPEP-6肽、VEPEP-9肽和ADGN-100肽。在一些实施方案中,第二肽包含ADGN-100肽。在一些实施方案中,第二肽包含VEPEP-6肽。在一些实施方案中,第二肽是VEPEP-9肽。

[0215] LNCOV肽

[0216] 在一些实施方案中,第二肽包含LNCOV肽。如实施例13所示,示例性LNCOV肽(LNCOV-15和LNCOV-18)促进细胞内的运载物(如siRNA)递送。在一些实施方案中,LNCOV肽包含SEQ ID NO:12-22、27、28和31-41中任一个的氨基酸序列。在一些实施方案中,LNCOV肽包含SEQ ID NO:17或33的氨基酸序列。

[0217] 第二肽修饰

[0218] 在一些实施方案中,第二肽(如本文所述的CPP,例如VEPEP-3肽、VEPEP-6肽、VEPEP-9肽或ADGN-100肽)还包含连接至(例如,共价连接至)第二肽的N端的一个或多个部分。在一些实施方案中,一个或多个部分共价连接至第二肽的N端。在一些实施方案中,一个或多个部分选自自由以下组成的组:乙酰基、硬脂基、脂肪酸、胆固醇、聚乙二醇、核定位信号、核输出信号、抗体或其抗体片段、肽、多糖、接头部分和靶向部分。在一些实施方案中,一个或多个部分包含共价连接至第二肽的N端的乙酰基。

[0219] 在一些实施方案中,本文所述的第二肽(例如,VEPEP-3肽、VEPEP-6肽、VEPEP-9肽或ADGN-100肽)还包含连接至(例如,共价连接至)第二肽的C端的一个或多个部分。在一些实施方案中,一个或多个部分选自自由以下组成的组:半胱胺基团、半胱氨酸、硫醇、酰胺、次氨基三乙酸、羧基、直链或分枝C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基、伯胺或仲胺、糖苷(osidic)衍生物、脂质、磷脂、脂肪酸、胆固醇、聚乙二醇、核定位信号、核输出信号、抗体或其抗体片段、肽、多糖、接头部分和靶向部分。在一些实施方案中,一个或多个部分包含半胱胺基团。

[0220] 在一些实施方案中,本文所述的第二肽(例如,PEP-1、PEP-2、VEPEP-3肽、VEPEP-4肽、VEPEP-5肽、VEPEP-6肽、VEPEP-9肽或ADGN-100肽)被钉合。如本文所用的“钉合”是指肽中两个残基之间的化学键联。在一些实施方案中,第二肽被钉合,包含肽的两个氨基酸之间的化学键联。在一些实施方案中,通过化学键联连接的两个氨基酸被3或6个氨基酸隔开。在

一些实施方案中,通过化学键连接的两个氨基酸被3个氨基酸隔开。在一些实施方案中,通过化学键连接的两个氨基酸被6个氨基酸隔开。在一些实施方案中,通过化学键连接的两个氨基酸中的每一个均是R或S。在一些实施方案中,通过化学键连接的两个氨基酸中的每一个均是R。在一些实施方案中,通过化学键连接的两个氨基酸中的每一个均是S。在一些实施方案中,通过化学键连接的两个氨基酸中的一个R,并且另一个是S。在一些实施方案中,化学键是肽键。

[0221] 在一些实施方案中,第二肽是包含L-氨基酸的L-肽。在一些实施方案中,第二肽是逆向-反转肽(例如,由反向序列中的D-氨基酸组成的肽,并且在延伸时呈现与其母体分子相似的侧链拓扑结构,但具有反向酰胺肽键)。在一些实施方案中,逆向-反转肽包含SEQ ID NO:66、67或98的序列。

[0222] 在一些实施方案中,CPP从N端包含共价连接至细胞穿透肽的N端的乙酰基、靶向部分和接头部分。

[0223] 靶向部分

[0224] 在一些实施方案中,第二肽包含靶向部分。在一些实施方案中,靶向部分促进复合物或纳米颗粒递送至特定器官或组织中。在一些实施方案中,靶向部分缀合至第二肽的N端。在一些实施方案中,靶向部分缀合至第二肽的C端。在一些实施方案中,第一靶向部分缀合至第二肽的N端,并且第二靶向部分缀合至第二肽的C端。

[0225] 在一些实施方案中,靶向部分包含靶向一个或多个器官的靶向肽。在一些实施方案中,一个或多个器官选自以下组成的组:肌肉、心脏、脑、脾、淋巴结、肝、肺和肾。在一些实施方案中,靶向肽靶向肺。在一些实施方案中,靶向肽包含YIGSR(SEQ ID NO:185)的氨基酸序列。

[0226] 在一些实施方案中,靶向部分通过接头(如本文所述的任何接头)连接至第二肽。

[0227] 纳米颗粒

[0228] 本申请在一个方面提供了包含核心的纳米颗粒,所述核心包含任何一种或多种上述复合物。

[0229] 在一些实施方案中,提供了包含核心的纳米颗粒,所述核心包含本文所述的复合物,其中所述复合物中的第二肽(如细胞穿透肽)与运载物缔合。在一些实施方案中,缔合是非共价。在一些实施方案中,缔合是共价。

[0230] 在一些实施方案中,纳米颗粒还包含含有外周细胞穿透肽(即CPP)的表面层(例如壳),其中核心被壳包被。在一些实施方案中,外周CPP与核心中的第二肽相同。在一些实施方案中,外周CPP与核心中的第二肽不同。在一些实施方案中,外周CPP包括但不限于基于PTD的肽、两亲性肽、基于聚精氨酸的肽、MPG肽、CADY肽、VEPEP肽(如VEPEP-3、VEPEP-4、VEPEP-5、VEPEP-6或VEPEP-9肽)、ADGN-100肽、Pep-1肽和Pep-2肽。在一些实施方案中,外周CPP是VEPEP-3肽、VEPEP-6肽、VEPEP-9肽或ADGN-100肽。在一些实施方案中,外周细胞穿透肽选自以下组成的组:PEP-1肽、PEP-2肽、PEP-3肽、VEPEP-3肽、VEPEP-6肽、VEPEP-9肽和ADGN-100肽。在一些实施方案中,表面层中的至少一些外周细胞穿透肽与靶向部分连接。在一些实施方案中,键是共价。在一些实施方案中,共价键是通过化学偶联。在一些实施方案中,共价键是通过遗传方法。在一些实施方案中,纳米颗粒还包含在纳米颗粒的核心与表面层之间的中间体层。在一些实施方案中,中间体层包含中间体CPP。在一些实施方案

中,中间体CPP与核心中的第二肽相同。在一些实施方案中,中间体CPP与核心中的第二肽不同。在一些实施方案中,中间体CPP包括但不限于基于PTD的肽、两亲性肽、基于聚精氨酸的肽、MPG肽、CADY肽、VEPEP肽(如VEPEP-3、VEPEP-6或VEPEP-9肽)、ADGN-100肽、Pep-1肽和Pep-2肽。在一些实施方案中,中间体CPP是VEPEP-3肽、VEPEP-6肽、VEPEP-9肽或ADGN-100肽。

[0231] 在一些实施方案中,纳米颗粒核心包含多种复合物。在一些实施方案中,纳米颗粒核心包含以预定比率存在的多种复合物。在一些实施方案中,选择预定比率以允许在下文更详细描述的任何方法中最有效地使用纳米颗粒。在一些实施方案中,纳米颗粒核心还包含一种或多种额外的siRNA、一种或多种本文所述的额外嵌合肽或阻断肽和/或一种或多种第二肽(如细胞穿透肽)。

[0232] 在一些实施方案中,纳米颗粒包含a)第一复合物,所述第一复合物包含与第二肽(如本文描述的第二肽中的任一种)复合的第一嵌合肽或阻断肽(如本文描述的任何嵌合肽或阻断肽);和b)第二复合物,所述第二复合物包含与第三肽(如“第二肽”部分中描述的任何肽)复合的第二嵌合肽或阻断肽(如本文描述的任何嵌合肽或阻断肽),其中所述第一嵌合肽或阻断肽靶向ACE2,并且其中所述第二嵌合肽或阻断肽靶向SPIKE。在一些实施方案中,第一嵌合肽或阻断肽包含选自由SEQ ID NO:1、6、8-11、42和45组成的组的环序列。在一些实施方案中,第二嵌合肽或阻断肽包含选自由SEQ ID NO:23、24、26-28、31和47-52组成的组的序列。

[0233] 在一些实施方案中,纳米颗粒包含a)第一复合物,所述第一复合物包含与第二肽(如本文描述的第二肽中的任一种)复合的嵌合肽或阻断肽(如本文描述的任何嵌合肽或阻断肽);和b)第二复合物,所述第二复合物包含与第三肽(如“第二肽”部分中描述的任何肽)复合的siRNA(如本文描述的任何siRNA),其中所述嵌合肽或阻断肽抑制ACE2与SPIKE之间的相互作用,并且其中所述siRNA靶向SPIKE的核衣壳。在一些实施方案中,嵌合肽或阻断肽包含SEQ ID NO:17、20、21、27、28、33、39和40中所列的氨基酸序列。在一些实施方案中,siRNA包含选自由SEQ ID NO 163、166、168和170(例如,SEQ ID NO:166)组成的组的核酸序列。

[0234] 在一些实施方案中,纳米颗粒包含a)第一复合物,所述第一复合物包含与第二肽(如本文描述的第二肽中的任一种)复合的第一嵌合肽或阻断肽(如本文描述的任何嵌合肽或阻断肽),b)第二复合物,所述第二复合物包含与第三肽(如“第二肽”部分中描述的任何肽)复合的第二嵌合肽或阻断肽(如本文描述的任何嵌合肽或阻断肽);和c)第三复合物,所述第三复合物包含与第四肽(如“第二肽”部分中描述的任何肽)复合的siRNA(如本文所述的任何siRNA),其中所述第一嵌合肽或阻断肽靶向ACE2,其中所述第二嵌合肽或阻断肽靶向SPIKE,并且其中所述siRNA靶向SPIKE的核衣壳。在一些实施方案中,第一嵌合肽或阻断肽包含选自由SEQ ID NO:1、6、8-11、42和45组成的组的环序列。在一些实施方案中,第二嵌合肽或阻断肽包含选自由SEQ ID NO:23、24、26-28、31和47-52组成的组的序列。在一些实施方案中,siRNA包含选自由SEQ ID NO 163、166、168和170(例如,SEQ ID NO:166)组成的组的核酸序列。

[0235] 在一些实施方案中,上述第二、第三和第四肽中的一种或多种包含细胞穿透肽,所述细胞穿透肽包括但不限于基于PTD的肽、两亲性肽、基于聚精氨酸的肽、MPG肽、CADY肽、

VEPEP肽(如VEPEP-3、VEPEP-6或VEPEP-9肽)、ADGN-100肽、Pep-1肽和Pep-2肽。在一些实施方案中,第二、第三和第四肽中的一种或多种中的至少一些连接至靶向部分。在一些实施方案中,键联是共价。

[0236] 在根据本文所述的任何纳米颗粒的一些实施方案中,纳米颗粒的平均尺寸(直径)是约20nm至约1000nm,包括例如约20nm至约800nm、约20nm至约600nm,约20nm至约600nm以及约20nm至约400nm。在一些实施方案中,纳米颗粒的平均尺寸(直径)不大于约1000纳米(nm),如不大于约900、800、700、600、500、400、300、200、100、90、80、70或60nm中的任一个。在一些实施方案中,纳米颗粒的平均(average或mean)直径不大于约100nm。在一些实施方案中,纳米颗粒的平均直径不大于约60nm。在一些实施方案中,纳米颗粒的平均直径是约20nm至约100nm。在一些实施方案中,纳米颗粒的平均直径是约20nm至约80nm。在一些实施方案中,纳米颗粒的平均直径是约30nm至约60nm。

[0237] 在一些实施方案中,纳米颗粒的平均直径不大于约150nm。在一些实施方案中,纳米颗粒的平均直径不大于约100nm。在一些实施方案中,纳米颗粒的平均直径是约20nm至约400nm。在一些实施方案中,纳米颗粒的平均直径是约30nm至约400nm。在一些实施方案中,纳米颗粒的平均直径是约40nm至约300nm。在一些实施方案中,纳米颗粒的平均直径是约50nm至约200nm。在一些实施方案中,纳米颗粒的平均直径是约60nm至约150nm。在一些实施方案中,纳米颗粒的平均直径是约70nm至约100nm。

[0238] 确定平均粒度的方法是本领域已知的,例如,动态光散射(DLS)已常规用于确定基于亚微米尺寸的粒子的尺寸。国际标准ISO22412粒度分析-动态光散射,国际标准化组织(ISO)2008和动态光散射常用术语定义,Malvern Instruments Limited,2011。在一些实施方案中,粒度被测量为组合物中纳米颗粒的体积加权平均粒度(Dv50)。

[0239] 在一些实施方案中,纳米颗粒是无菌滤过性的。

[0240] 在一些实施方案中,纳米颗粒的 $\zeta$ 电位是约-30mV至约60mV(如约-30、-25、-20、-15、-10、-5、0、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55和60mV中的任一个,包括这些值之间的任何范围)。在一些实施方案中,纳米颗粒的 $\zeta$ 电位是约-30mV至约30mV,包括例如约-25mV至约25mV、约-20mV至约20mV、约-15mV至约15mV、约-10mV至约10mV以及约-5mV至约10mV。在一些实施方案中,纳米颗粒的多分散性指数(PI)是约0.05至约0.6(如约0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55和0.6中的任一个,包括这些值之间的任何范围)。在一些实施方案中,纳米颗粒的多分散性指数(PI)是约0.1至约0.4或约0.15至约0.3。在一些实施方案中,纳米颗粒是基本上无毒的。可用Zetasizer 4装置(Malvern Ltd)测量 $\zeta$ 电位。

[0241] 组合物

[0242] 在一些实施方案中,提供了包含如本文所述的任何嵌合肽、阻断肽、siRNA、复合物或纳米颗粒的组合物(例如,药物组合物)。在一些实施方案中,组合物是药物组合物,所述药物组合物包含如本文所述的嵌合肽、阻断肽、siRNA、复合物或纳米颗粒中的任一种以及药学上可接受的稀释剂、赋形剂和/或载体。

[0243] 在一些实施方案中,组合物包含两种或更多种纳米颗粒的混合物,其中所述两种或更多种纳米颗粒包含不同的运载物。例如,在一些实施方案中,组合物包含a)如上所述的第一纳米颗粒,所述第一纳米颗粒包含特异性地靶向ACE2或SPIKE的嵌合肽或阻断肽;和b)第二纳米颗粒,所述第二纳米颗粒包含特异性地靶向SARS-CoV-2的核衣壳的siRNA。在一些

实施方案中,嵌合肽或阻断肽包含SEQ ID NO:17、20、21、27、28、33、39和40中所列的氨基酸序列。在一些实施方案中,siRNA包含选自SEQ ID NO 163、166、168和170(例如,SEQ ID NO:166)组成的组的核酸序列。

[0244] 在一些实施方案中,组合物中的复合物或纳米颗粒的浓度是约1nM至约100mM,包括例如约10nM至约50mM、约25nM至约25mM、约50nM至约10mM、约100nM至约1mM、约500nM至约750μM、约750nM至约500μM、约1μM至约250μM、约10μM至约200μM以及约50μM至约150μM。在一些实施方案中,药物组合物被冻干。

[0245] 如本文所用的术语“药学上可接受的稀释剂、赋形剂和/或载体”意图包括与施用于人或其它脊椎动物宿主相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。通常,药学上可接受的稀释剂、赋形剂和/或载体是由联邦、州政府或其它监管机构批准的或列于美国药典或其它用于动物(包括人和非人哺乳动物)的公认药典的稀释剂、赋形剂和/或载体。术语稀释剂、赋形剂和/或“载体”是指与药物组合物一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。此类药物稀释剂、赋形剂和/或载体可以是无菌液体,诸如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些。水、盐水溶液和水性右旋糖和甘油溶液可用作液体稀释剂、赋形剂和/或载体,尤其用于可注射溶液。合适的药物稀释剂和/或赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂乳粉、甘油、丙烯、二醇、水、乙醇等。如果需要,所述组合物还可含有少量湿润剂、填充剂、乳化剂或pH缓冲剂。这些组合物可呈溶液、悬浮液、乳液、持续释放制剂等形式。合适的药物稀释剂、赋形剂和/或载体的实例描述于E.W.Martin的“Remington's Pharmaceutical Sciences”中。制剂应符合施用方式的要求。合适的稀释剂、赋形剂和/或载体对本领域技术人员来说将是显而易见的,并且在很大程度上将取决于施用途径。

[0246] 在一些实施方案中,包含如本文所述的嵌合肽、阻断肽、siRNA、复合物或纳米颗粒的组合物还包含药学上可接受的稀释剂、赋形剂和/或载体。在一些实施方案中,药学上可接受的稀释剂、赋形剂和/或载体影响组合物中的复合物或纳米颗粒的聚集水平和/或由组合物中的复合物或纳米颗粒介导的细胞内递送的效率。在一些实施方案中,对由药学上可接受的稀释剂、赋形剂和/或载体介导的聚集和/或递送效率的影响的程度和/或方向取决于组合物中的药学上可接受的稀释剂、赋形剂和/或载体的相对量。

[0247] 例如,在一些实施方案中,组合物中一种或多种浓度的药学上可接受的稀释剂、赋形剂和/或载体(如盐、糖、化学缓冲剂、缓冲溶液、细胞培养基或载体蛋白)的存在不促进和/或有助于复合物或纳米颗粒的聚集,或促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约200%(如不超过约190%、180%、170%、160%、150%、140%、130%、120%、110%、100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%中的任一个,包括任何这些值之间的任何范围)的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的药学上可接受的稀释剂、赋形剂和/或载体,所述浓度不促进和/或有助于复合物或纳米颗粒的聚集,或促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约200%(如不超过约190%、180%、170%、160%、150%、140%、130%、120%、110%、100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%中的任一个,包括

任何这些值之间的任何范围)的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的药学上可接受的稀释剂、赋形剂和/或载体,所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约150%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的药学上可接受的稀释剂、赋形剂和/或载体,所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约100%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的药学上可接受的稀释剂、赋形剂和/或载体,所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约50%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的药学上可接受的稀释剂、赋形剂和/或载体,所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约20%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的药学上可接受的稀释剂、赋形剂和/或载体,所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约15%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的药学上可接受的稀释剂、赋形剂和/或载体,所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约10%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,药学上可接受的稀释剂、赋形剂和/或载体是盐,包括但不限于NaCl。在一些实施方案中,药学上可接受的稀释剂、赋形剂和/或载体是糖,包括但不限于蔗糖、葡萄糖和甘露醇。在一些实施方案中,药学上可接受的稀释剂、赋形剂和/或载体是化学缓冲剂,包括但不限于HEPES。在一些实施方案中,药学上可接受的稀释剂、赋形剂和/或载体是缓冲溶液,包括但不限于PBS。在一些实施方案中,药学上可接受的稀释剂、赋形剂和/或载体是细胞培养基,包括但不限于DMEM。粒度可使用本领域已知用于测量粒度的任何方式,如通过动态光散射(DLS)来确定。例如,在一些实施方案中,如通过DLS测量的Z平均值比如通过DLS测量的复合物或纳米颗粒的Z平均值高10%的聚集体比复合物或纳米颗粒大10%。

[0248] 在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的盐(例如,NaCl),所述浓度不促进和/或有助于复合物或纳米颗粒的聚集,或促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约100%(如不超过约90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%中的任一个,包括任何这些值之间的任何范围)的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的盐(例如,NaCl),所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约75%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的盐(例如,NaCl),所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约50%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的盐(例如,NaCl),所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约20%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的盐(例如,NaCl),所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约15%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的盐(例如,NaCl),所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约10%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物中盐的浓度不超过约100mM(如不超过约90、80、70、60、50、40、30、20、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1mM中的任一个,包括任何

这些值之间的任何范围)。在一些实施方案中,盐是NaCl。

[0249] 在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的糖(例如,蔗糖、葡萄糖或甘露醇),所述浓度不促进和/或有助于复合物或纳米颗粒的聚集,或促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约25%(如不超过约24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%中的任一个,包括任何这些值之间的任何范围)的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的糖(例如,蔗糖、葡萄糖或甘露醇),所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约75%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的糖(例如,蔗糖、葡萄糖或甘露醇),所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约50%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的糖(例如,蔗糖、葡萄糖或甘露醇),所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约20%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的糖(例如,蔗糖、葡萄糖或甘露醇),所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约15%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的糖(例如,蔗糖、葡萄糖或甘露醇),所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约10%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物中糖的浓度不超过约20%(如不超过约18%、16%、14%、12%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%中的任一个,包括任何这些值之间的任何范围)。在一些实施方案中,糖是蔗糖。在一些实施方案中,糖是葡萄糖。在一些实施方案中,糖是甘露醇。

[0250] 在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的化学缓冲剂(例如,HEPES或磷酸盐),所述浓度不促进和/或有助于复合物或纳米颗粒的聚集,或促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约10%(如不超过约9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%中的任一个,包括任何这些值之间的任何范围)的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的化学缓冲剂(例如,HEPES或磷酸盐),所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约7.5%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的化学缓冲剂(例如,HEPES或磷酸盐),所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约5%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的化学缓冲剂(例如,HEPES或磷酸盐),所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约3%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的化学缓冲剂(例如,HEPES或磷酸盐),所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约1%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的化学缓冲剂(例如,HEPES或磷酸盐),所述浓度不促进和/或有助于形成复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,化学缓冲剂是HEPES。在一些实施方案中,HEPES以包含HEPES的缓冲溶液的形式添加至组合物中。在一些实施方案中,包含HEPES的溶液具有介于约5与约9之间的pH(如约5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5和9中的任一个,包括这些值之间的任何范围)。在一些实施方案中,组合物包含浓度不超过约75mM(如不超过约70、65、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10mM或更低中的任一个,包括任何这些值之间的

任何范围)的HEPES。在一些实施方案中,化学缓冲剂是磷酸盐。在一些实施方案中,磷酸盐以包含磷酸盐的缓冲溶液的形式添加至组合物中。在一些实施方案中,组合物不包含PBS。

[0251] 在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的细胞培养基(例如,DMEM或Opti-MEM),所述浓度不促进和/或有助于复合物或纳米颗粒的聚集,或促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约200%(如不超过约190%、180%、170%、160%、150%、140%、130%、120%、110%、100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%中的任一个,包括任何这些值之间的任何范围)的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的细胞培养基(例如,DMEM或Opti-MEM),所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约150%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的细胞培养基(例如,DMEM或Opti-MEM),所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约100%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的细胞培养基(例如,DMEM或Opti-MEM),所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约50%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的细胞培养基(例如,DMEM或Opti-MEM),所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约25%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的细胞培养基(例如,DMEM或Opti-MEM),所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约10%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,细胞培养基是DMEM。在一些实施方案中,组合物包含浓度不超过约70%(如不超过约65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%或更低中的任一个,包括任何这些值之间的任何范围)的DMEM。

[0252] 在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的载体蛋白(例如,白蛋白),所述浓度不促进和/或有助于复合物或纳米颗粒的聚集,或促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约200%(如不超过约190%、180%、170%、160%、150%、140%、130%、120%、110%、100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%中的任一个,包括任何这些值之间的任何范围)的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的载体蛋白(例如,白蛋白),所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约150%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的载体蛋白(例如,白蛋白),所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约100%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的载体蛋白(例如,白蛋白),所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约50%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的载体蛋白(例如,白蛋白),所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约25%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,组合物包含一定浓度的载体蛋白(例如,白蛋白),所述浓度促进和/或有助于形成尺寸与复合物或纳米颗粒的尺寸相比大不超过约10%的复合物或纳米颗粒的聚集体。在一些实施方案中,载体蛋白是白蛋白。在一些实施方案中,白蛋白是人血清白蛋白。

[0253] 在一些实施方案中,如本文所述的药物组合物被配制用于静脉内、肿瘤内、动脉内、局部、眼内、眼部、门静脉内、颅内、脑内、脑室内、鞘内、囊内、真皮内、皮下、肌内、鼻内、气管内(如气管内滴注)、肺部、腔内、经鼻或口服施用或雾化(NB)。

[0254] 在一些实施方案中,药物组合物被配制用于雾化。在一些实施方案中,药物组合物被配制用于经鼻施用。在一些实施方案中,药物组合物被配制用于气管内施用(如气管内滴注)。在一些实施方案中,药物组合物被配制用于吸入。在一些实施方案中,药物组合物被配制用于静脉内施用。

[0255] 制备方法

[0256] 本文所述的肽,如本文所述的任何嵌合肽、阻断肽和非天然存在的肽可通过本领域已知的任何方法合成。例如,可在先锋肽合成仪(Pioneer™,Applied Biosystems, Foster City, CA)上使用具有(芴基甲氧基)-羰基(Fmoc)的AEDI-expensin树脂通过固相肽合成来合成肽。参见例如,以引用的方式整体并入本文的W02014/053628、US20160115199A1或EP 2928906。

[0257] 还参见用于制备本文所述的肽的方法的实施例(如实施例1)。环状肽制备描述于,例如Rashad等人(Methods Mol Biol.2019;2001:133-145)和Alsina J.等人(Tetrahedron Letters,第35卷,第51期,1994年12月19日,第9633-9636页)中。

[0258] 在一些实施方案中,提供了一种制备如本文所述的复合物或纳米颗粒的方法。

[0259] 在一些实施方案中,提供了一种制备如上所述的包含第二肽和运载物分子的复合物的方法,所述方法包括将所述第二肽与所述运载物分子组合,从而形成所述复合物。

[0260] 在一些实施方案中,肽和运载物分子分别以约1:1至约100:1(如约介于约1:1与约50:1之间或约5:1至约20:1)的摩尔比组合。

[0261] 在一些实施方案中,方法包括将包含运载物分子的第一溶液与包含第二肽的第二溶液混合以形成第三溶液,其中所述第三溶液包含或被调整为包含i)约0%-5%蔗糖,ii)约0%-5%葡萄糖,iii)约0%-50%DMEM,iv)约0-80mM NaCl,或v)约0%-20% PBS,并且其中温育第三溶液以允许形成复合物。在一些实施方案中,第一溶液包含无菌水中的运载物,和/或其中第二溶液包含无菌水中的肽。在一些实施方案中,第三溶液被调整为在温育以形成复合物后包含i)约0%-5%蔗糖,ii)约0%-5%葡萄糖,iii)约0%-50% DMEM,iv)约0-80mM NaCl,或v)约0%-20% PBS。

[0262] 在一些实施方案中,方法还包括过滤过程,其中通过孔径大小的膜过滤复合物。在一些实施方案中,孔具有至少约0.1 $\mu$ m(如至少约0.1 $\mu$ m、0.15 $\mu$ m、0.2 $\mu$ m、0.25 $\mu$ m、0.3 $\mu$ m、0.35 $\mu$ m、0.4 $\mu$ m、0.45 $\mu$ m、0.5 $\mu$ m、0.6 $\mu$ m、0.7 $\mu$ m、0.8 $\mu$ m、0.9 $\mu$ m、1.0 $\mu$ m、1.1 $\mu$ m或1.2 $\mu$ m)的直径。在一些实施方案中,孔具有不超过约1.2 $\mu$ m、1.0 $\mu$ m、0.8 $\mu$ m、0.6 $\mu$ m、0.5 $\mu$ m、0.45 $\mu$ m、0.4 $\mu$ m、0.35 $\mu$ m、0.3 $\mu$ m或0.25 $\mu$ m的直径。在一些实施方案中,孔具有约0.1 $\mu$ m至约1.2 $\mu$ m(如约0.1至约0.8 $\mu$ m、约0.2至约0.5 $\mu$ m)的直径。

[0263] 在一些实施方案中,对于包含本申请的运载物分子递送复合物或纳米颗粒的稳定组合物,所述复合物或纳米颗粒的平均直径不会变化超过约10%,并且多分散性指数不会变化超过约10%。

[0264] 还提供了制备本文所述的任何肽的方法。

[0265] 使用方法

[0266] 本申请在一个方面提供了治疗个体的病毒感染(如SARS-CoV-2感染)或与所述病毒感染相关的疾病或疾患的方法,所述方法包括向所述个体施用组合物(例如,药物组合物),所述组合物包含嵌合肽、阻断肽、siRNA、复合物、纳米颗粒、诸如上述那些的组合物。本申请还提供了预防个体的病毒感染(如SARS-CoV-2感染)或与所述病毒感染相关的疾病或疾患的方法,所述方法包括向所述个体施用组合物(例如,药物组合物),所述组合物包含嵌合肽、阻断肽、siRNA、复合物、纳米颗粒、诸如上述那些的组合物。在一些实施方案中,病毒是SARS-CoV-2。

[0267] 在一些实施方案中,提供了治疗个体的病毒感染(如SARS-CoV-2感染)或与所述病毒感染相关的疾病或疾患的方法,所述方法包括向所述个体施用包含嵌合肽的组合物,所述嵌合肽包含通过接头连接至稳定肽的阻断肽,其中所述阻断肽包含选自由SEQ ID NO:1、6、8-11、23、24、26-28、31 42、45和47-52组成的组的序列,其中所述稳定肽包含ADGN-100肽或VEPEP-6肽。在一些实施方案中,接头选自由以下组成的组:脯氨酸、聚甘氨酸接头部分、PEG部分、Aun、Ava和Ahx。在一些实施方案中,稳定肽包含SEQ ID NO:55或97的氨基酸序列。在一些实施方案中,阻断肽包含选自由SEQ ID NO:151、156和158-160组成的组的环状肽。在一些实施方案中,阻断肽包含选自由SEQ ID NO:23、24、26-28、31和47-52组成的组的序列。在一些实施方案中,阻断肽包含选自由SEQ ID NO:23、24、26-28和31组成的组的序列。在一些实施方案中,嵌合肽包含SEQ ID NO:17、20、21、27、28、33、39和40中所列的氨基酸序列。在一些实施方案中,病毒是SARS-CoV-2。在一些实施方案中,个体是人。在一些实施方案中,组合物通过静脉内、经鼻或气管内施用,或通过吸入或雾化施用。

[0268] 在一些实施方案中,提供了治疗个体的病毒感染(如SARS-CoV-2感染)或与所述病毒感染相关的疾病或疾患的方法,所述方法包括向所述个体施用包含阻断肽的组合物,所述阻断肽包含选自SEQ ID NO:12-22、24-41和151-160中任一个的非天然存在的肽。在一些实施方案中,阻断肽包含SEQ ID NO:12、17、19-22、24、26-28、31-33、35、38-40、151、156和158-160中任一个的氨基酸序列。在一些实施方案中,阻断肽包含SEQ ID NO:27、38、39、40中任一个的氨基酸序列。在一些实施方案中,病毒是SARS-CoV-2。在一些实施方案中,个体是人。在一些实施方案中,组合物通过静脉内、经鼻或气管内施用,或通过吸入或雾化施用。

[0269] 在一些实施方案中,提供了预防个体的病毒感染(如SARS-CoV-2感染)或与所述病毒感染相关的疾病或疾患的方法,所述方法包括向所述个体施用包含siRNA的组合物,所述siRNA包含SEQ ID NO:161-170中任一个的核酸序列。在一些实施方案中,siRNA包含选自由SEQ ID NO 163、166、168和170组成的组的核酸序列。在一些实施方案中,siRNA包含SEQ ID NO:166的核酸序列。在一些实施方案中,病毒是SARS-CoV-2。在一些实施方案中,个体是人。在一些实施方案中,组合物通过静脉内、经鼻或气管内施用,或通过吸入或雾化施用。

[0270] 在一些实施方案中,提供了治疗或预防个体的病毒感染(如SARS-CoV-2感染)或与所述病毒感染相关的疾病或疾患的方法,所述方法包括向所述个体施用包含复合物的组合物,所述复合物包含a)包含第一肽的运载物,所述第一肽包含SEQ ID NO:12、17、19-22、24、26-28、31-33、35、38-40、151、156和158-160(例如,SEQ ID NO:17、20、21、27、28、33、39和40)中所列的氨基酸序列;和b)第二肽,其中所述第二肽选自由以下组成的组:CADY、MPG、PEP-1肽、PEP-2肽、PEP-3肽(例如,SEQ ID NO:183)、LNCOV肽、VEPEP-3肽、VEPEP-4肽、VEPEP-5肽、VEPEP-6肽、VEPEP-9肽和ADGN-100肽。在一些实施方案中,第二肽与第一肽的摩

尔比介于约1:1至约80:1之间(例如,约2:1至约10:1、约5:1)。在一些实施方案中,第二肽与第一肽复合。在一些实施方案中,病毒是SARS-CoV-2。在一些实施方案中,个体是人。在一些实施方案中,组合物通过静脉内、经鼻或气管内施用,或通过吸入或雾化施用。

[0271] 在一些实施方案中,提供了治疗或预防个体的病毒感染(如SARS-CoV-2感染)或与所述病毒感染相关的疾病或疾患的方法,所述方法包括向所述个体施用包含复合物的组合物,所述复合物包含a)包含阻断肽的运载物,所述阻断肽包含SEQ ID NO:27、38、39、40中任一个的氨基酸序列;和b)第二肽,其中所述第二肽选自由以下组成的组:CADY、MPG、PEP-1肽、PEP-2肽、PEP-3肽(例如,SEQ ID NO:183)、LNCOV肽、VEPEP-3肽、VEPEP-4肽、VEPEP-5肽、VEPEP-6肽、VEPEP-9肽和ADGN-100肽。在一些实施方案中,第二肽与阻断肽的摩尔比介于约1:1至约80:1之间(例如,约2:1至约10:1、约5:1)。在一些实施方案中,第二肽与阻断肽复合。在一些实施方案中,病毒是SARS-CoV-2。在一些实施方案中,个体是人。在一些实施方案中,组合物通过静脉内、经鼻或气管内施用,或通过吸入或雾化施用。

[0272] 在一些实施方案中,提供了治疗或预防个体的病毒感染(如SARS-CoV-2感染)或与所述病毒感染相关的疾病或疾患的方法,所述方法包括向所述个体施用包含复合物的组合物,所述复合物包含a)包含siRNA的运载物,所述siRNA包含选自由SEQ ID NO 163、166、168和170(例如,SEQ ID NO:166)组成的组的核酸序列;和b)选自由ADGN-100肽(例如,SEQ ID NO:55)、VEPEP-6肽(例如,SEQ ID NO:97)或VEPEP-9肽(例如,SEQ ID NO:120或121)组成的组的第二肽,其中所述siRNA与所述第二肽复合。在一些实施方案中,第二肽与siRNA的摩尔比介于约1:1至约80:1之间(例如,约5:1至约50:1、约20:1)。在一些实施方案中,病毒是SARS-CoV-2。在一些实施方案中,个体是人。在一些实施方案中,组合物通过静脉内、经鼻或气管内施用,或通过吸入或雾化施用。

[0273] 在一些实施方案中,提供了治疗或预防个体的病毒感染(如SARS-CoV-2感染)或与所述病毒感染相关的疾病或疾患的方法,所述方法包括向所述个体施用包含复合物的组合物,所述复合物包含i)嵌合肽,所述嵌合肽包含SEQ ID NO:17、20、21、27、28、33、39和40中所列的氨基酸序列;ii)siRNA,所述siRNA包含选自由SEQ ID NO 163、166、168和170(例如,SEQ ID NO:166)组成的组的核酸序列;和b)第二肽,其中所述第二肽选自由以下组成的组:CADY、MPG、PEP-1肽、PEP-2肽、PEP-3肽(例如,SEQ ID NO:183)、LNCOV肽、VEPEP-3肽、VEPEP-4肽、VEPEP-5肽、VEPEP-6肽、VEPEP-9肽和ADGN-100肽。在一些实施方案中,病毒是SARS-CoV-2。在一些实施方案中,个体是人。在一些实施方案中,组合物通过静脉内、经鼻或气管内施用,或通过吸入或雾化施用。

[0274] 在一些实施方案中,提供了治疗或预防个体的病毒感染(如SARS-CoV-2感染)或与所述病毒感染相关的疾病或疾患的方法,所述方法包括向所述个体施用包含复合物的组合物,所述复合物包含i)阻断肽,所述阻断肽包含SEQ ID NO:12、17、19-22、24、26-28、31-33、35、38-40、151、156和158-160中任一个的氨基酸序列;ii)siRNA,所述siRNA包含选自由SEQ ID NO 163、166、168和170(例如,SEQ ID NO:166)组成的组的核酸序列;和b)第二肽,其中所述第二肽选自由以下组成的组:CADY、MPG、PEP-1肽、PEP-2肽、PEP-3肽(例如,SEQ ID NO:183)、LNCOV肽、VEPEP-3肽、VEPEP-4肽、VEPEP-5肽、VEPEP-6肽、VEPEP-9肽和ADGN-100肽。在一些实施方案中,病毒是SARS-CoV-2。在一些实施方案中,个体是人。在一些实施方案中,组合物通过静脉内、经鼻或气管内施用,或通过吸入或雾化施用。

[0275] 在一些实施方案中,提供了治疗或预防个体的病毒感染(如SARS-CoV-2感染)或与所述病毒感染相关的疾病或疾患的方法,所述方法包括向所述个体施用组合物,所述组合物包含a)第一复合物,所述第一复合物包含与第二肽(如本文描述的第二肽中的任一种)复合的嵌合肽或阻断肽(如本文描述的任何嵌合肽或阻断肽);和b)第二复合物,所述第二复合物包含与第三肽(如“第二肽”部分中描述的任何肽)复合的siRNA(如本文描述的任何siRNA),其中所述嵌合肽或阻断肽抑制ACE2与SPIKE之间的相互作用,并且其中所述siRNA靶向SPIKE的核衣壳。在一些实施方案中,嵌合肽或阻断肽包含SEQ ID NO:17、20、21、27、28、33、39和40中所列的氨基酸序列。在一些实施方案中,siRNA包含选自由SEQ ID NO 163、166、168和170(例如,SEQ ID NO:166)组成的组的核酸序列。在一些实施方案中,病毒是SARS-CoV-2。在一些实施方案中,个体是人。在一些实施方案中,组合物通过静脉内、经鼻或气管内施用,或通过吸入或雾化施用。

[0276] 在本文所述的方法的一些实施方案中,个体是哺乳动物。在一些实施方案中,个体是人。在一些实施方案中,个体是男性。在一些实施方案中,个体是女性。在一些实施方案中,个体具有受损的免疫系统。

[0277] 在一些实施方案中,个体暴露于病毒(例如,SARS-CoV-2)。在一些实施方案中,个体已经表现出病毒感染(例如,SARS-CoV-2感染)的第一症状(例如发热,例如干咳,例如呼吸急促)。在一些实施方案中,个体具有胸痛或胸闷、呼吸急促和/或嘴唇或脸发青。在一些实施方案中,个体患有急性呼吸窘迫综合征(ARD)。在一些实施方案中,个体被收入院。在一些实施方案中,个体进入重症监护室(ICU)。

[0278] 在一些实施方案中,组合物在暴露于病毒(例如,SARS-CoV-2)后约1、3、5或7天内施用。在一些实施方案中,组合物在暴露于病毒之前施用。在一些实施方案中,组合物在潜在暴露于病毒之前约1、2、3、4、5、6或7天施用。在一些实施方案中,组合物在潜在暴露于病毒之前约1、2或3周施用。

[0279] 在一些实施方案中,组合物在病毒感染(例如,SARS-CoV-2感染)的第一症状(例如发热,例如干咳,例如呼吸急促)出现后约1、3、5或7天内施用。

[0280] 在一些实施方案中,组合物在个体具有胸痛或胸闷、呼吸急促和/或嘴唇或脸发青时约1、2、3、4、5、6、7天内施用。

[0281] 在一些实施方案中,组合物在个体患有急性呼吸窘迫综合征(ARD)时约3、6、12或24天内施用。在一些实施方案中,组合物在个体患有急性呼吸窘迫综合征(ARD)时约1、2、3、4或5天内施用。

[0282] 在一些实施方案中,组合物每天三次、每天两次、每天一次、每两天、三天、四天、五天或六天一次、每周一次、每两周一次或每月一次施用。

[0283] 病毒

[0284] 在一些实施方案中,病毒感染是由病毒引起,所述病毒是以下的成员:冠状病毒科(例如, $\alpha$ 冠状病毒、 $\beta$ 冠状病毒、 $\delta$ 冠状病毒或 $\gamma$ 冠状病毒)、正粘病毒科(例如,流感病毒)、黄病毒科(例如,黄病毒或肝炎病毒)或杯状病毒科(例如,诺如病毒)。

[0285] 在一些方案中,病毒感染是由属于黄病毒科的成员的病毒引起。在一些实施方案中,病毒是 $\alpha$ 冠状病毒(例如,HCoV-229E或HCoV-NL63)、 $\beta$ 冠状病毒(例如HCoV-OC43、HCoV-HKU1、MERS-CoV、SARS-CoV或SARS-CoV-2)、 $\delta$ 冠状病毒或 $\gamma$ 冠状病毒。

[0286] 在一些实施方案中,病毒是 $\alpha$ 冠状病毒。在一些实施方案中,病毒是HCoV-229E或HCoV-NL63。在一些实施方案中,病毒是HCoV-229E。在一些实施方案中,病毒是HCoV-NL63。

[0287] 在一些实施方案中,病毒是 $\beta$ 冠状病毒。在一些实施方案中,病毒是HCoV-OC43、HCoV-HKU1、MERS-CoV、SARS-CoV或SARS-CoV-2。在一些实施方案中,病毒是MERS-CoV、SARS-CoV或SARS-CoV-2。在一些实施方案中,病毒是HCoV-OC43。在一些实施方案中,病毒是HCoV-HKU1。在一些实施方案中,病毒是HMERS-CoV。在一些实施方案中,病毒是SARS-CoV。

[0288] 在一些实施方案中,病毒是SARS-CoV-2。

[0289] 组合疗法

[0290] 在一些实施方案中,方法还包括施用治疗有效量的第二剂或疗法。本文所述的第二剂或疗法可以是可用于治疗病毒感染的任何药物或疗法。在一些实施方案中,第二剂包括吗替麦考酚酯(MMF)和/或皮质类固醇。在一些实施方案中,方法还包括施用治疗有效量的吗替麦考酚酯(MMF)。在一些实施方案中,方法包括施用治疗有效量的皮质类固醇。

[0291] 在一些实施方案中,方法还包括施用治疗有效量的另外的抗病毒剂。在一些实施方案中,另外的抗病毒剂是瑞德西韦、洛匹那韦/利托那韦、IFN- $\alpha$ 、洛匹那韦、利托那韦、喷昔洛韦、加利司韦、双硫仑、地瑞那韦、考比司他、ASC09F、双硫仑、蔡莫司他、格瑞弗森、阿拉泊韦、氯喹、羟氯喹、硝唑尼特、巴洛沙韦玛波西酯、奥司他韦、扎那米韦、帕拉米韦、金刚烷胺、金刚乙胺、法匹拉韦、拉尼米韦、利巴韦林、乌米诺韦或它们的任何组合。在一些实施方案中,抗病毒剂是氯喹。在一些实施方案中,抗病毒剂是羟氯喹。在一些实施方案中,抗病毒剂是瑞德西韦。

[0292] 在一些实施方案中,组合物和第二剂同时施用。在一些实施方案中,组合物和第二剂同时施用。在一些实施方案中,组合物和第二剂依序施用。

[0293] 给药和施用方法

[0294] 组合物和/或第二剂/疗法的给药频率可根据施用医师的判断在治疗过程中进行调整。当单独施用时,组合物和/或第二剂/疗法可以不同的给药频率或间隔施用。在一些实施方案中,可使用组合物和/或第二剂/疗法的持续连续释放制剂。用于实现持续释放的各种制剂和装置是本领域已知的。也可使用本文所述的施用配置的组合。

[0295] 在一些实施方案中,对于每次施用,用于治疗人或哺乳动物受试者的本文所述的嵌合肽、阻断肽或siRNA的剂量在约0.001mg/kg至约100mg/kg的范围内。在一些实施方案中,在施用后本文所述的嵌合肽或阻断肽在感染部位的浓度是约0.01 $\mu$ M至10 $\mu$ M(如约0.1 $\mu$ M至约1 $\mu$ M,如约0.5 $\mu$ M)。在一些实施方案中,在施用后本文所述的siRNA在感染部位的浓度是约0.1nM至约10 $\mu$ M(如约1nM至1 $\mu$ M,如约1nM至约200nM)。

[0296] 在一些实施方案中,组合物在暴露于病毒(例如,SARS-CoV-2)后约1、2、3、4、5、6、7、10、12、14、16、18、20、25或30天内施用。

[0297] 在一些实施方案中,组合物在病毒感染(例如,SARS-CoV-2感染)的第一症状(例如发热,例如干咳,例如呼吸急促)出现后约1、2、3、4、5、6、7、10、12、14、16、18或20天内施用。在一些实施方案中,组合物在症状(例如发热,例如干咳,例如呼吸急促)持续至少2、3、4、5、6或7天时施用。

[0298] 在一些实施方案中,组合物在个体具有胸痛或胸闷、呼吸急促和/或嘴唇或脸发青时约1、2、3、4、5、6、7天内施用。

[0299] 在一些实施方案中,组合物在个体患有急性呼吸窘迫综合征(ARD)时约3、6、12或24天内施用。在一些实施方案中,组合物在个体患有急性呼吸窘迫综合征(ARD)时约1、2、3、4或5天内施用。

[0300] 在一些实施方案中,组合物每天三次、每天两次、每天一次、每两天、三天、四天、五天或六天一次、每周一次、每两周一次或每月一次施用。

[0301] 组合物和/或第二剂/疗法可使用相同的施用途径或不同的施用途径来施用。在本文所述的方法的一些实施方案中,本文所述的组合物或第二剂/疗法通过静脉内、肿瘤内、动脉内、局部、眼内、眼部、门静脉内、颅内、脑内、脑室内、鞘内、囊内、真皮内、皮下、肌肉内、鼻内、气管内、肺部、腔内、经鼻或口服施用或雾化(NB)或气管内滴注中的任一种施用于个体。

[0302] 在一些实施方案中,如本文所述的组合物和/或第二剂/疗法被配制用于全身或局部施用。在一些实施方案中,如本文所述的组合物和/或第二剂/疗法被配制用于静脉内、肿瘤内、动脉内、局部、眼内、眼部、门静脉内、颅内、脑内、脑室内、鞘内、囊内、真皮内、皮下、肌肉内、鼻内、气管内、肺部、腔内或口服施用,或雾化(NB)、吸入或气管内滴注。

[0303] 在一些实施方案中,组合物和/或第二剂/疗法被配制用于雾化或通过雾化施用于个体。在一些实施方案中,组合物和/或第二剂/疗法被配制用于经鼻施用或通过经鼻施用而施用于个体。在一些实施方案中,组合物和/或第二剂/疗法被配制用于气管内施用(如气管内滴注)或通过气管内施用而施用于个体。在一些实施方案中,组合物和/或第二剂/疗法被配制用于吸入或通过吸入施用于个体。在一些实施方案中,组合物和/或第二剂/疗法被配制用于静脉内施用或通过静脉内施用而施用于个体。

[0304] 患者群体

[0305] 在一些实施方案中,个体具有受损的免疫系统。

[0306] 在一些实施方案中,个体是男性。在一些实施方案中,个体是女性。

[0307] 在一些实施方案中,个体具有至少约40、45、50、55、60、65、70、75、80、85或90岁的年龄。在一些实施方案中,个体的年龄不超过18、15、12、10、8、6、4、2或1岁。在一些实施方案中,个体具有约20至约40岁的年龄。

[0308] 在一些实施方案中,个体暴露于病毒(例如,SARS-CoV-2)。

[0309] 在一些实施方案中,个体已经表现出病毒感染(例如,SARS-CoV-2感染)的第一症状(例如发热,例如干咳,例如呼吸急促)。

[0310] 在一些实施方案中,个体已经表现出胸痛或胸闷、呼吸急促和/或嘴唇或脸发青。在一些实施方案中,个体患有急性呼吸窘迫综合征(ARD)。在一些实施方案中,个体被收入院。在一些实施方案中,个体进入重症监护室(ICU)。

[0311] 在一些实施方案中,个体的ACE2表达(例如肺细胞上的ACE2表达)高于参考ACE2表达(例如,高至少10%、20%、30%、40%、50%、75%、100%、150%或200%)。在一些实施方案中,参考ACE2表达是与个体具有相同性别和/或种族的一组个体的平均ACE2表达。

[0312] 在一些实施方案中,本文所公开的个体患有自身免疫性疾病。在一些实施方案中,个体患有与移植排斥相关的疾病或疾患。

[0313] 在一些实施方案中,个体已经用吗替麦考酚酯(MMF)进行了治疗或吗替麦考酚酯治疗失败。在一些实施方案中,个体已经用皮质类固醇进行了治疗或皮质类固醇治疗失败。在一些实施方案中,个体已经用以下中的任何一种或多种进行了治疗或以下中的任何一种

或多种治疗失败：瑞德西韦、洛匹那韦/利托那韦、IFN- $\alpha$ 、洛匹那韦、利托那韦、喷昔洛韦、加利司韦、双硫仑、地瑞那韦、考比司他、ASC09F、双硫仑、茚莫司他、格瑞弗森、阿拉泊韦、氯喹、羟氯喹、硝唑尼特、巴洛沙韦玛波西酯、奥司他韦、扎那米韦、帕拉米韦、金刚烷胺、金刚乙胺、法匹拉韦、拉尼米韦、利巴韦林、乌米诺韦或它们的任何组合。在一些实施方案中，个体已经用氯喹进行了治疗或氯喹治疗失败。在一些实施方案中，个体已经用羟氯喹进行了治疗或羟氯喹治疗失败。在一些实施方案中，个体已经用瑞德西韦进行了治疗或瑞德西韦治疗失败。

#### [0314] 药盒

[0315] 本文还提供了可用于本文所述的方法的药盒、试剂和制品。在一些实施方案中，药盒含有容纳本文所述的任何肽和siRNA的小瓶，如嵌合肽、阻断肽、siRNA、第二肽（如细胞穿透肽）中的任一种，任选地与其它分子组合在一个小瓶中或分别在不同的小瓶中。在一些实施方案中，第二肽（如任何细胞穿透肽）相应地与适当的一种或多种嵌合肽/阻断肽和/或siRNA组合以产生复合物或纳米颗粒，所述复合物或纳米颗粒可施用于患者用于有效治疗。因此，在一些实施方案中，提供了药盒，所述药盒包括：1) 本文所述的嵌合肽或阻断肽，2) 第二肽。在一些实施方案中，提供了药盒，所述药盒包括：1) 本文所述的siRNA，2) 第二肽。在一些实施方案中，提供了药盒，所述药盒包括：1) 本文所述的siRNA，2) 本文所述的嵌合肽或阻断肽，任选地3) 本文所述的第二肽。在一些实施方案中，药盒还包括药学上可接受的载体。

[0316] 本文所述的药盒还可包括使用药盒的组分来实施主题方法的说明书（例如用于制备本文所述的药物组合物和/或使用药物组合物的说明书）。用于实施主题方法的说明书通常被记录在合适的记录介质上。例如，说明书可印刷于诸如纸或塑料等的基材上。因此，说明书可以包装插页形式存在于药盒中，存在于药盒或其部件（即与包装或小包装相关的部件）的容器的标签中。在一些实施方案中，说明书作为存在于合适的计算机可读存储介质（例如CD-ROM、磁盘等）上的电子存储数据文档存在。在其它实施方案中，实际说明书不存在于药盒中，但提供用于自远程来源，例如通过因特网获得说明书的手段。这一实施方案的实例是包括可察看说明书所处的和/或自其可下载说明书的网址的药盒。如同说明书一样，用于获得说明书的这种手段被记录在合适的基材上。

[0317] 药盒的各种组分可存在于单独容器中，其中容器可容纳在单个外壳，例如盒子中。

#### [0318] 示例性实施方案

[0319] 实施方案1. 一种嵌合肽，其包含与稳定肽连接的阻断肽，其中所述阻断肽特异性地阻断SPIKE与ACE2之间的相互作用，并且其中所述稳定肽使所述阻断肽的二级或三级结构稳定。

[0320] 实施方案2. 如权利要求1所述的嵌合肽，其中所述阻断肽包含在SPIKE的受体结合结构域(RBD)内的环序列。

[0321] 实施方案3. 如权利要求2所述的嵌合肽，其中所述环序列具有不超过约20个氨基酸的长度。

[0322] 实施方案4. 如权利要求3所述的嵌合肽，其中所述环序列具有约7个氨基酸至约18个氨基酸的长度。

[0323] 实施方案5. 如权利要求1-4中任一项所述的嵌合肽，其中所述阻断肽包含在C端的K。

[0324] 实施方案6.如权利要求1-5中任一项所述的嵌合肽,其中所述环序列选自由SEQ ID NO:1-11和42-46组成的组。

[0325] 实施方案7.如权利要求6所述的嵌合肽,其中所述环序列选自由SEQ ID NO:1、6、8-11、42和45组成的组。

[0326] 实施方案8.如权利要求1所述的嵌合肽,其中所述阻断肽包含源自ACE2的胞外域内的序列的序列。

[0327] 实施方案9.如权利要求8所述的嵌合肽,其中所述阻断肽包含选自由SEQ ID NO:23-31和47-52组成的组的序列。

[0328] 实施方案10.如权利要求9所述的嵌合肽,其中所述阻断肽包含选自由SEQ ID NO:23、24、26-28、31和47-52组成的组的序列。

[0329] 实施方案11.如权利要求2-10所述的嵌合肽,其中所述环序列是环状的。

[0330] 实施方案12.如权利要求1-11中任一项所述的嵌合肽,其中所述稳定肽连接至所述阻断肽的C端。

[0331] 实施方案13.如权利要求1-11中任一项所述的嵌合肽,其中所述稳定肽连接至所述阻断肽的N端。

[0332] 实施方案14.如权利要求12或权利要求13所述的嵌合肽,其中所述稳定肽具有约12个氨基酸至约30个氨基酸的长度。

[0333] 实施方案15.如权利要求8-14中任一项所述的嵌合肽,其中所述阻断肽和所述稳定肽各自包含源自ACE2的序列。

[0334] 实施方案16.如权利要求15所述的嵌合肽,其中所述稳定肽包含SEQ ID NO:49或50中所列的序列。

[0335] 实施方案17.如权利要求1-14中任一项所述的嵌合肽,其中所述稳定肽包含两亲性螺旋结构。

[0336] 实施方案18.如权利要求17所述的嵌合肽,其中所述稳定肽包含ADGN-100肽或VEPEP-6肽。

[0337] 实施方案19.如权利要求18所述的嵌合肽,其中所述稳定肽包含SEQ ID NO:53-107中任一个中所列的序列。

[0338] 实施方案20.如权利要求19所述的嵌合肽,其中所述稳定肽包含SEQ ID NO:55或97中所列的序列。

[0339] 实施方案21.如权利要求1-20中任一项所述的嵌合肽,其中所述阻断肽和所述稳定肽通过接头连接。

[0340] 实施方案22.如权利要求21所述的嵌合肽,其中所述接头选自由以下组成的组:脯氨酸、聚甘氨酸接头部分、PEG部分、Aun、Ava和Ahx。

[0341] 实施方案23.如权利要求19所述的嵌合肽,其中所述PEG部分由约两个至约七个乙二醇单元组成。

[0342] 实施方案24.如权利要求1-23中任一项所述的嵌合肽,其中所述嵌合肽包含SEQ ID NO:12-22、27、28和31-41中任一个的氨基酸序列。

[0343] 实施方案25.如权利要求24所述的嵌合肽,其中所述嵌合肽包含选自由SEQ ID NO:12、17、19-22、27、28、31-33、35和38-40组成的组的氨基酸序列。

[0344] 实施方案26.一种非天然存在的肽,其包含SEQ ID NO:12-22、24-41和151-160中任一个的氨基酸序列。

[0345] 实施方案27.如权利要求26所述的非天然存在的肽,其中所述肽包含SEQ ID NO:12、17、19-22、24、26-28、31-33、35、38-40、151、156和158-160中任一个的氨基酸序列。

[0346] 实施方案28.如实施方案26或27所述的非天然存在的肽,其中所述肽具有不超过约100个氨基酸的长度。

[0347] 实施方案29.一种siRNA,其包含选自由SEQ ID NO:161-180组成的组的核酸序列。

[0348] 实施方案30.如实施方案29所述的siRNA,其中所述siRNA包含SEQ ID NO:163、170、166或168中所列的核酸序列。

[0349] 实施方案31.一种复合物,其包含a)包含如实施方案1-25中任一项所述的嵌合肽、如实施方案26或27所述的肽,或实施方案28或实施方案29所述的siRNA的运载物,和b)第二肽,其中所述肽或siRNA与所述第二肽复合。

[0350] 实施方案32.如实施方案31所述的复合物,其中所述第二肽是选自由以下组成的组的细胞穿透肽:CADY、PEP-1肽、PEP-2肽、PEP-3肽、LNCOV肽、VEPEP-3肽、VEPEP-6肽、VEPEP-9肽和ADGN-100肽。

[0351] 实施方案33.如实施方案31或实施方案32所述的复合物,其中所述第二肽与所述肽或siRNA的摩尔比介于约1:1与约80:1之间。

[0352] 实施方案34.如实施方案33所述的复合物,其中所述第二肽与所述肽的摩尔比介于约2:1至约10:1之间。

[0353] 实施方案35.如实施方案34所述的复合物,其中所述第二肽与所述siRNA的摩尔比介于约5:1至约50:1之间。

[0354] 实施方案36.如实施方案31-35中任一项所述的复合物,其中所述复合物包含a)如实施方案1-25中任一项所述的嵌合肽或如实施方案26-28中任一项所述的肽,和/或b)实施方案29或实施方案30所述的siRNA。

[0355] 实施方案37.如实施方案36所述的复合物,其中所述siRNA包含SEQ ID NO:166中所列的核酸序列。

[0356] 实施方案38.如实施方案37所述的复合物,其中所述复合物包含嵌合肽,所述嵌合肽包含SEQ ID NO:17或33中所列的氨基酸序列。

[0357] 实施方案39.一种纳米颗粒,其包含如实施方案30-38中任一项所述的复合物。

[0358] 实施方案40.如实施方案39所述的纳米颗粒,其中所述纳米颗粒具有不超过约100nm的直径。

[0359] 实施方案41.如实施方案40所述的纳米颗粒,其中所述纳米颗粒具有约40至约60nm的直径。

[0360] 实施方案42.一种药物组合物,其包含a)如实施方案1-25中任一项所述的嵌合肽、如实施方案26-28中任一项所述的肽、如实施方案29或实施方案30所述的siRNA、如实施方案31-41中任一项所述的复合物或纳米颗粒,和b)药学上可接受的载体。

[0361] 实施方案43.如实施方案42所述的药物组合物,其中所述组合物包含两种或更多种复合物或纳米颗粒,其中所述两种或更多种复合物或纳米颗粒包含不同的运载物。

[0362] 实施方案44.一种制备如实施方案31-41中任一项所述的复合物或纳米颗粒的方

法,所述方法包括将所述运载物与所述第二肽组合。

[0363] 实施方案45.一种治疗个体的SARS-CoV-2感染的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的如实施方案42或实施方案43所述的药物组合物。

[0364] 实施方案46.如实施方案45所述的方法,其中所述药物组合物通过雾化或局部肺或鼻递送来施用。

[0365] 实施方案47.如实施方案45或实施方案46所述的方法,其中所述个体是人。

[0366] 实施例

[0367] 以下实施例仅意图例示本申请,并且因此不应视为以任何方式限制本发明。通过说明而不是通过限制的方式提供以下实施例和详述。

[0368] 实施例1.靶向ACE2/SARS CoV RBD相互作用的肽和基于肽的纳米颗粒的设计

[0369] 靶向ACE2或刺突蛋白结合结构域的肽抑制剂是基于ACE2:刺突蛋白复合物的释放晶体(PDB代码:6M17)和电子显微镜(PDB代码:6LZG)结构而设计的。设计抑制剂以便获得稳定的结构实体,所述结构实体可通过环化、钉合化学、逆向-反转或使用D氨基酸进一步稳定。

[0370] A.源自刺突蛋白的抑制剂的选择。

[0371] SARS-CoV-2 RBD结构含有核心结构域,所述核心结构具有五链反平行 $\beta$ 折叠( $\beta$ 1、 $\beta$ 2、 $\beta$ 3、 $\beta$ 4和 $\beta$ 7)短连接螺旋和环。与ACE2受体结合的SARS-CoV-2 RBD的大部分接触残基位于核心结构域的 $\beta$ 4与 $\beta$ 7链之间(图1A)。受体结合基序(RBM)结构域含有短的 $\beta$ 5和 $\beta$ 6链、 $\alpha$ 4和 $\alpha$ 5螺旋和环。主要接触涉及 $\alpha$ 4与 $\beta$ 5之间的环、 $\beta$ 6与 $\alpha$ 5之间的环以及 $\beta$ 5与 $\beta$ 6之间的环的部分。连接RBM结构域远端的环的半胱氨酸对Cys480-Cys488在界面的稳定中也起着重要作用(图1B)。已从SARS-CoV2 RBD结构内的RBM结构域衍生出十一个具有以下序列的抑制序列。参见以下表2。

[0372] 表2.

[0373]

| 序列                 | RBM结构基序                                       | 序列代码            |
|--------------------|-----------------------------------------------|-----------------|
| SKVGGNYNYLYR       | 环 $\alpha$ 4- $\beta$ 5                       | Seq1 (LNCOV-01) |
| KVGGNYNYL          | 环 $\alpha$ 4- $\beta$ 5                       | Seq2 (LNCOV-0)  |
| GNYNYLYRL          | 环 $\alpha$ 4- $\beta$ 5                       | seq3 (LNCOV-1)  |
| GGNYNYLYRLFRK      | 环 $\alpha$ 4- $\beta$ 5/ $\beta$ 5            | Seq4 (LNCOV-2)  |
| STEYQAGST          | 环 $\beta$ 5- $\beta$ 6                        | Seq5 (LNCOV-3)  |
| CNGVEGFNC          | 环 $\beta$ 5- $\beta$ 6                        | Seq6 (LNCOV-4)  |
| VEGFNCYFP          | 环 $\beta$ 5- $\beta$ 6                        | Seq7 (LNCOV-5)  |
| YFPLQSYGFQPTNGVGYQ | $\beta$ 6/环 $\beta$ 6- $\alpha$ 5/ $\alpha$ 5 | Seq8 (LNCOV-6)  |
| SYGFQPTNGV         | 环 $\beta$ 6- $\alpha$ 5                       | Seq9 (LNCOV-7)  |
| GFQPTNGVK          | 环 $\beta$ 6- $\alpha$ 5                       | Seq10 (LNCOV-8) |
| TNGVGYQPY          | 环 $\beta$ 6- $\alpha$ 5/ $\alpha$ 5           | Seq11 (LNCOV-9) |

[0374] 使用点击化学将肽序列与ADGN-106或ADGN-100肽偶联,呈线性或环状形式。参见Rashad等人,Methods Mol Biol.2019;2001:133-145。在一些情况下,阻断肽的C端的一个或两个氨基酸被赖氨酸替代,以通过赖氨酸侧链锚定获得环状肽。参见Alsina J.等人,Tetra hedron Letters,第35卷,第51期,1994年12月19日,第9633-9636页。序列用氨基键

直接连接在ADGN肽的N端,或通过接头基序偶联。Ava (4戊炔酸)、Ahx (氨基己酸)、多聚G或PEG (PEG-2) 用作接头。参见表3。

[0375] 表3.

|        |                                                                                 |                     |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| [0376] | Ac-S <sup>*</sup> KVGGNYNYLY <sup>*</sup> R<br>Ava/Ahx-LWRALWRLWRSLWRLWLLWK-NH2 | Seq12<br>(LNCOV-10) |
|        | Ac-K <sup>*</sup> VGGNYNYK <sup>*</sup> -Ava-LWRALWRLWRSLWRLWLLWK-NH2           | Seq13<br>(LNCOV-11) |
|        | Ac-G <sup>*</sup> NYNYLYRL <sup>*</sup> -Ava-LWRALWRLWRSLWRLWLLWK-NH2           | seq14<br>(LNCOV-12) |
|        | Ac-G <sup>*</sup> NYNYLYRLFK <sup>*</sup> -Ava-LWRALWRLWRSLWRLWLLWK-NH2         | Seq15<br>(LNCOV-22) |
|        | Ac-T <sup>*</sup> EYQAGSTK <sup>*</sup> -Ava-LWRALWRLWRSLWRLWLLWK-NH2           | Sed16<br>(LNCOV-17) |
|        | Ac-N <sup>*</sup> GVEGFNK <sup>*</sup> -Ava-LWRALWRLWRSLWRLWLLWK-NH2            | Seq17<br>(LNCOV-15) |
|        | Ac-V <sup>*</sup> EGFNCYF <sup>*</sup> -Ava-LWRALWRLWRSLWRLWLLWK-NH2            | Seq18<br>(LNCOV-16) |
|        | Ac-YFPLQSYGFQPTNGVGYQ-Ava-LWRALWRLWRSLWRLWLLWK-NH2                              | Seq19<br>(LNCOV-23) |
|        | Ac-S <sup>*</sup> YGFQPTNGV <sup>*</sup> -Ava-LWRALWRLWRSLWRLWLLWK-NH2          | Seq20<br>(LNCOV-24) |
|        | Ac-G <sup>*</sup> FQPTNGVK <sup>*</sup> -Ava-LWRALWRLWRSLWRLWLLWK-NH2           | Seq21<br>(LNCOV-13) |
|        | Ac-T <sup>*</sup> NGVGYQPYK <sup>*</sup> -Ava-LWRALWRLWRSLWRLWLLWK-NH2          | Seq22<br>(LNCOV-14) |
|        | *环化位点                                                                           |                     |

[0377] B. 源自ACE2结构域的抑制剂的选择

[0378] SARS-CoV-2 RBD中延伸的RBM接触ACE2的小叶的底侧,其中RBM中的凹外表面容纳ACE2的N端螺旋。SARS-CoV-2 RBD与ACE2受体结构域之间的主要接触主要涉及 $\alpha$ 1螺旋和小延伸 $\alpha$ 2螺旋以及 $\beta$ 3与 $\beta$ 4链之间的环(图1C和1D)。

[0379] 基于ACE2结构选择了九个具有以下序列的抑制序列。LNCOV-19/33/34源自 $\alpha$ 1螺旋,LNCOV 20/27源自 $\alpha$ 1和 $\alpha$ 2螺旋,并且LNCOV-35/36/37源自 $\beta$ 3与 $\beta$ 4链之间的环,包括 $\beta$ 3和 $\beta$ 4链的部分以及随后的 $\alpha$ 螺旋。参见表4。

[0380] 表4.

| [0381] | 序列                                          | ACE2 结构基序               | 序列代码             |
|--------|---------------------------------------------|-------------------------|------------------|
|        | Ac-IEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQS                  | $\alpha 1$              | Seq23 (SBP-1)    |
|        | Ac-EQAKTFLDKFNHEAEDLF                       | $\alpha 1$              | Seq24 (LNCOV-19) |
|        | Ac-KTFLDKFNHEAEDLF                          | $\alpha 1$              | Seq25 (LNCOV-33) |
|        | Ac-KTFLDKFNHEAEDLFYS                        | $\alpha 1$              | Seq26 (LNCOV-34) |
|        | Ac-EQAKTFLDKFNHEAEDLFPKW<br>SAFLKEQSTLAQMYG | $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ | Seq27 (LNCOV-27) |
|        | Ac-KTFLDKFNHEAEDLFPGPKWS<br>AFLKEQSTLAQMYG  | $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ | Seq28 (LNCOV-20) |
|        | Ac-TAWDLGKGDFRI                             | $\beta 3$ 和 $\beta 4$   | Seq29 (LNCOV-35) |
|        | Ac-NMTQGFWENSMLTD                           | $\beta 3$ 和 $\beta 4$   | Seq30 (LNCOV-36) |
|        | Ac-NMTQGFWENPPGGPTAWDLGK                    | $\beta 3$ 和 $\beta 4$   | Seq31 (LNCOV-37) |

[0382] 使用点击化学将肽序列与ADGN肽偶联,呈线性形式。序列用氨基键直接连接在ADGN肽的N端,或通过接头基序偶联。Ava (4戊炔酸)、Ahx (氨基己酸)、多聚G或PEG (PEG-2) 用作接头。参见表5。

[0383] 表5.

|        |                                                                        |                     |
|--------|------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| [0384] | Ac-IEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQS-Ahx-LWRALW<br>RLWRSLWRLWLNK-NH <sub>2</sub> | Seq32<br>(LNCOV-21) |
|        | Ac-EQAKTFLDKFNHEAEDLF-Ahx-LWRALWRLWR<br>SLWRLWLNK-NH <sub>2</sub>      | Seq33<br>(LNCOV-18) |
|        | Ac-KTFLDKFNHEAEDLF-Ahx-LWRALWRLWRSLW                                   | Seq34               |

|        |                                                                        |                           |
|--------|------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| [0385] | RLLWK-NH2                                                              | (LNCOV-25)                |
|        | Ac-KTFLDKFNHEAEDLFYS-Ahx-LWRALWRLWRS<br>LWRLWK-NH2                     | Seq35<br>(LNCOV-26)       |
|        | AC-TAWDLGKGDFRI-Ahx-LWRALWRLWRS<br>LWRLWK-NH2                          | Seq36<br>(LNCOV-28)       |
|        | Ac-NMTQGFWENSMLTD-Ahx-LWRALWRLWRS<br>LWRLWK-NH2                        | Seq37<br>(LNCOV-29)       |
|        | Ac-NMTQGFWENPPGPTAWDLGK-Ahx-LWRALW<br>LWRSLLWRLWK-NH2                  | Seq38<br>(LNCOV-30)       |
|        | Ac-EQAKTFLDKFNHEAEDLFPKWSAFLKEQSTLAQ<br>MYG-Ahx-LWRALWRLWRSLLWRLWK-NH2 | Seq39<br>(LNCOV-31)       |
|        | Ac-KTFLDKFNHEAEDLFPKWSAFLKEQSTLAQMYG<br>-Ahx-LWRALWRLWRSLLWRLWK-NH2    | Seq40<br>(LNCOV-32)       |
|        | Ac-<br>EQAKTFLDKFNHEAEDLF-ahx-RSAGWRWRLWRVR<br>SWSR-NH2                | Seq41 或 188<br>(LNCOV-33) |

[0386] 实施例2.所选抑制序列的结构分析

[0387] 使用分子建模peplook-Zultim和PEPFOLD程序(Thomas A和Brasseur R.,2006, Prediction of peptide structure:how far are we?,Proteins.65,889-97以及 Lamiabie A,Thévenet P,Rey J,Vavrusa M,Derreumaux P,Tufféry P.Nucleic Acids Res.2016年7月8日;44 (W1):W449-54) 确定源自与或不与ADGN肽连接的ACE2的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 螺旋的抑制序列的二级结构。

[0388] 如下表6所报告,源自 $\alpha 1$ 螺旋的肽(Seq23至26)以及源自 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 螺旋的肽(Seq27/28)在溶液中采用二级螺旋构象。

[0389] 表6.

| [0390] | 肽序列                                    | 序列代码                |
|--------|----------------------------------------|---------------------|
|        | <b>Ac-I[EEQAKTFLDKFNHEAEDL]FYQS</b>    | Seq23 (SBP-1)       |
|        | <b>Ac-EQ[AKTFLDKFNHEAED]LF</b>         | Seq24<br>(LNCOV-19) |
|        | <b>Ac-KT[FLDKFNHEA]EDLF</b>            | Seq25<br>(LNCOV-33) |
|        | <b>Ac-KTF[LDKFNHEAE]DLFYS</b>          | Seq26<br>(LNCOV-34) |
|        | <b>Ac-EQA[KTFLDKFNHEAED]LFPKW[SAFL</b> | Seq27               |

|        |                                                                                       |                           |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
|        | <b>KEQ]ST[LAQM]YG</b>                                                                 | (LNCOV-27)                |
|        | <b>Ac-KT[FLDKFNHEAED]LFP GPKW[SAFLK EQ]ST[LAQM]YG</b>                                 | Seq28<br>(LNCOV-20)       |
|        | <b>Ac-I[EEQAKTFLDKFNHEAEDLFY]QS-Ahx-L[WRA]L[WRLWR]S[LWRL]WK-NH2</b>                   | Seq32<br>(LNCOV-21)       |
|        | <b>Ac-EQA[KTFLDKFNHEAEDL]F-Ahx-L[WRA]L[WRLWR]S[LWRL]WK-NH2</b>                        | Seq33<br>(LNCOV-18)       |
|        | <b>Ac-KT[FLDKFNHEAE]DLF-Ahx-L[WRA]L[WRLWR]S[LWRLW]K-NH2</b>                           | Seq34<br>(LNCOV-25)       |
| [0391] | <b>Ac-KT[FLDKFNHEAEDL]FYS-Ahx-L[WRA]L[WRLWR]S[LWRLW]K-NH2</b>                         | Seq35<br>(LNCOV-26)       |
|        | <b>Ac-EQ[AKTFLDKFN]HE[AEDL]FPK[WSAF LKEQSTLAQMY]G-Ahx-L[WRA]L[WRLWR]S[LWRLW]K-NH2</b> | Seq39<br>(LNCOV-31)       |
|        | <b>Ac-K[TFLDKFNHEAEDL]FPK[WSAFLKEQ STLAQMY]G-Ahx-L[WRA]L[WRLWR]S[LWRLW]K-NH2</b>      | Seq40<br>(LNCOV-32)       |
|        | <b>Ac-IE[EQAKTFLDKFNHEAEDLF]YQS-Ahx-[RS AGWRWRLWRVR]SWSR-NH2</b>                      | Seq41 或 188<br>(LNCOV-33) |

[0392] \*[]:螺旋基序

[0393] 使用Peplook-Zultim程序确定每个螺旋肽的结构动态和稳定性分析。计算了每个肽中的氨基酸和整个肽序列的均方根偏差(RMSD)以及范德华力(vdW)和静电的相互作用能。结果表明,当与ADGN肽偶联时,抑制结构域的螺旋结构通过与ADGN肽的芳香族残基直接相互作用而得到强烈稳定。

[0394] ADGN介导的二级结构稳定主要在Seq 32/33/34/35和Seq41中观察到。ADGN-106残基和ADGN-100残基使抑制结构域的螺旋结构稳定。ADGN肽的精氨酸残基在肽表面仍可接近,这一事实允许与其它ADGN肽的进一步相互作用。接触RBD结构域的肽的残基在肽表面仍可接近(图2A-2E)。

[0395] 实施例3.ACE2:SARS-CoV-2刺突相互作用的肽抑制剂的筛选

[0396] 使用ACE2:SARS-CoV-2刺突抑制剂筛选测定试剂盒(DBS Bioscience)在体外评估了不同肽阻断ACE2:SARS-CoV-2刺突相互作用的效力。所述筛选旨在对ACE2:SARS-CoV-2刺突相互作用的抑制剂进行筛选和谱分析。评估以96孔格式进行。将ACE2蛋白附着在镀镍的96孔板上,然后与肽抑制剂溶液在室温下缓慢振荡温育30分钟。最后,在肽抑制剂溶液存在下将SARS-CoV-2刺突-Fc添加至板上的ACE2中,并在室温下缓慢振荡温育一小时。用抗Fc-HRP处理板,然后添加HRP底物以产生化学发光,并使用化学发光读取器进行分析。由Zhang等人(The first-in-class peptide binder to the SARS-CoV-2 spike protein, G.Zhang, S.Pomplun, A.R.Loftis, A.Loas, B.L.Pentelute bioRxiv 2020.03.19.999318; doi:https://doi.org/10.1101/2020.03.19.999318 2020)描述的SBP-1肽用作阳性对照。结果对应于3次单独实验的平均值,并在图3A-3B和表7中报告。

[0397] 源自ACE2的 $\alpha 1$ 螺旋的SBP-1对照序列防止ACE2:刺突抑制,  $IC_{50}$ 为 $785 \pm 25$ nM。当SBP-1与ADGN-106 (Seq 32) 共价连接时, 效力增加2.4倍,  $IC_{50}$ 为 $325.2 \pm 17$ nM, 从而证实ADGN-106的存在使SBP-1结构域的螺旋结构稳定。当与ADGN-100 (Seq 41) 共价连接时也获得了SBP-1效力的1.8倍增加,  $IC_{50}$ 为 $432.5 \pm 21$ nM。

[0398] A. 源自刺突蛋白的肽:

[0399] 在低于 $10 \mu M$ 的浓度下, 线性序列 (Seq 1至11) 均未显示抑制。

[0400] 相比之下, 对应于与ADGN-106共价连接的环状肽的Seq12/17/19/20/21肽阻断了ACE2:SARS-CoV-2刺突相互作用。这些结果表明, 与ACE2蛋白表面相互作用需要存在环化来使肽结构稳定。

[0401] 当与ADGN-106 (Seq-19) 共价连接时, Seq 8仅抑制ACE2:SARS-CoV-2刺突相互作用,  $IC_{50}$ 为 $90.6 \pm 8$ nM, 这一事实证实与ADGN肽的共价偶联使抑制结构域的结构稳定。

[0402] 通过半胱氨酸对Cys480-Cys488稳定的源自环 $\beta 5$ - $\beta 6$ 的Seq17肽阻断相互作用,  $IC_{50}$ 为 $57.5 \pm 11$ nM, 其比游离SBP-1或与ADGN-106偶联的SBP-1强15和6倍。

[0403] 最强的抑制是使用源自 $\beta 6$ - $\alpha 5$ 之间的环的Seq20和seq21肽获得的,  $IC_{50}$ 为 $17.2 \pm 5$ nM和 $22.6 \pm 7$ nM, 其比游离SBP-1或与ADGN-106偶联的SBP-1强40倍和16倍。

[0404] B. 源自ACE2蛋白的肽:

[0405] 源自ACE2的 $\alpha 1$ 螺旋的肽Seq23至26阻断了ACE2:SARS-CoV-2刺突相互作用,  $IC_{50}$ 介于 $785 < x < 2 \mu M$ 之间。这些肽与ADGN-106、Seq32-35的共价偶联使效率提高3-6倍。与连接至ADGN-106的Seq24序列对应的Seq33显示 $IC_{50}$ 为 $178 \pm 14$ nM, 相比之下对于Seq24获得的 $IC_{50}$ 为 $1.3 \mu M$ 。这些结果证实ADGN-106的存在使抑制结构域的螺旋结构稳定。

[0406] 用源自ACE2的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 螺旋的肽获得了最强抑制; Seq27和Seq28阻断了ACE2:SARS-CoV-2刺突相互作用,  $IC_{50}$ 为约50nM, 其比游离SBP-1或与ADGN-106偶联的SBP-1强15倍和6倍。这些肽与ADGN-106、Seqs 39和40的共价偶联使效率提高1.4倍。

[0407] 在低于 $10 \mu M$ 浓度下, 源自ACE2蛋白的 $\beta 3$ 和 $\beta 4$ 环的肽Seq29/30/31没有表现出抑制。这些肽与ADGN-106、Seq36-38的共价偶联使效率提高10-100倍。与连接至ADGN-106的Seq31序列对应的Seq38显示 $IC_{50}$ 为 $214.2 \pm 21$ nM, 相比之下对于Seq31获得的 $IC_{50}$ 为 $25 \mu M$ 。对于刺突来源的抑制剂, 这些结果证明与ADGN肽的共价偶联对于使这些抑制肽的结构稳定至关重要。

[0408] 总之, 阻断ACE2:SARS-CoV-2刺突相互作用的最佳候选物对应于

[0409] ●与共价连接至ADGN-106的SPIKE的 $\beta 6$ - $\alpha 5$ 环对应的环状肽 (例如, Seq20和Seq21)

[0410] ●与共价连接至ADGN-106的SPIKE的 $\beta 5$ - $\beta 6$ 环对应的环状肽 (例如, Seq17)

[0411] ●源自与或不与ADGN-106偶联的ACE2的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 螺旋的肽 (例如, Seq27、28、39、40)。

[0412] 实施例4. SARS-CoV-2刺突:ACE2相互作用的肽抑制剂的筛选

[0413] 不同肽阻断SARS-CoV-2刺突:ACE2相互作用的效力使用SARS-CoV-2刺突:ACE2抑制剂筛选测定试剂盒 (DBS Bioscience) 在体外进行评估; 所述筛选旨在对SARS-CoV-2刺突:ACE2相互作用的抑制剂进行筛选和谱分析。评估以96孔格式进行。将SARS-CoV-2刺突蛋白附着在镀镍的96孔板上, 然后与肽抑制剂溶液在室温下缓慢振荡温育30分钟。最后, 在肽抑制剂溶液存在下将ACE2-Fc添加至板上的SARS-CoV-2刺突-Fc中, 并在室温下缓慢振荡温

育一小时。用抗Fc-HRP处理板,然后添加HRP底物以产生化学发光,并使用化学发光读取器进行分析。由Zhang等人描述的SBP-1肽用作阳性对照。结果对应于3次单独实验的平均值,并在图4A-4B和表7中报告。

[0414] SBP-1对照序列防止ACE2:刺突抑制, $IC_{50}$ 为 $267 \pm 12$  nM。当SBP-1共价连接至ADGN-106 (Seq 32) 或ADGN-100 (Seq 41) 时,效力增加2.0和1.4倍, $IC_{50}$ 为 $134.2 \pm 14$  nM和 $219.7 \pm 9$  nM。

[0415] A. 源自刺突蛋白的肽

[0416] 在低于 $10 \mu$ M的浓度下,相应的线性或未偶联至ADGN-106序列 (Seq 1至11) 均未显示抑制。在低于 $10 \mu$ M的浓度下,对应于与ADGN-106序列偶联的 $\alpha$ 4- $\beta$ 5之间的环的肽 (Seq 1至11) 均未显示抑制。

[0417] 与共价连接至ADGN-106的环状肽对应的Seq 17/19/20/21/22肽阻断了SARS-CoV-2刺突:ACE2相互作用,这表明环化的存在和与ADGN肽的共价偶联两者使抑制结构域的结构稳定作为与ACE2蛋白质表面相互作用的主要要求。

[0418] 最佳抑制剂是使用源自 $\beta$ 6- $\alpha$ 5之间的环的Seq20和seq21获得的, $IC_{50}$ 为 $44.2 \pm 7$  nM和 $38.5 \pm 11$  nM,其比游离SBP-1或与ADGN-106偶联的SBP-1强6.6倍和3.3倍。与 $\beta$ 6- $\alpha$ 5与 $\alpha$ 5螺旋之间的环对应的Seq22的有效性比Seq20/Seq21低3.6倍,这表明 $\beta$ 6- $\alpha$ 5之间的环将足以阻断SARS-CoV-2刺突:ACE2相互作用。

[0419] 源自环 $\beta$ 5- $\beta$ 6的Seq17抑制相互作用, $IC_{50}$ 为 $78.2 \pm 9$  nM,其比游离SBP-1或与ADGN-106偶联的SBP-1强3.4和1.7倍。

[0420] B. 源自ACE2蛋白的肽

[0421] 源自ACE2的 $\alpha$ 1螺旋的肽Seq23至26阻断了SARS-CoV-2刺突:ACE2相互作用, $IC_{50}$ 介于 $300 < x < 1 \mu$ M之间。这些肽与ADGN-106、Seq32-35的共价偶联使效率提高2-10倍。

[0422] 使用对应于与ADGN-106偶联的ACE2的 $\alpha$ 1螺旋的一部分的Seq33获得了最佳抑制,它阻断了SARS-CoV-2刺突:ACE2相互作用, $IC_{50}$ 为 $18.4 \pm 3$  nM,相比之下对于Seq24获得的 $IC_{50}$ 为 $570 \pm 30$  nM。这些结果证实ADGN-106的存在使抑制结构域的螺旋结构稳定。Seq33比游离SBP-1和与ADGN-106偶联的SBP-1强14倍和8倍。

[0423] 源自ACE2的 $\alpha$ 1和 $\alpha$ 2螺旋的肽Seq27和Seq28阻断了SARS-CoV-2刺突:ACE2相互作用, $IC_{50}$ 为 $37.4 \pm 8$  nM和 $38.5 \pm 7$  nM,其比游离SBP-1或与ADGN-106偶联的SBP-1强7倍和3.5倍。

[0424] 在低于 $10 \mu$ M浓度下,源自ACE2蛋白的 $\beta$ 3和 $\beta$ 4环的肽Seq29/30/31没有表现出抑制。这些肽与ADGN-106、Seq36-38的共价偶联使效率提高10-100倍。与连接至ADGN-106的Seq31序列对应的Seq38显示 $IC_{50}$ 为 $102.8 \pm 17$  nM,相比之下对于Seq31获得的 $IC_{50}$ 为 $25 \mu$ M。对于刺突来源的抑制剂,这些结果证明与ADGN肽的共价偶联对于使抑制肽的结构稳定至关重要。

[0425] 总之,阻断SARS-CoV-2刺突:ACE2相互作用的最佳候选物对应于:

[0426] ●与共价连接至ADGN-106的 $\beta$ 6- $\alpha$ 5环对应的环状肽 (例如,Seq20和Seq21)

[0427] ●源自共价连接至ADGN-106的ACE2的 $\alpha$ 1螺旋的肽 (例如,Seq33)

[0428] ●源自与或不与ADGN-106偶联的ACE2的 $\alpha$ 1- $\alpha$ 2螺旋的肽 (例如,Seq27、28、39、40)。

[0429] 表7。

[0430]

| 代码序列                | ADGN<br>* | 环状<br>** | 靶标   | SARS-CoV-2<br>刺突:ACE2 | ACE2:SARS-Co<br>V-2 刺突 |
|---------------------|-----------|----------|------|-----------------------|------------------------|
|                     |           |          |      | IC <sub>50</sub>      | IC <sub>50</sub>       |
| Seq1<br>(LNCOV-01)  | -         | -        | ACE2 | >10 μM                | >10 μM                 |
| Seq2<br>(LNCOV-0)   | -         | -        | ACE2 | >10 μM                | >10 μM                 |
| seq3<br>(LNCOV-1)   | -         | -        | ACE2 | >10 μM                | >10 μM                 |
| Seq4<br>(LNCOV-2)   | -         | -        | ACE2 | >10 μM                | >10 μM                 |
| Seq5<br>(LNCOV-3)   | -         | -        | ACE2 | >10 μM                | >10 μM                 |
| Seq6<br>(LNCOV-4)   | -         | -        | ACE2 | >10 μM                | >10 μM                 |
| Seq7<br>(LNCOV-5)   | -         | -        | ACE2 | >10 μM                | >10 μM                 |
| Seq8<br>(LNCOV-6)   | -         | -        | ACE2 | >10 μM                | >10 μM                 |
| Seq9<br>(LNCOV-7)   | -         | -        | ACE2 | >10 μM                | >10 μM                 |
| Seq10<br>(LNCOV-8)  | -         | -        | ACE2 | >10 μM                | >10 μM                 |
| Seq11<br>(LNCOV-9)  | -         | -        | ACE2 | >1 μM                 | >1 μM                  |
| Seq12<br>(LNCOV-10) | +         | +        | ACE2 | 247 nM                | >1 μM                  |
| Seq13               | +         | +        | ACE2 | >10 μM                | >10 μM                 |

[0431]

| 代码序列                | ADGN<br>* | 环状<br>** | 靶标    | SARS-CoV-2<br>刺突:ACE2  | ACE2:SARS-Co<br>V-2 刺突 |
|---------------------|-----------|----------|-------|------------------------|------------------------|
|                     |           |          |       | IC <sub>50</sub>       | IC <sub>50</sub>       |
| (LNCOV-11)          |           |          |       |                        |                        |
| seq14<br>(LNCOV-12) | +         | +        | ACE2  | >10 $\mu$ M            | >10 $\mu$ M            |
| Seq15<br>(LNCOV-22) | +         | +        | ACE2  | >1 $\mu$ M             | >10 $\mu$ M            |
| Seq16<br>(LNCOV-17) | +         | +        | ACE2  | >1 $\mu$ M             | >10 $\mu$ M            |
| Seq17<br>(LNCOV-15) | +         | +        | ACE2  | 57.5 nM                | 78.2 $\pm$ 14 nM       |
| Seq18<br>(LNCOV-16) | +         | +        | ACE2  | >10 $\mu$ M            | >10 $\mu$ M            |
| Seq19<br>(LNCOV-23) | +         | -        | ACE2  | 90.6 nM                | 348.9 $\pm$ 26 nM      |
| Seq20<br>(LNCOV-24) | +         | +        | ACE2  | 17.2 nM                | 44.2 $\pm$ 7nM         |
| Seq21<br>(LNCOV-13) | +         | +        | ACE2  | 22.6 nM                | 38.5 $\pm$ 11nM        |
| Seq22<br>(LNCOV-14) | +         | +        | ACE2  | >1 $\mu$ M             | 145 nM                 |
| Seq23 (SBP-1)       | -         | -        | SPIKE | 785 $\pm$ 25 nM        | 267 nM                 |
| Seq24<br>(LNCOV-19) | -         | -        | SPIKE | 1.3 $\mu$ M            | 570 $\pm$ 30 $\mu$ M   |
| Seq25<br>(LNCOV-33) | -         | -        | SPIKE | 2.5 $\mu$ M            | 1.9 $\mu$ M            |
| Seq26<br>(LNCOV-34) | -         | -        | SPIKE | 1.9 $\mu$ M            | 2.1 $\mu$ M            |
| Seq27<br>(LNCOV-27) | -         | -        | SPIKE | 66.1 $\pm$ 12 nM       | 37.4 nM                |
| Seq28<br>(LNCOV-20) | -         | -        | SPIKE | 58.7 $\pm$ 9 nM        | 38.6 nM                |
| Seq29<br>(LNCOV-35) | -         | -        | SPIKE | >10 $\mu$ M            | >10 $\mu$ M            |
| Seq30<br>(LNCOV-36) | -         | -        | SPIKE | >10 $\mu$ M            | >10 $\mu$ M            |
| Seq31<br>(LNCOV-37) | -         | -        | SPIKE | >10 $\mu$ M            | >10 $\mu$ M            |
| Seq32<br>(LNCOV-21) | +         | -        | SPIKE | 325.2 $\pm$ 17 $\mu$ M | 134 nM                 |
| Seq33<br>(LNCOV-18) | +         | -        | SPIKE | 178 $\pm$ 14 nM        | 18.4 nM                |
| Seq34<br>(LNCOV-25) | +         | -        | SPIKE | >1 $\mu$ M             | >1 $\mu$ M             |
| Seq35<br>(LNCOV-26) | +         | -        | SPIKE | 545.8 nM               | 728.5 nM               |
| Seq36               | +         | -        | SPIKE | >1 $\mu$ M             | >1 $\mu$ M             |

| 代码序列                | ADGN<br>* | 环状<br>** | 靶标    | SARS-CoV-2<br>刺突:ACE2 | ACE2:SARS-Co<br>V-2 刺突 |
|---------------------|-----------|----------|-------|-----------------------|------------------------|
|                     |           |          |       | IC <sub>50</sub>      | IC <sub>50</sub>       |
| (LNCOV-28)          |           |          |       |                       |                        |
| Seq37<br>(LNCOV-29) | +         | -        | SPIKE | >1 $\mu$ M            | 645 nM                 |
| Seq38<br>(LNCOV-30) | +         | -        | SPIKE | 214.2 nM              | 102.8 $\pm$ 17nM       |
| Seq39<br>(LNCOV-31) | +         | -        | SPIKE | 55.2 nM               | 68.4 $\pm$ 10nM        |
| Seq40<br>(LNCOV-32) | +         | -        | SPIKE | 45.1 nM               | 85.4 $\pm$ 12 nM       |

[0433] ADGN\*: 与ADGN-106或ADGN-100共价连接的肽

[0434] 环状\*: 显示与ADGN-106连接的环状构象的肽

[0435] 实施例5. 与抑制剂肽一起形成基于ADGN肽的纳米颗粒

[0436] 然后,我们测试了不同肽在ADGN-106或ADGN-100肽存在下形成纳米颗粒组构的能力。抑制ACE2:SARS-CoV-2刺突相互作用的IC<sub>50</sub> 低于1 $\mu$ M的肽在以1/5肽/ADGN摩尔比与ADGN-106肽的复合物中进一步评估。将肽与5或10摩尔过量的ADGN-106复合。肽/ADGN-106复合物的平均大小和多分散性每次测量在25℃下测定3分钟,并使用Zetasizer 4装置 (Malvern Ltd) 测量z $\zeta$ 电位。表8中显示3次单独实验的平均值的数据。

[0437] 表8

| 代码序列             | 平均尺寸(nm)      | PI   |
|------------------|---------------|------|
| Seq12 (LNCOV-10) | 35.4 $\pm$ 5  | 0.21 |
| Seq15 (LNCOV-22) | 37.5 $\pm$ 5  | 0.23 |
| Seq16 (LNCOV-17) | 44.2 $\pm$ 7  | 0.28 |
| Seq17 (LNCOV-15) | 57 $\pm$ 4    | 0.17 |
| Seq19 (LNCOV-23) | 37.2 $\pm$ 5  | 0.24 |
| Seq20 (LNCOV-24) | 68.1 $\pm$ 5  | 0.25 |
| Seq21 (LNCOV-13) | 78.2 $\pm$ 7  | 0.3  |
| Seq22 (LNCOV-14) | 54.4 $\pm$ 8  | 0.24 |
| Seq27 (LNCOV-27) | 62.1 $\pm$ 10 | 0.21 |
| Seq28 (LNCOV-20) | 34.6 $\pm$ 7  | 0.18 |
| Seq32 (LNCOV-21) | 58.2 $\pm$ 9  | 0.17 |
| Seq33 (LNCOV-18) | 45.9 $\pm$ 10 | 0.24 |
| Seq35 (LNCOV-26) | 44 $\pm$ 10   | 0.22 |
| Seq37 (LNCOV-29) | 59.2 $\pm$ 14 | 0.24 |
| Seq38 (LNCOV-30) | 39 $\pm$ 10   | 0.25 |
| Seq39 (LNCOV-31) | 48.5 $\pm$ 5  | 0.29 |
| Seq40 (LNCOV-32) | 54.5 $\pm$ 14 | 0.31 |

[0440] 如表8中所报告,ADGN-106与不同的肽形成稳定复合物,平均直径约为35-50nm且

多分散性指数 (PI) 介于 0.2-0.25 之间, Seq23/Seq39/Seq40 除外。相比之下, 在 ADGN-106 或 ADGN-100 存在下, 对于对应于 Seq1-11 和 Seq24-26 的肽, 未检测到复合物, 这表明结构组织和抑制肽的尺寸对于复合物形成很重要。

[0441] 实施例 6. 基于肽的纳米颗粒对 ACE2:SARS-CoV-2 刺突相互作用的抑制

[0442] 使用 SARS-CoV-2 刺突:ACE2 和 ACE2:SARS-CoV-2 刺突:抑制剂筛选测定试剂盒 (DBS Bioscience) 在体外评估了不同肽抑制剂/ADGN-106 复合物阻断 SARS-CoV-2 刺突:ACE2 相互作用的效力。结果对应于 3 次单独实验的平均值, 并在图 3B、图 4B 和表 7 中报告。

[0443] 如图 3A-3B、图 4A-4B 和表 7 所报告, ADGN-106 纳米颗粒内不同肽的缔合显著提高了它们阻断 SARS-CoV-2 刺突:ACE2 相互作用的效力。

[0444] A. ACE2:SARS-CoV-2 刺突相互作用

[0445] 当与呈纳米颗粒形式的 ADGN-106 复合时, SBP-1 对照序列阻止 ACE2:刺突抑制,  $IC_{50}$  为  $163.4 \pm 29$  nM, 并且共价连接至 ADGN-106 的 SBP-1 (Seq 32) 的  $IC_{50}$  为  $24.5 \pm 2$  nM。

[0446] 肽 Seq 17、19、20、21、27、28、39、40 在与呈纳米颗粒形式的 ADGN-106 复合时抑制了 SARS-CoV-2 刺突:ACE2 相互作用,  $IC_{50} < 10$  nM。使用 Seq 17、20、27、28 获得了最佳抑制,  $IC_{50}$  值为  $3.4 \pm 0.2$ 、 $3.7 \pm 0.5$ 、 $5.2 \pm 0.4$ 、 $1.8 \pm 0.8$  和  $2.7 \pm 0.7$  nM, 其比 SBP-1 肽/ADGN-106 和 SBP-1-ADGN-106/ADGN-106 复合物强 40 至 6 倍。

[0447] B. SARS-CoV-2 刺突:ACE2 相互作用

[0448] 当与呈纳米颗粒形式的 ADGN-106 复合时, SBP-1 对照序列阻止 ACE2:刺突抑制,  $IC_{50}$  为  $87.5 \pm 15$  nM, 并且共价连接至 ADGN-106 的 SBP-1 (Seq 32) 的  $IC_{50}$  为  $7.2 \pm 4$  nM。

[0449] 肽 Seq 17/27/28/33/39/40 在与呈纳米颗粒形式的 ADGN-106 复合时抑制了 ACE2:SARS-CoV-2 刺突相互作用,  $IC_{50} < 5$  nM。使用 Seq 17/27/28/33 获得了最佳抑制,  $IC_{50}$  值为  $2.7 \pm 0.1$ 、 $1.1 \pm 0.5$ 、 $2.1 \pm 0.4$  和  $1.2 \pm 0.4$  nM, 其比 SBP-1 肽/ADGN-106 和 SBP-1-ADGN-106/ADGN-106 复合物强 35 倍和 4 倍。

[0450] 表 9: 纳米颗粒形式的肽的结果

|                  | SARS-CoV-2 刺突:ACE2    | ACE2:SARS-CoV-2 刺突    |
|------------------|-----------------------|-----------------------|
| 代码序列             | IC <sub>50</sub> (nM) | IC <sub>50</sub> (nM) |
| Seq12 (LNCOV-10) | 45.4                  | 268.5                 |
| Seq17 (LNCOV-15) | 3.4                   | 2.7                   |
| Seq19 (LNCOV-23) | 7.8                   | 132.5                 |
| Seq20 (LNCOV-24) | 3.7                   | 8.7                   |
| Seq21 (LNCOV-13) | 5.2                   | 11.2                  |
| Seq22 (LNCOV-14) | 78.2                  | 7.2                   |
| Seq23 (SBP-1)    | 163.4                 | 87.5                  |
| Seq27 (LNCOV-27) | 1.8                   | 1.1                   |
| Seq28 (LNCOV-20) | 2.7                   | 2.1                   |
| Seq32 (LNCOV-21) | 24.5                  | 7.2                   |
| Seq33 (LNCOV-18) | 27.6                  | 1.2                   |
| Seq35 (LNCOV-26) | 217.2                 | 55.4                  |
| Seq38 (LNCOV-30) | 91.4                  | 49.7                  |
| Seq39 (LNCOV-31) | 3.7                   | 2.4                   |
| Seq40 (LNCOV-32) | 2.1                   | 3.4                   |

[0452] 出人意料地,不同肽与ADGN-106缔合到纳米颗粒内显著提高了它们阻断SARS-CoV-2刺突:ACE2相互作用的效力。参见表9。ADGN-106与不同肽的稳定纳米颗粒的形成可局部增加抑制结构域的浓度,从而提高效率。

[0453] 总之,阻断ACE2:SARS-CoV-2刺突相互作用的最佳候选物对应于

[0454] ●与共价连接至ADGN-106的β6-α5环对应的环状肽(Seq20和Seq21)

[0455] ●与共价连接至ADGN-106的β5-β6环对应的环状肽(Seq17)

[0456] ●源自与或不与ADGN-106偶联的ACE2的α1和α2螺旋的肽(Seq27、28、39、40)。

[0457] ●源自共价连接至ADGN-106的ACE2的α1螺旋的肽(Seq33)

[0458] 实施例7.SARS-CoV 2病毒感染的肽抑制剂的筛选

[0459] 在Vero E6细胞上评估了不同肽(非纳米颗粒形式)对SARS-CoV2病毒感染的影响。在感染前一天将细胞涂铺在96孔中。肽溶液在DMSO/水(2%)中制备,并从5mM的储备液稀释。使用0.5μM的单一浓度肽进行筛选。将肽与SARS-CoV-2(MOI 0.01)混合30分钟,然后添加至单层Vero-E6细胞中。感染后72小时,对板进行固定、染色和分析。使用CellTiter-Glo测定(Promega),并行使用未感染的细胞来单独监测不同肽的细胞毒性。

[0460] 结果报告在表10中:

[0461] 表10

|  | LNCOV |      |
|--|-------|------|
|  | 残余感染  | 细胞活力 |

[0462]

|                         | LNCOV |      |
|-------------------------|-------|------|
|                         | 残余感染  | 细胞活力 |
| 代码序列                    | (%)   | (%)  |
| Seq15 (LNCOV-22)        | 100   | 95   |
| Seq17 (LNCOV-15)        | 20    | 85   |
| Seq19 (LNCOV-23)        | 90    | 87   |
| Seq20 (LNCOV-24)        | 65    | 91   |
| [0463] Seq21 (LNCOV-13) | 79    | 78   |
| Seq22 (LNCOV-14)        | 40    | 87   |
| Seq28 (LNCOV-20)        | 10    | 78   |
| Seq32 (LNCOV-21)        | 70    | 81   |
| Seq33 (LNCOV-18)        | 15    | 94   |
| Seq34 (LNCOV-25)        | 100   | 98   |
| Seq38 (LNCOV-30)        | 80    | 68   |
| ADGN-106                | 80    | 84   |

[0464] 如表10中所报告,在0.5 $\mu$ M浓度下,肽Seq17、20、22、28和33表现出对病毒感染的抑制。Seq17、28和33减少超过80%的病毒感染,并且Seq22减少60%,细胞毒性极低。因此,关于SARS-CoV-2病毒感染性和复制进一步评估了肽Seq17、22、28和33,以获得抑制感染的完整IC<sub>50</sub>信息。

[0465] 在感染前一天将细胞涂铺在96孔中。肽溶液在DMSO/水(2%)中制备,并从5mM的储备液稀释。将具有不同稀释浓度的肽在即将病毒感染前直接添加至单层Vero-E6细胞中,或与SARS-CoV-2混合30分钟,然后添加至单层Vero-E6细胞中。ADGN-106、羟基-氯喹和缓冲液用作对照,并且所有处理一式三份进行。使用CellTiter-Glo测定(Promega)在Vero-6、H1299和HEPG2细胞上分析不同肽的细胞毒性。

[0466] 结果报告在表11中:

[0467] 表11.

| [0468] | 化合物               | P-IC <sub>50</sub> (nM) | D-IC <sub>50</sub> (nM) | TD <sub>50</sub> ( $\mu$ M) |
|--------|-------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------|
|        | Seq 22 (LNCOV-14) | 145.2 $\pm$ 25          | 124.5 $\pm$ 17          | 358 $\pm$ 27                |

| [0469] | 化合物               | P-IC <sub>50</sub> (nM) | D-IC <sub>50</sub> (nM) | TD <sub>50</sub> ( $\mu$ M) |
|--------|-------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------|
|        | Seq 17 (LNCOV-15) | 57.2 $\pm$ 12           | 21.5 $\pm$ 12           | 340 $\pm$ 28                |
|        | Seq 33 (LNCOV-18) | 12.2 $\pm$ 5            | 21.7 $\pm$ 8            | 510 $\pm$ 31                |
|        | Seq 28 (LNCOV-20) | 17.7 $\pm$ 9            | 34.5 $\pm$ 11           | 290 $\pm$ 51                |
|        | ADGN-106          | 6800 $\pm$ 1200         | 5450 $\pm$ 956          | 356 $\pm$ 64                |
|        | 羟基氯喹              | 4700 $\pm$ 523          | 4400 $\pm$ 215          | 190 $\pm$ 28                |

[0470] \*P-IC<sub>50</sub>值在感染前预温育SARS-CoV-2/肽时获得。

[0471] \*D-IC<sub>50</sub>值在肽直接应用于Vero 6细胞时获得。

[0472] 如图5A、5C和表11所报道,所有四种肽都显示出针对SARS-CoV2病毒感染的有效抑制活性,IC<sub>50</sub>在纳摩尔范围内。Seq 17和Seq 22分别表现出21.5  $\pm$  12nM和124.5  $\pm$  14nM的

IC<sub>50</sub>。Seq 28和Seq 33分别表现出34.5±11nM和21.7±8nM的IC<sub>50</sub>。在感染之前与SARS CoV-2预温育使Seq 28和Seq 33的效力增加2倍,这与这些肽与刺突蛋白相互作用并因此将直接与病毒相互作用的事实一致。相比之下,预温育不影响Seq 22效力并使Seq 17抗病毒活性降低2倍。单独ADGN-106显示出较差的抗病毒活性,IC<sub>50</sub>介于5.5-6.8μM之间。

[0473] 所有肽对未感染细胞表现出相对低的细胞毒性,TD<sub>50</sub>值在介于300至500μM之间的范围内。参见图5B和5D。

[0474] Seq 17/28/33构成非常有效的SARS-CoV-2感染抑制剂,提供比硫酸羟氯喹强250倍的抗SARS-CoV-2活性(IC<sub>50</sub> 4.4±0.215μM)。

[0475] 实施例8. 靶向SARS-CoV-2核衣壳的siRNA的选择

[0476] 选择了十种靶向SARS-CoV-2核衣壳基因的siRNA(表12)

[0477] 表12

| [0478] | siRNA   | 位置   | 序列                                        | IC50 (nM) |
|--------|---------|------|-------------------------------------------|-----------|
|        | DIVC-1  | 400  | GCAACTGAGGGAGCCTTGAAT<br>(SEQ ID NO: 161) | >500      |
|        | DIVC-2  | 862  | GACCAGGA ACTAATCAGACAA                    | >500      |
| [0479] | siRNA   | 位置   | 序列                                        | IC50 (nM) |
|        |         |      | (SEQ ID NO: 162)                          |           |
|        | DIVC-3  | 206  | GACAAGGCGTTCCAATTAACA<br>(SEQ ID NO: 163) | 11.4      |
|        | DIVC-4  | 359  | GACTTCCCTATGGTGCTAACA<br>(SEQ ID NO: 164) | 254       |
|        | DIVC-5  | 1122 | GGCTGATGAAACTCAAGCCTT<br>(SEQ ID NO: 165) | >500      |
|        | DIVC-6  | 727  | GGCCAAACTGTCACTAAGAAA<br>(SEQ ID NO: 166) | 8.7       |
|        | DIVC-7  | 824  | GCAGACGTGGTCCAGAACAAA<br>(SEQ ID NO: 167) | 147       |
|        | DIVC-8  | 544  | GCCTCTTCTCGTTCCTCATCA<br>(SEQ ID NO: 168) | 27.3      |
|        | DIVC-9  | 1063 | AAGCATATTGACGCATACAAA<br>(SEQ ID NO: 169) | 394.2     |
|        | DIVC-10 | 1221 | GCAACAATCCATGAGCAGTGC<br>(SEQ ID NO: 170) | 28.4      |

[0480] 在表达eGFP-SARS-CoV-2核衣壳的H1299肺上皮细胞上评估了siRNA。用pcDNA3.1 (+)-N-eGFP-NP质粒转染H1299上皮细胞,所述质粒编码用eGFP(Genscript Ref MC-0101137)标记的SARS-COV-2核衣壳。然后用以摩尔比1/20与ADGN-100复合的siRNA(1nM至200nM)处理细胞。靶向eGFP的siRNA和scr-siRNA分别用作阳性对照和阴性对照。转染后48小时通过Elisa(Abcam)评价核衣壳-eGFP蛋白的水平,并使用CellTiter Glow试剂盒在GlowMax(Promega)上测定毒性。结果在图6A-6B和表12中报告。

[0481] 如图6A所报告,靶向eGFP的siRNA诱导eGFP沉默,IC<sub>50</sub>为4.5±2nM。4种siRNA(DIVC-6/DIVC-3/DIVC-8/DIVC-10)在低纳摩尔浓度下诱导NC沉默。最佳沉默反应是用DIVC-6和DIVC-3获得的,IC<sub>50</sub>分别为8.7±2nM和11.4±5nM。没有观察到与siRNA相关的显著毒性。参见图6B。

[0482] 实施例9. 靶向SARS-CoV-2ORF 3A基因的siRNA的选择

[0483] 选择了五种不同的靶向SARS-CoV-2ORF 3A基因的siRNA(表13)

[0484] 表13

| [0485] | siRNA   | 位置  | 序列                                         | IC <sub>50</sub> (nM) |
|--------|---------|-----|--------------------------------------------|-----------------------|
|        | DIVC-31 | 52  | GGTGAAATCAAGGATGCTACT<br>(SEQ ID NO: 171)  | 18.4 ± 2              |
|        | DIVC-32 | 485 | GTGTAACCTTCTTCAATTGTCA<br>(SEQ ID NO: 172) | 95.1 ± 7              |
|        | DIVC-33 | 527 | CAAGTCCTATTTCTGAACATG<br>(SEQ ID NO: 173)  | 57.2 ± 12             |
|        | DIVC-34 | 676 | GAACATGTTACCTTCTTCATC<br>(SEQ ID NO: 174)  | 12.3 ± 1              |
|        | DIVC-35 | 366 | TGCAGAGTATAAACTTTGTAA<br>(SEQ ID NO: 175)  | 125 ± 11              |

[0486] 在表达eGFP-SARS-CoV-2ORF3A基因的H1299肺上皮细胞上评估了siRNA。用pcDNA3.1(+)-N-eGFP-ORF3a质粒转染H1299上皮细胞,所述质粒编码用eGFP(Genscript Ref MC-0101137)标记的SARS-COV-2ORF3a。然后用以摩尔比1/20与ADGN-100复合的siRNA(1nM至200nM)处理细胞。靶向eGFP的siRNA和scr-siRNA分别用作阳性对照和阴性对照。转染后48小时通过Elisa(Abcam)评价ORF3a-eGFP蛋白的水平,并使用CellTiter Glow试剂盒在GlowMax(Promega)上测定毒性。结果在图7A和7B和表13中报告。

[0487] 如图7A中所报告,靶向eGFP的siRNA诱导eGFP沉默,IC<sub>50</sub>为4.5±2nM。

[0488] DIVC-31和DIVC-34 siRNA在低纳摩尔浓度下诱导ORF 3a蛋白沉默,IC<sub>50</sub>分别为18.4±2nM和12.3±1nM。没有观察到与siRNA相关的显著毒性。

[0489] 实施例10. 靶向SARS-CoV-2ORF 8基因的siRNA的选择

[0490] 选择了五种靶向SARS-CoV-2ORF 8基因的siRNA(表14)

[0491] 表14

[0492]

| siRNA   | 位置  | 序列                                         | IC <sub>50</sub> (nM) |
|---------|-----|--------------------------------------------|-----------------------|
| DIVC-81 | 97  | GTTGATGACCCGTGTCCTATT<br>(SEQ ID NO: 176)  | >200                  |
| DIVC-82 | 103 | GACCCGTGTCCTATTCCTTC<br>(SEQ ID NO: 177)   | 21.7 ± 7              |
| DIVC-83 | 184 | GTGGATGAGGCTGGTTCTAAA<br>(SEQ ID NO: 178)  | 15.4 ± 3              |
| DIVC-84 | 300 | GCGTTGTTTCGTTCTATGAAGA<br>(SEQ ID NO: 179) | 112.8 ± 15            |
| DIVC-85 | 110 | GTCCTATTCCTTCTATTCTA<br>(SEQ ID NO: 180)   | 10.8 ± 2              |

[0493] 在表达eGFP-SARS-CoV-2ORF8基因的H1299肺上皮细胞上评估了siRNA。用pcDNA3.1(+)-N-eGFP-ORF8质粒转染H1299上皮细胞,所述质粒编码用eGFP(Genscript Ref MC-0101137标记的SARS-CoV-2ORF8。然后用以摩尔比1/20与ADGN-100复合的siRNA(1nM至200nM)处理细胞。靶向eGFP的siRNA和scr-siRNA分别用作阳性对照和阴性对照。转染后48小时通过Elisa(Abcam)评价ORF8-eGFP蛋白的水平,并使用CellTiter Glow试剂盒在GlowMax(Promega)上测定毒性。结果在图8A-8B和表14中报告。

[0494] 如图8A所报告,DIVC-82、DIVC-83和DIVC-85 siRNA诱导ORF 8a蛋白沉默,IC<sub>50</sub>分别为21.7 ± 7nM、15.4 ± 3nM和10.8 ± 2nM。没有观察到与siRNA相关的显著毒性。

[0495] 实施例11.SARS-CoV-2病毒感染的siRNA的筛选

[0496] 在Vero E6细胞上评估了siRNA对SARS-CoV2病毒感染的影响。感染前一天将细胞涂铺在96孔中。将siRNA(DIVC-3、DIVC-6、DIVC-8、DIVC-34和DIVC-85)以摩尔比1/20与ADGN-100复合。在即将病毒感染前将具有不同稀释浓度的siRNA/ADGN-100复合物直接添加至单层Vero-E6细胞。ADGN-100和缓冲液用作对照,并且所有处理一式三份进行。使用CellTiter-Glo测定(Promega)在Vero-6细胞上分析了不同siRNA/ADGN-100复合物的细胞毒性。

[0497] 结果在图9A-9B和表15中报告。

[0498] 表15.

[0499]

| SIRNA    | IC <sub>50</sub> (nM) | TD <sub>50</sub> (μM) |
|----------|-----------------------|-----------------------|
| DIVC-3   | 84+14                 | 452+20                |
| DIVC-6   | 68+12                 | 652+24                |
| DIVC-8   | 117+8                 | 548+25                |
| DIVC-34  | 1450+11               | 589+17                |
| DIVC-85  | 1221+18               | 248+35                |
| AGDN-100 | 7500+523              | 368+18                |

[0500] 如图9和表15所报告,靶向SARS-CoV-2核衣壳基因的siRNA(DIVC-3、DIVC-6和DIVC-8)显示出针对SARS-CoV2病毒感染的有效抑制活性,IC<sub>50</sub>在纳摩尔范围内。DIVC-3和DIVC-6分别表现出84. ± 14nM和68 ± 12nM的IC<sub>50</sub>。相比之下,靶向SARS-CoV-2ORF8(DIVC-85)或ORF3A(DIVC-34)的siRNA显示出适度抗病毒活性,IC<sub>50</sub>为约1μM。单独ADGN-100显示出较差

的抗病毒活性,  $IC_{50}$  为  $7.5\mu M$ 。数据表明, 与ORF3A和ORF8蛋白相比, 核衣壳对于病毒生产至关重要。

[0501] 所有siRNA/ADGN-100复合物对未感染细胞表现出相对低的细胞毒性,  $TD_{50}$  值在介于300至600 $\mu M$ 之间的范围内。

[0502] 靶向SARS-CoV-2核衣壳基因的DIVC-6 siRNA构成非常有效的SARS-CoV-2感染抑制剂, 提供比硫酸羟氯喹强64倍的抗SARS-CoV-2活性 ( $IC_{50} 4.4 \pm 0.215\mu M$ )。

[0503] 实施例12. siRNA和肽抑制剂组合对SARS-CoV 2病毒感染的影响

[0504] 我们证明了靶向SARS-CoV-2核衣壳基因的DIVC-6 siRNA, 即Seq 17 (LNCOV-15) 和33 (LNCOV-18) 构成了非常有效的SARS-CoV-2感染抑制剂。接下来, 我们评估了将靶向SARS-CoV-2核衣壳基因的siRNA与SARS-Cov2:ACE2受体的肽抑制剂组合对病毒复制的影响。

[0505] 在Vero E6细胞上评估了siRNA/肽抑制剂组合对SARS-CoV2病毒感染的影响。在感染前一天将细胞涂铺在96孔中。将DIVC-6 siRNA与ADGN-100以摩尔比1/20复合。在即将病毒感染前将siRNA/ADGN-100复合物和具有不同稀释浓度的Seq 17或Seq 33肽直接添加至单层Vero-E6细胞中。ADGN-100和缓冲液用作对照, 并且所有处理一式三份进行。

[0506] 结果在图10和表16中报告。

[0507] 表16.

| 处理              | IC50 (nM)     |
|-----------------|---------------|
| DIVC-6/ADGN-100 | $68 \pm 12$   |
| LNCOV-15        | $27.5 \pm 11$ |
| LNCOV-18        | $22.9 \pm 8$  |
| DIVC-6/LNCOV-15 | $8.4 \pm 8$   |
| DIV6/LNCOV-18   | $11.2 \pm 4$  |

[0509] 如图10和表16所报告, 将LNCOV-15或LNCOV-18肽与靶向SARS-CoV-2核衣壳基因的DIVC-3 siRNA组合使游离肽的效力提高了2-3倍并且使DIVC-6 siRNA的效力提高了6倍, 对于DIVC-6/LNCOV-15和DIVC-6/LNCOV-18组合,  $IC_{50}$  分别为  $8.4. \pm 8nM$  和  $11.2 \pm 4nM$ 。结果证明, 将siRNA与抑制肽组合在一起允许靶向病毒复制中的两个不同步骤, 包括细胞进入和复制。

[0510] 实施例13. LNCOV-15和LNCOV-18促进培养细胞中的siRNA递送。

[0511] 使用靶向SARS-CoV-2核衣壳的siRNA评估了LNCOV-15和LNCOV-18在培养细胞中促进siRNA递送的效力。

[0512] 在表达eGFP-SARS-CoV-2核衣壳的H1299肺上皮细胞上评估了siRNA DIVC-6。用pcDNA3.1 (+) -N-eGFP-NP质粒转染H1299上皮细胞, 所述质粒编码用eGFP (Genscript Ref MC-0101137) 标记的SARS-COV-2核衣壳。然后用以摩尔比1/20与ADGN-100、LNCOV-15和LNCOV-18复合的siRNA (1nM至200nM) 处理细胞。scr-siRNA分别用作阳性对照和阴性对照。转染后48小时通过Elisa (Abcam) 评价核衣壳-eGFP蛋白的水平, 并使用CellTiter Glow试剂盒在GlowMax (Promega) 上测定毒性。结果在图11A中报告。

[0513] 如图11A所报告, LNCOV-15和LNCOV-18促进培养细胞中的siRNA递送, 在低纳摩尔浓度下导致NC沉默的沉默。当分别与LNCOV-15和LNCOV-18复合时, 获得与DIVC-6 siRNA相关的沉默反应,  $IC_{50}$  为  $11 \pm 4nM$  和  $8.7 \pm 2nM$ 。结果与用ADGN-100获得的结果相似, 表明LNCOV

肽是有效siRNA递送载体,并且可用于siRNA递送和阻断病毒细胞进入。

[0514] 实施例14:使用肽抑制剂抑制ACE2:SARS-CoV-2刺突突变体相互作用。

[0515] 最近几个月出现了几种新的SARS-CoV-2病毒变体。英国变体B.1.1.7、巴西变体P.1、南非变体B.1.351和最近的印度变体B.1.617由于其高流行性而特别令人担忧。在刺突蛋白的RBD结构域中鉴定的突变亚群出现在不止一种毒株中,并且据报告增加传播能力、感染性,并且可增加其免疫逃避潜力。

[0516] 使用ACE2:SARS-CoV-2刺突抑制剂筛选测定试剂盒(DBS Bioscience)在体外评估了前导肽Seq17(LN-COV-15)、Seq28(LN-COV-20)和Seq33(LN-COV-18)阻断ACE2与SARS-CoV-2刺突突变体之间的相互作用的效力。关于具有主要突变的五种不同SARS-CoV-2刺突蛋白变体评价了肽抑制,所述变体包括 $\alpha$ (B.1.1.7/英国)、 $\beta$ (B.1.351/南非)、 $\gamma$ (P1/巴西)、 $\delta$ (B.1.617.2/印度)和 $\epsilon$ (B.1.429)变体(表17)。RBD和刺突蛋白变体获自Sino Biological(US)。

[0517] 表17

| 变体               | 谱系              | 刺突突变                                                              |
|------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------|
| $\alpha$ (UK)    | B 1 1 7         | H69-V70 缺失, N501Y, D614G                                          |
| $\beta$ (南非)     | B 1 53 5 1      | K417N, E484K, N501Y, D614G                                        |
| $\gamma$ (巴西)    | P1              | L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y |
| $\delta$ (印度)    | B 1.6.1.7.2     | T19R, G142D, E156G, L452R, T478K, D614G, P681R                    |
| $\epsilon$ (USA) | B.1.429/B.1.427 | <b>S13I</b> , W152C, L452R, D614G                                 |

[0519] 肽评估以96孔格式进行。将ACE2蛋白附着在镀镍的96孔板上,然后与肽抑制剂溶液在室温下缓慢振荡温育30分钟。最后,在肽抑制剂溶液存在下将不同SARS-CoV-2刺突-Fc添加至板上的ACE2中,并在室温下缓慢振荡温育一小时。用抗Fc-HRP处理板,然后添加HRP底物以产生化学发光,并使用化学发光读取器进行分析。结果对应于3次单独实验的平均值,并在图12A-12E和表18中报告。

[0520] 表18.

| 肽                | SARS-COV 2       | $\alpha$ (B117)   | $\beta$ (B1312)  | $\gamma$ (P1)    | $\delta$ (B1617) | $\epsilon$ (B1429) |
|------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|
| Seq17 (LNCOV-15) | 78.2 $\pm$ 14 nM | 135.5 $\pm$ 21 nM | 75.2 $\pm$ 21 nM | 87.2 $\pm$ 20n M | 48.2 $\pm$ 11 nM | 94.7 $\pm$ 17 nM   |
| Seq28(LNC OV-20) | 38.6 $\pm$ 11 nM | 24.6 $\pm$ 11 nM  | 31.5 $\pm$ 05 nM | 41.7 $\pm$ 11 nM | 29.2 $\pm$ 11 nM | 28.8 $\pm$ 07 nM   |
| Seq33 (LNCOV-18) | 18.4 $\pm$ 11 nM | 17.8 $\pm$ 09 nM  | 28.8 $\pm$ 10 nM | 20.2 $\pm$ 05 nM | 25.7 $\pm$ 08 nM | 31.4 $\pm$ 09 nM   |

[0522] 如图12A-12E所报告,前导肽阻断ACE2与不同SARS-CoV-2刺突变体之间的相互作用。在所有情况下,IC<sub>50</sub>值都与使用SARS-COV2原始毒株获得的值相似。

[0523] 无论使用何种刺突变体,Seq28和Seq33肽都是最有效的,IC<sub>50</sub>低于50nM。Seq28和Seq33肽直接靶向刺突蛋白并竞争与ACE2的界面。这种界面ACE2/刺突涉及残基N501、E484、L452和K417,它们在不同变体中发生突变,对ACE2具有更好亲和力。

[0524] 突变L452R(变体δ和ε)一直与免疫逃逸和更高传播能力相关。这种突变直接由Seq-28和Seq-33靶向。

[0525] 对E484残基的突变据报告增加病毒的感染性并加强与ACE2的相互作用。此突变E484K(变体Py和β)和E484Q(变体δ)由Seq17直接靶向,所述Seq17竞争同一刺突/ACE2界面。

[0526] 实施例15.关于SARS-CoV-2变体病毒感染对肽抑制剂的评估

[0527] 进一步评估了前导肽Seq17(LN-COV-15)、Seq28(LN-COV-20)和Seq33(LN-COV-18)阻断SARS-CoV-2变体病毒感染性和复制的效力。

[0528] 在补充有2% FBS(Eurobio-Scientific)和1%青霉素-链霉素溶液(P0781;Sigma Aldrich)的DMEM高葡萄糖培养基(D6429;Sigma Aldrich)中对Vero E6细胞进行抗病毒测定。通过在含有Seq17、Seq28或Seq33肽(浓度范围从10nM至1μM)或6μM瑞德西韦(阳性对照RMD)或无抗病毒分子(阴性对照;“T-”)的培养基中温育1小时将细胞用SARS-CoV-2变体(α/β/δ)以MOI 0.001一式三份感染。肽溶液在DMSO/水(2%)中制备,并从5mM的储备液稀释。感染后1小时移除接种物,并在添加具有先前指定浓度的新培养基之前用PBS 1x洗涤细胞。感染后24小时收获上清液,并且病毒滴度通过TCID<sub>50</sub>方法在Vero E6细胞上测定并通过Spearman和Kärber算法计算。结果在图13A-13C和表19中报告。

[0529] 表19.

| [0530] | 肽                   | SARS-COV2    | α (B117)       | β (B1312)      | δ (B1617)  |
|--------|---------------------|--------------|----------------|----------------|------------|
|        | Seq17<br>(LNCOV-15) | 31.5 ± 12 nM | 125.2±24<br>nM | 118.2±15<br>nM | 25.7±10 nM |
|        | Seq28(LNCO<br>V-20) | 34.5 ± 11 nM | 28.4±09<br>nM  | 57.5±11 nM     | 18.2±11 nM |
|        | Seq33<br>(LNCOV-18) | 21.7 ± 8 nM  | 48.2±15<br>nM  | 47.2±14 nM     | 32.2±09 nM |

[0531] 如图13A-13C和表19所报告,所有三种肽都显示出针对所有SARS-CoV2变体病毒的有效抑制活性,并且在所测试的最大浓度(500nM)下实现了大于99.99%的病毒抑制。对于α/β和δ变体,使用Seq28和Seq33获得的IC<sub>50</sub>值与使用SARS-COV2原始毒株获得的IC<sub>50</sub>值相似。Seq17对α和β变体的效率分别低3至4倍。

[0532] Seq 28和Seq 33构成所有SARS-CoV-2变体感染的非常有效的抑制剂,提供比瑞德西韦强200倍的抗SARS-CoV-2活性。

[0533] 实施例16.siRNA和肽抑制剂组合对SARS-CoV-2病毒变体感染的影响

[0534] 我们证明了靶向SARS-CoV-2核衣壳基因的DIVC-6 siRNA,即Seq17(LNCOV-15)、seq 28(LNCOV-20)和seq 33(LNCOV-18)构成非常有效的SARS-CoV-2感染抑制剂。我们评估了将靶向SARS-CoV-2核衣壳基因的siRNA与SARS-Cov2:ACE2受体的肽抑制剂组合对SARS-Cov-2α、β和δ变体的复制的影响。

[0535] 在Vero E6细胞上评估了siRNA/肽抑制剂缔合对SARS-CoV2病毒感染的影响。在感染前一天将细胞涂铺在96孔中。将DIVC-6 siRNA与ADGN-100、Seq-17、Seq-28或Seq-33以摩尔比1/20复合。在即将病毒感染前将siRNA/肽复合物和具有不同稀释浓度的Seq17、Seq-28和Seq33肽直接添加至单层Vero-E6细胞中。6 $\mu$ M瑞德西韦(阳性对照RMD)或无抗病毒分子(阴性对照;“T-”)用作对照,并且所有治疗一式三份进行。

[0536] 结果在图14A-14C和表19中报告。

[0537] 表19.

| 化合物                 | SARS-COV2<br>IC <sub>50</sub> (nM) | $\alpha$ (B117)<br>IC <sub>50</sub> (nM) | $\beta$ (B1312)<br>IC <sub>50</sub> (nM) | $\delta$ (B1617)<br>IC <sub>50</sub> (nM) |
|---------------------|------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|
| DIVC-6              | 68 + 12                            | 84.5 + 10                                | 58.5+ 11                                 | 91.3 + 15                                 |
| Seq17<br>(LNCOV-15) | 31.5 $\pm$ 12                      | 125.2 $\pm$ 24                           | 118.2 $\pm$ 15                           | 25.7 $\pm$ 10                             |
| [0538] DIVC-6/seq17 | 11.4 $\pm$ 4                       | 21.4 $\pm$ 5                             | 27.5 $\pm$ 10                            | 8.7 $\pm$ 5                               |
| Seq28(LNCOV-20)     | 34.5 $\pm$ 10                      | 28.4 $\pm$ 09                            | 57.5 $\pm$ 11                            | 18.2 $\pm$ 11                             |
| DIVC-6/Seq-28       | 16.8 $\pm$ 9                       | 6.5 $\pm$ 4                              | 5.9 $\pm$ 3                              | 9.8 $\pm$ 5                               |
| Seq33<br>(LNCOV-18) | 21.7 $\pm$ 8                       | 48.2 $\pm$ 15                            | 47.2 $\pm$ 14                            | 32.2 $\pm$ 09                             |
| DIVC-6/Seq-33       | 17.5 $\pm$ 4                       | 11.8 $\pm$ 7                             | 5.7 $\pm$ 1                              | 6.9 $\pm$ 4                               |

[0539] 如图14A-14C所报告,DIVC-6 siRNA显示出针对所有SARS-CoV2变体病毒的有效抑制活性。这并不出人意料,因为由DIVC-6靶向的序列位于核衣壳的CTD结构域的N端部分,这与较差突变率相关,并且在所测试的不同变体中不受影响。

[0540] 如针对SARS-COV-2原始毒株所报告,将Seq17、Seq28和Seq33肽与靶向SARS-CoV-2核衣壳基因的DIVC-6 siRNA组合使游离肽的效力提高了2-3倍并且使DIVC-6 siRNA的效力提高了6-10倍。

[0541] 结果证明,将siRNA与抑制肽组合在一起允许靶向病毒复制中的两个不同步骤,包括细胞进入和复制。

[0542] 实施例17.SARS-CoV 2的肽和肽/siRNA复合物抑制剂的肺部施用。

[0543] 靶向SARS-CoV-2核衣壳基因的DIVC-6 siRNA,即Seq17(LNCOV-15)和seq 33(LNCOV-18)构成了非常有效的SARS-CoV-2感染抑制剂。由于SARS-CoV-2通过呼吸感染肺组织,所以我们的目标是使用相同的途径来递送肽抑制剂和肽/siRNA复合物。

[0544] 考虑到对于肺部治疗而言,重要的是获得显著组织渗透并进入肺部深处,我们使用气管内滴注评估了Seq17(LNCOV-15)、seq 33(LNCOV-18)、seq17/DIVC-6和Seq33/DIVC-6复合物的肺递送和分布。为了监测Seq-33和Seq-17生物分布,在N端用Cy5.5染料标记肽。为了监测DIVC-6 siRNA生物分布,用Cy-5.5标记siRNA。

[0545] 体内肺生物分布研究在健康4周龄雄性C57BL/6J小鼠中进行。单剂量的肽或肽/siRNA复合物通过气管内滴注(200 $\mu$ g)施用(表20)。在T0、注射后1小时、2小时、6小时、24小时、48小时和72小时通过无创体内全身荧光成像评估荧光。使用IVIS动力学系统(PerkinElmer)(ex:640 $\pm$ 17nm;em:680 $\pm$ 10nm)获取荧光图像,并通过使用Living image软件(Caliper 2D)从荧光图像获得半定量数据。

[0546] 表20

| 组 | 小鼠组           | 剂量/小鼠                  | 体积         | 小鼠只数/组 |
|---|---------------|------------------------|------------|--------|
| 1 | 对照            | 200 $\mu$ g (10 mg/Kg) | 25 $\mu$ l | 6      |
| 2 | Seq-17        | 200 $\mu$ g (10mg/kg)  | 25 $\mu$ l | 6      |
| 3 | Seq-33        | 200 $\mu$ g (10 mg/kg) | 25 $\mu$ l | 6      |
| 4 | Seq-33/DIVC-6 | 200 $\mu$ g (10 mg/Kg) | 25 $\mu$ l | 6      |
| 5 | Seq-17/DIVC-6 | 200 $\mu$ g (10 mg/Kg) | 25 $\mu$ l | 6      |

[0548] 如图15A-15E所报告,在小鼠中气管内滴注后,所有化合物都在肺部提供非常强的信号,所述信号保持高水平直至施用后72小时。相比之下,4小时后未检测到游离Cy 5.5染料的信号。在注射后24小时和48小时,所有化合物都被膀胱和肝脏迅速消除。在72小时,只有肺显示出体内可检测到的信号。

[0549] 通过共聚焦显微镜进一步分析不同化合物的肺分布。在施用后4小时、24小时和72小时收集肺,固定在葡萄糖5%中的甲醛4%中。将组织用Mito追踪剂红染色,并将细胞核用Hoesch染色。共聚焦显微镜分析报告于图16A-16B中。

[0550] 在4小时,肽和肽/siRNA复合物主要累积在细胞表面。在巨噬细胞和实质中也报告了荧光信号,但在细胞核中未检测到任何化合物。

[0551] 24小时后,肽和肽/siRNA复合物发出相似的明亮信号,在巨噬细胞以及1型和2型细胞中累积。相比之下,未检测到游离Cy 5.5染料的信号,这证实了不同化合物的肺递送特异性。

[0552] 在72小时,肽和肽/siRNA复合物主要位于1/2型上皮细胞和巨噬细胞的细胞质中。

[0553] 这些结果表明,Seq-17和Seq-33肽能够靶向1型和2型肺上皮细胞,并在气管内施用时显著穿透肺组织。如图17所报告,所有化合物在肺中保持可检测持续72小时,而游离染料在24小时后几乎检测不到。

[0554] 气管内滴注后肽和肽/siRNA均在细胞表面累积,这一事实证明它们是预防SARS-CoV-2初始感染的良好候选物。

[0555] 实施例18.SARS-CoV2的肽和肽/siRNA复合物抑制剂的肺和肝毒性研究

[0556] Seq17(LNCOV-15)、seq 33(LNCOV-18)、seq17/DIVC-6和Seq33/DIVC-6复合物的肺和肝毒性研究在健康4周龄雄性C57BL/6J小鼠中进行。单剂量的肽或肽/siRNA复合物通过气管内滴注(200 $\mu$ g)施用(表20)。盐水溶液用作阴性对照。在施用后12、24、48和72小时收集样品。

[0557] 在气管内滴注前(第0天)、第1天、第2天和处死前(第3天)记录小鼠的体重。在第3天收集肺、肝、心脏、肾和脑并测定器官指数。如图18A-18G所报告,统计分析揭示不同组之间没有显著体重变化和器官指数修改。

[0558] 滴注后2天进行支气管肺泡灌洗(BAL)。分析了BAL中细胞的百分比、总蛋白质和

LDH水平。将结果与用作阴性对照的盐水缓冲液进行比较。如图19A所报告,在化合物候选物与阴性对照之间没有观察到明显差异。在Seq-17和Seq-33/DIVC-6处理的小鼠中仅检测到巨噬细胞略有增加。基于统计数据分析,在5组之间的LDH和总蛋白质测定中没有显著差异(图19B-19C)。

[0559] 数据表明,肽抑制剂和肽/siRNA复合物治疗都不会诱发肺部炎症,并且两种治疗都具有良好耐受性。

[0560] 滴注后2天测定血浆中的AST和ALT水平。基于统计数据分析,在5组之间的ALT或AST测定中没有显著差异(图20A-20B)。数据证明,肽抑制剂和肽/siRNA复合物在肺部滴注后都不会引起肝毒性。

[0561] 前导SARS-COV-2抑制剂;Seq-17、Seq-33和Seq-17/DIVC-6以及Seq-33/DIVC6在气管内施用时具有良好耐受性,并且没有与治疗相关的肺和肝毒性。

[0562] 序列表

[0563]

| SEQ ID NO. | 描述       | 核苷酸或氨基酸序列          |
|------------|----------|--------------------|
| 1.         | LNCOV-01 | SKVGGNYNYLYR       |
| 2.         | LNCOV-0  | KVGGNYNYL          |
| 3.         | LNCOV-1  | GNYNLYRL           |
| 4.         | LNCOV-2  | GGNYNYLYRLFRK      |
| 5.         | LNCOV-3  | STEYQAGST          |
| 6.         | LNCOV-4  | CNGVEGFNC          |
| 7.         | LNCOV-5  | VEGFNCYFP          |
| 8.         | LNCOV-6  | YFPLQSYGFQPTNGVGYQ |
| 9.         | LNCOV-7  | SYGFQPTNGV         |
| 10.        | LNCOV-8  | GFQPTNGVK          |

[0564]

| SEQ ID NO. | 描述       | 核苷酸或氨基酸序列                                                          |
|------------|----------|--------------------------------------------------------------------|
| 11.        | LNCOV-9  | TNGVGYQPY                                                          |
| 12.        | LNCOV-10 | Ac-S*KVGGNYNYLY*R-Ava/Ahx-LWR<br>ALWRLWRSWRLWLLWK-NH2<br><br>*环化位点 |
| 13.        | LNCOV-11 | Ac-K*VGGNYNYK*-Ava-LWRALWRL<br>WRSWRLWLLWK-NH2<br><br>*环化位点        |
| 14.        | LNCOV-12 | Ac-G*NINYLYRL*-Ava-LWRALWRLW<br>RSLWRLWLLWK-NH2<br><br>*环化位点       |
| 15.        | LNCOV-22 | Ac-G*NINYLYRLFK*-Ava-LWRALWRL<br>WRSWRLWLLWK-NH2<br><br>*环化位点      |
| 16.        | LNCOV-17 | Ac-T*EYQAGSTK*<br>Ava-LWRALWRLWRSWRLWLLWK-NH2<br><br>*环化位点         |
| 17.        | LNCOV-15 | Ac-N*GVEGFNK*<br>Ava-LWRALWRLWRSWRLWLLWK-NH2<br><br>*环化位点          |
| 18.        | LNCOV-16 | Ac-V*EGFNCYF*<br>Ava-LWRALWRLWRSWRLWLLWK-NH2<br><br>*环化位点          |
| 19.        | LNCOV-23 | Ac-YFPLQSYGFQPTNGVGYQ<br>Ava-LWRALWRLWRSWRLWLLWK-NH2               |
| 20.        | LNCOV-24 | Ac-S*YGFQPTNGV*-Ava-LWRALWRL<br>WRSWRLWLLWK-NH2<br><br>*环化位点       |
| 21.        | LNCOV-13 | Ac-G*FQPTNGVK*-Ava-LWRALWRLW<br>RSLWRLWLLWK-NH2<br><br>*环化位点       |

[0565]

| SEQ ID NO. | 描述       | 核苷酸或氨基酸序列                                                                      |
|------------|----------|--------------------------------------------------------------------------------|
| 22.        | LNCOV-14 | Ac-T*NGVGYQPYK*-Ava-LWRALWRL<br>WRSLWRLWLLWK-NH2<br>*环化位点                      |
| 23.        | SBP-1    | Ac-IEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQS                                                     |
| 24.        | LNCOV-19 | Ac-EQAKTFLDKFNHEAEDLF                                                          |
| 25.        | LNCOV-33 | Ac-KTFLDKFNHEAEDLF                                                             |
| 26.        | LNCOV-34 | Ac-KTFLDKFNHEAEDLFYS                                                           |
| 27.        | LNCOV-27 | Ac-EQAKTFLDKFNHEAEDLF-P-KWSA<br>FLKEQSTLAQMYG                                  |
| 28.        | LNCOV-20 | Ac-KTFLDKFNHEAEDLFPG-P-KWSAF<br>LKEQSTLAQMYG                                   |
| 29.        | LNCOV-35 | Ac-TAWDLGKGDFRI                                                                |
| 30.        | LNCOV-36 | Ac-NMTQGFWENSMLTD                                                              |
| 31.        | LNCOV-37 | Ac- NMTQGFWEN-PGGP-TAWDLGK                                                     |
| 32.        | LNCOV-21 | Ac-IEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQS-A<br>hx-LWRALWRLWRSLWRLWLLWK-NH2                    |
| 33.        | LNCOV-18 | Ac-EQAKTFLDKFNHEAEDLF-Ahx-LW<br>RALWRLWRSLWRLWLLWK-NH2                         |
| 34.        | LNCOV-25 | Ac-KTFLDKFNHEAEDLF-Ahx-LWRAL<br>WRLWRSLWRLWLLWK-NH2                            |
| 35.        | LNCOV-26 | Ac-KTFLDKFNHEAEDLFYS-Ahx-LWR<br>ALWRLWRSLWRLWLLWK-NH2                          |
| 36.        | LNCOV-28 | Ac-TAWDLGKGDFRI-Ahx-LWRALWRL<br>WRSLWRLWLLWK-NH2                               |
| 37.        | LNCOV-29 | Ac-NMTQGFWENSMLTD-Ahx-LWRAL<br>WRLWRSLWRLWLLWK-NH2                             |
| 38.        | LNCOV-30 | Ac-NMTQGFWENPPGGPTAWDLGK-Ahx<br>-LWRALWRLWRSLWRLWLLWK-NH2                      |
| 39.        | LNCOV-31 | Ac-EQAKTFLDKFNHEAEDLF-P-KWSA<br>FLKEQSTLAQMYG-Ahx-LWRALWRL<br>WRSLWRLWLLWK-NH2 |
| 40.        | LNCOV-32 | Ac-KTFLDKFNHEAEDLF-P-KWSAFLK<br>EQSTLAQMYG-Ahx-LWRALWRLWRS<br>LWRLWLLWK-NH2    |
| 41.        | LNCOV-33 | Ac-<br>EQAKTFLDKFNHEAEDLF-ahx-RSAGW<br>RWRLWRVRSWSR-NH2                        |
| 42.        | SPIKE    | KVGGNYNY                                                                       |
| 43.        | SPIKE    | GNYNYLYRLF                                                                     |

[0566]

| SEQ ID NO. | 描述               | 核苷酸或氨基酸序列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|------------|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 44.        | SPIKE            | TEYQAGST                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 45.        | SPIKE            | NGVEGFN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 46.        | SPIKE            | VEGFNCYF                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 47.        | ACE2             | KTFLDKFNHEAEDLFY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 48.        | ACE2             | KTFLDKFNHEAEDLFYS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 49.        | ACE2             | KWSAFLKEQSTLAQMY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 50.        | ACE2             | KWSAFLKEQSTLAQMYG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 51.        | ACE2             | NMTQGFWEN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 52.        | ACE2             | TAWDLGK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 53.        | ADGN-100<br>核心基序 | RWRLWRX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> SR<br>X <sub>1</sub> 是 V 或 S, X <sub>2</sub> 是 R、V 或 A, X <sub>3</sub> 是 S 或 L, 并且 X <sub>4</sub> 是 W 或 Y                                                                                                                                                                      |
| 54.        | ADGN-100         | RSX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> RWRLWRX <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> SR<br>X <sub>1</sub> 是 A 或 V, X <sub>2</sub> 是 G 或 L, X <sub>3</sub> 是 W 或 Y, X <sub>4</sub> 是 V 或 S, X <sub>5</sub> 是 R、V 或 A, X <sub>6</sub> 是 S 或 L, 并且 X <sub>7</sub> 是 W 或 Y。                                              |
| 55.        | ADGN-100a        | RSAGWRWRLWRVRSWSR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 56.        | ADGN-100b        | RSALYRWRLWRVRSWSR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 57.        | ADGN-100c        | RSALYRWRLWRSRSWSR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 58.        | ADGN-100d        | RSALYRWRLWRSALYSR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 59.        | ADGN-100         | X <sub>1</sub> KWRSX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> RWRLWRX <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> X <sub>8</sub> SR<br>X <sub>1</sub> 是任何氨基酸或不存在, 并且 X <sub>2</sub> -X <sub>8</sub> 是任何氨基酸                                                                                                                                      |
| 60.        | ADGN-100         | X <sub>1</sub> KWRSX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> RWRLWRX <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> X <sub>8</sub> SR<br>X <sub>1</sub> 是 βA、S 或不存在, X <sub>2</sub> 是 A 或 V, X <sub>3</sub> 是 G 或 L, X <sub>4</sub> 是 W 或 Y, X <sub>5</sub> 是 V 或 S, X <sub>6</sub> 是 R、V 或 A, X <sub>7</sub> 是 S 或 L, 并且 X <sub>8</sub> 是 W 或 Y。 |
| 61.        | ADGN-100a        | KWRSAGWRWRLWRVRSWSR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 62.        | ADGN-100b        | KWRSALYRWRLWRVRSWSR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 63.        | ADGN-100c        | KWRSALYRWRLWRSRSWSR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 64.        | ADGN-100d        | KWRSALYRWRLWRSALYSR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 65.        | ADGN-102<br>核心基序 | RWRLWRWSR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 66.        | ADGN-100-R<br>I  | RSWSRVRWLRWRWGASR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 67.        | ADGN-100-R<br>I  | RSWSRVRWLRWRWGASRWK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

[0567]

| SEQ ID NO. | 描述          | 核苷酸或氨基酸序列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|------------|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 68.        | ADGN-100 aa | RS <sub>s</sub> AGWR <sub>s</sub> WRLWRVRSWSR<br>用下标“S”标记的残基通过烃键联连接                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 69.        | ADGN-100 ab | R <sub>s</sub> SAGWRWR <sub>s</sub> LWRVRSWSR<br>用下标“S”标记的残基通过烃键联连接                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 70.        | ADGN-100 ac | RSAGWR <sub>s</sub> WRLWRVR <sub>s</sub> SWSR<br>用下标“S”标记的残基通过烃键联连接                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 71.        | ADGN-100 ba | RS <sub>s</sub> ALYR <sub>s</sub> WRLWRSRSWSR<br>用下标“S”标记的残基通过烃键联连接                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 72.        | ADGN-100 bb | R <sub>s</sub> SALYRWR <sub>s</sub> LWRSRSWSR<br>用下标“S”标记的残基通过烃键联连接                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 73.        | ADGN-100 bc | RSALYR <sub>s</sub> WRLWRSR <sub>s</sub> SWSR<br>用下标“S”标记的残基通过烃键联连接                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 74.        | ADGN-100 bd | RSALYRWR <sub>s</sub> LWRS <sub>s</sub> RSWSR<br>用下标“S”标记的残基通过烃键联连接                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 75.        | ADGN-100 be | RSALYRWRLWRS <sub>s</sub> RSWS <sub>s</sub> R<br>用下标“S”标记的残基通过烃键联连接                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 76.        | ADGN-100 ca | R <sub>s</sub> SALYRWR <sub>s</sub> LWRSALYSR<br>用下标“S”标记的残基通过烃键联连接                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 77.        | ADGN-100 cb | RS <sub>s</sub> ALYR <sub>s</sub> WRLWRSALYSR<br>用下标“S”标记的残基通过烃键联连接                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 78.        | ADGN-100 cc | RSALYRWR <sub>s</sub> LWRS <sub>s</sub> ALYSR<br>用下标“S”标记的残基通过烃键联连接                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 79.        | ADGN-100 cd | RSALYRWRLWRS <sub>s</sub> ALYS <sub>s</sub> R<br>用下标“S”标记的残基通过烃键联连接                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 80.        | VEPEP-6 1   | LX <sub>1</sub> RALWX <sub>8</sub> LX <sub>2</sub> X <sub>8</sub> X <sub>3</sub> LWX <sub>8</sub> LX <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub><br><br>X <sub>1</sub> 是F或W, X <sub>2</sub> 是L、W、C或I, X <sub>3</sub> 是S、A、N或T, X <sub>4</sub> 是L或W, X <sub>5</sub> 是W或R, X <sub>6</sub> 是K或R, X <sub>7</sub> 是A或不存在, 并且X <sub>8</sub> 是R或S |
| 81.        | VEPEP-6 2   | LX <sub>1</sub> LARWX <sub>8</sub> LX <sub>2</sub> X <sub>8</sub> X <sub>3</sub> LWX <sub>8</sub> LX <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub><br><br>X <sub>1</sub> 是F或W, X <sub>2</sub> 是L、W、C或I, X <sub>3</sub> 是S、A、N或T, X <sub>4</sub> 是L或W, X <sub>5</sub> 是W或R, X <sub>6</sub> 是K或R, X <sub>7</sub> 是A或不存在, 并且X <sub>8</sub> 是R或S |
| 82.        | VEPEP-6 3   | LX <sub>1</sub> ARLWX <sub>8</sub> LX <sub>2</sub> X <sub>8</sub> X <sub>3</sub> LWX <sub>8</sub> LX <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub>                                                                                                                                                                                           |

[0568]

| SEQ ID NO. | 描述         | 核苷酸或氨基酸序列                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|------------|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|            |            | X <sub>1</sub> 是 F 或 W, X <sub>2</sub> 是 L、W、C 或 I, X <sub>3</sub> 是 S、A、N 或 T, X <sub>4</sub> 是 L 或 W, X <sub>5</sub> 是 W 或 R, X <sub>6</sub> 是 K 或 R, X <sub>7</sub> 是 A 或不存在, 并且 X <sub>8</sub> 是 R 或 S                                                                                                     |
| 83.        | VEPEP-6 4  | LX <sub>1</sub> RALWRLX <sub>2</sub> RX <sub>3</sub> LWRLX <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub><br><br>X <sub>1</sub> 是 F 或 W, X <sub>2</sub> 是 L、W、C 或 I, X <sub>3</sub> 是 S、A、N 或 T, X <sub>4</sub> 是 L 或 W, X <sub>5</sub> 是 W 或 R, X <sub>6</sub> 是 K 或 R, 并且 X <sub>7</sub> 是 A 或不存在 |
| 84.        | VEPEP-6 5  | LX <sub>1</sub> RALWRLX <sub>2</sub> RX <sub>3</sub> LWRLX <sub>4</sub> X <sub>5</sub> KX <sub>6</sub><br><br>X <sub>1</sub> 是 F 或 W, X <sub>2</sub> 是 L 或 W, X <sub>3</sub> 是 S、A 或 N, X <sub>4</sub> 是 L 或 W, X <sub>5</sub> 是 W 或 R, X <sub>6</sub> 是 A 或不存在                                                |
| 85.        | VEPEP-6 6  | LFRALWRLRX <sub>1</sub> LWRLWX <sub>2</sub><br><br>X <sub>1</sub> 是 S 或 T, 并且 X <sub>2</sub> 是 K 或 R                                                                                                                                                                                                           |
| 86.        | VEPEP-6 7  | LWRALWRLWRX <sub>1</sub> LWRLWX <sub>2</sub> A<br><br>X <sub>1</sub> 是 S 或 T, 并且 X <sub>2</sub> 是 K 或 R                                                                                                                                                                                                        |
| 87.        | VEPEP-6 8  | LWRALWRLX <sub>3</sub> RX <sub>1</sub> LWRLWRX <sub>2</sub> A<br><br>X <sub>1</sub> 是 S 或 T, X <sub>2</sub> 是 K 或 R, 并且 X <sub>3</sub> 是 L、C 或 I                                                                                                                                                               |
| 88.        | VEPEP-6 9  | LWRALWRLWRX <sub>1</sub> LWRLWRX <sub>2</sub> A<br><br>X <sub>1</sub> 是 S 或 T, 并且 X <sub>2</sub> 是 K 或 R                                                                                                                                                                                                       |
| 89.        | VEPEP-6 10 | LWRALWRLX <sub>1</sub> RALWRLWX <sub>2</sub> A<br><br>X <sub>1</sub> 是 L 或 I, 并且 X <sub>2</sub> 是 K 或 R                                                                                                                                                                                                        |
| 90.        | VEPEP-6 11 | LWRALWRLX <sub>1</sub> RNLWRLWX <sub>2</sub> A<br><br>X <sub>1</sub> 是 L、C 或 I, 并且 X <sub>2</sub> 是 K 或 R                                                                                                                                                                                                      |
| 91.        | VEPEP-6a   | LFRALWRLRSLWRLWK                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

[0569]

| SEQ ID NO. | 描述            | 核苷酸或氨基酸序列                                                              |
|------------|---------------|------------------------------------------------------------------------|
| 92.        | VEPEP-6b      | LWRALWRLWRS LWRLWKA                                                    |
| 93.        | VEPEP-6c      | LWRALWRLLRSLWRLWRKA                                                    |
| 94.        | VEPEP-6d      | LWRALWRLWRS LWRLWRKA                                                   |
| 95.        | VEPEP-6e      | LWRALWRLLRALWRLWKA                                                     |
| 96.        | VEPEP-6f      | LWRALWRLLRNLWRLWKA                                                     |
| 97.        | ADGN-106      | LWRALWRLWRS LWRLWK                                                     |
| 98.        | ADGN-106-R I  | KWLLRWLSRWLRWLARWL                                                     |
| 99.        | ST-VEPEP-6 a  | LFRALWR <sub>s</sub> LLRS <sub>s</sub> LWRLWK<br>后面跟随下标字母“s”的残基通过肽键连接  |
| 100.       | ST-VEPEP-6 aa | LFLARWR <sub>s</sub> LLRS <sub>s</sub> LWRLWK<br>后面跟随下标字母“s”的残基通过肽键连接  |
| 101.       | ST-VEPEP-6 ab | LFRALWS <sub>s</sub> LLRS <sub>s</sub> LWRLWK<br>后面跟随下标字母“s”的残基通过肽键连接  |
| 102.       | ST-VEPEP-6 ad | LFLARWS <sub>s</sub> LLRS <sub>s</sub> LWRLWK<br>后面跟随下标字母“s”的残基通过肽键连接  |
| 103.       | ST-VEPEP-6 b  | LFRALWRLLR <sub>s</sub> SLWS <sub>s</sub> LLWK<br>后面跟随下标字母“s”的残基通过肽键连接 |
| 104.       | ST-VEPEP-6 ba | LFLARWRLLR <sub>s</sub> SLWS <sub>s</sub> LLWK<br>后面跟随下标字母“s”的残基通过肽键连接 |
| 105.       | ST-VEPEP-6 bb | LFRALWRLLS <sub>s</sub> SLWS <sub>s</sub> LLWK<br>后面跟随下标字母“s”的残基通过肽键连接 |
| 106.       | ST-VEPEP-6 bd | LFLARWRLLS <sub>s</sub> SLWS <sub>s</sub> LLWK<br>后面跟随下标字母“s”的残基通过肽键连接 |

[0570]

| SEQ ID NO. | 描述          | 核苷酸或氨基酸序列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------------|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 107.       | ST-VEPEP-6c | LFAR <sub>s</sub> LRLLRS <sub>s</sub> LRLLWK<br>后面跟随下标字母“s”的残基通过烃键连接                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 108.       | VEPEP-9 1   | X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> WWX <sub>4</sub> X <sub>5</sub> WAX <sub>6</sub> X <sub>3</sub> X <sub>7</sub> X <sub>8</sub> X <sub>9</sub> X <sub>10</sub> X <sub>11</sub> X <sub>12</sub> WX <sub>13</sub> R<br><br>X <sub>1</sub> 是β-A、S或不存在，X <sub>2</sub> 是L或不存在，X <sub>3</sub> 是R或不存在，X <sub>4</sub> 是L、R或G，X <sub>5</sub> 是R、W或S，X <sub>6</sub> 是S、P或T，X <sub>7</sub> 是W或P，X <sub>8</sub> 是F、A或R，X <sub>9</sub> 是S、L、P或R，X <sub>10</sub> 是R或S，X <sub>11</sub> 是W或不存在，X <sub>12</sub> 是A、R或不存在，并且X <sub>13</sub> 是W或F，并且其中如果X <sub>3</sub> 不存在，则X <sub>2</sub> 、X <sub>11</sub> 和X <sub>12</sub> 也不存在 |
| 109.       | VEPEP-9 2   | X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> RWWLRWAX <sub>6</sub> RWX <sub>8</sub> X <sub>9</sub> X <sub>10</sub> WX <sub>12</sub> WX <sub>13</sub> R<br><br>X <sub>1</sub> 是β-A、S或不存在，X <sub>2</sub> 是L或不存在，X <sub>6</sub> 是S或P，X <sub>8</sub> 是F或A，X <sub>9</sub> 是S、L或P，X <sub>10</sub> 是R或S，X <sub>12</sub> 是A或R，并且X <sub>13</sub> 是W或F                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 110.       | VEPEP9a1    | X <sub>1</sub> LRWWLRWASRWFSRWAWWR<br><br>X <sub>1</sub> 是β-A、S或不存在                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 111.       | VEPEP9a2    | X <sub>1</sub> LRWWLRWASRWASRWAWFR<br><br>X <sub>1</sub> 是β-A、S或不存在                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 112.       | VEPEP9b1    | X <sub>1</sub> RWWLRWASRWALSWRWWR<br><br>X <sub>1</sub> 是β-A、S或不存在                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 113.       | VEPEP9b2    | X <sub>1</sub> RWWLRWASRWFLSWRWWR<br><br>X <sub>1</sub> 是β-A、S或不存在                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 114.       | VEPEP9c1    | X <sub>1</sub> RWWLRWAPRWFPSRWWR<br><br>X <sub>1</sub> 是β-A、S或不存在                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 115.       | VEPEP9c2    | X <sub>1</sub> RWWLRWASRWAPSWRWWR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

[0571]

| SEQ ID NO. | 描述         | 核苷酸或氨基酸序列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|------------|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|            |            | X <sub>1</sub> 是 $\beta$ -A、S 或不存在                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 116.       | VEPEP-9 3  | X <sub>1</sub> WWX <sub>4</sub> X <sub>5</sub> WAX <sub>6</sub> X <sub>7</sub> X <sub>8</sub> RX <sub>10</sub> WWR<br><br>X <sub>1</sub> 是 $\beta$ -A、S 或不存在, X <sub>4</sub> 是 R 或 G, X <sub>5</sub> 是 W 或 S, X <sub>6</sub> 是 S、T 或 P, X <sub>7</sub> 是 W 或 P, X <sub>8</sub> 是 A 或 R, 并且 X <sub>10</sub> 是 S 或 R                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 117.       | VEPEP9d    | X <sub>1</sub> WWRWWASWARSWWR<br><br>X <sub>1</sub> 是 $\beta$ -A、S 或不存在                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 118.       | VEPEP9e    | X <sub>1</sub> WWGSWATPRRRWWR<br><br>X <sub>1</sub> 是 $\beta$ -A、S 或不存在                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 119.       | VEPEP9f    | X <sub>1</sub> WWRWWAPWARSWWR<br><br>X <sub>1</sub> 是 $\beta$ -A、S 或不存在                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 120.       | VEPEP-9    | ALRWLRLWASRWFSRWAWWR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 121.       | VEPEP-9C   | RWWLRLWASRWFSRWAWR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 122.       | VEPEP-3    | X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> X <sub>3</sub> X <sub>8</sub> X <sub>9</sub> X <sub>10</sub> X <sub>11</sub> X <sub>12</sub> X <sub>13</sub><br>X <sub>1</sub> 是 $\beta$ -A、S 或不存在, X <sub>2</sub> 是 K、R 或 L (彼此独立), X <sub>3</sub> 是 F 或 W (彼此独立), X <sub>4</sub> 是 F、W 或 Y (彼此独立), X <sub>5</sub> 是 E、R 或 S, X <sub>6</sub> 是 R、T 或 S, X <sub>7</sub> 是 E、R 或 S, X <sub>8</sub> 是不存在、F 或 W, X <sub>9</sub> 是 P 或 R, X <sub>10</sub> 是 R 或 L, X <sub>11</sub> 是 K、W 或 R, X <sub>12</sub> 是 R 或 F, 并且 X <sub>13</sub> 是 R 或 K |
| 123.       | VEPEP-3 1  | X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> WX <sub>4</sub> EX <sub>2</sub> WX <sub>4</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> X <sub>3</sub> PRX <sub>11</sub> RX <sub>13</sub><br>X <sub>1</sub> 是 $\beta$ -A、S 或不存在, X <sub>2</sub> 是 K、R 或 L, X <sub>3</sub> 是 F 或 W, X <sub>4</sub> 是 F、W 或 Y, X <sub>5</sub> 是 E、R 或 S, X <sub>6</sub> 是 R、T 或 S, X <sub>7</sub> 是 E、R 或 S, X <sub>8</sub> 是不存在、F 或 W, X <sub>9</sub> 是 P 或 R, X <sub>10</sub> 是 R 或 L, X <sub>11</sub> 是 K、W 或 R, X <sub>12</sub> 是 R 或 F, 并且 X <sub>13</sub> 是 R 或 K                                                                                                                           |
| 124.       | VEPEP-3 1a | X <sub>1</sub> KWFERWFREWPRKRR<br>X <sub>1</sub> 是 $\beta$ -A、S 或不存在                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 125.       | VEPEP-3 1b | X <sub>1</sub> KWWERWWREWPRKRR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

[0572]

| SEQ ID NO. | 描述         | 核苷酸或氨基酸序列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|------------|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|            |            | X <sub>1</sub> 是 $\beta$ -A、S 或不存在                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 126.       | VEPEP-3 1c | X <sub>1</sub> KWWERWWREWPRKRR<br>X <sub>1</sub> 是 $\beta$ -A、S 或不存在                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 127.       | VEPEP-3 1d | X <sub>1</sub> RWWEKWWTRWPRKRR<br>X <sub>1</sub> 是 $\beta$ -A、S 或不存在                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 128.       | VEPEP-3 1e | X <sub>1</sub> RWYEKWYTEFPRRRR<br>X <sub>1</sub> 是 $\beta$ -A、S 或不存在                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 129.       | VEPEP-3 1S | X <sub>1</sub> KX <sub>14</sub> WWERWWRX <sub>14</sub> WPRKRR<br>X <sub>1</sub> 是 $\beta$ -A、S 或不存在, 并且 X <sub>14</sub> 是非天然氨基酸, 并且其中在两个非天然氨基酸之间存在炔键联。                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 130.       | VEPEP-3 2  | X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> WX <sub>5</sub> X <sub>10</sub> X <sub>3</sub> WX <sub>6</sub> X <sub>7</sub> WX <sub>8</sub> X <sub>9</sub> X <sub>10</sub> WX <sub>12</sub><br>R<br>X <sub>1</sub> 是 $\beta$ -A、S 或不存在, X <sub>2</sub> 是 K、R 或 L, X <sub>3</sub> 是 F 或 W, X <sub>5</sub> 是 R 或 S, X <sub>6</sub> 是 R 或 S, X <sub>7</sub> 是 R 或 S, X <sub>8</sub> 是 F 或 W, X <sub>9</sub> 是 R 或 P, X <sub>10</sub> 是 L 或 R, 并且 X <sub>12</sub> 是 R 或 F |
| 131.       | VEPEP-3 2a | X <sub>1</sub> RWWRLWWRSWFRLWRR<br>X <sub>1</sub> 是 $\beta$ -A、S 或不存在                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 132.       | VEPEP-3 2b | X <sub>1</sub> LWWRRWWSRWWPRWRR<br>X <sub>1</sub> 是 $\beta$ -A、S 或不存在                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 133.       | VEPEP-3 2c | X <sub>1</sub> LWWSRWWRSWFRLWFR<br>X <sub>1</sub> 是 $\beta$ -A、S 或不存在                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 134.       | VEPEP-3 2d | X <sub>1</sub> KFWSRFWRSWFRLWRR<br>X <sub>1</sub> 是 $\beta$ -A、S 或不存在                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 135.       | VEPEP-3 2S | X <sub>1</sub> RWWX <sub>14</sub> LWWRSWX <sub>14</sub> RLWRR<br><br>X <sub>1</sub> 是 $\beta$ -丙氨酸、丝氨酸或不存在, 并且 X <sub>14</sub> 是非天然氨基酸, 并且其中在两个非天然氨基酸之间存在炔键联。                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 136.       | VEPEP-3a   | AKWFERWFREWPRKRR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 137.       | VEPEP-3b   | AKWWERWWREWPRKRR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 138.       | VEPEP-4    | XWXRLXXXXXX<br>位置 1 中的 X 是 $\beta$ -A、S 或不存在; 位置 3、9 和 10 中的 X 彼此独立地是 W 或 F; 如果位置 8 中的 X 为 S 时, 则位置 6 中的 X 为 R, 并且如果位置 8 中的 X 为 R 时,                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

[0573]

| SEQ ID NO. | 描述              | 核苷酸或氨基酸序列                                                                                   |
|------------|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
|            |                 | 则位置 6 中的 X 为 S; 位置 7 中的 X 为 L 或不存在; 如果位置 11 中的 X 不存在, 则位置 11 中的 X 为 R 或不存在, 且位置 7 中的 X 为 L。 |
| 139.       | VEPEP-4         | X <sub>1</sub> WWRLSLRWW<br>X <sub>1</sub> 是 $\beta$ -A、S 或不存在                              |
| 140.       | VEPEP-4         | X <sub>1</sub> WFRLSLRFWR<br>X <sub>1</sub> 是 $\beta$ -A、S 或不存在                             |
| 141.       | VEPEP-4         | X <sub>1</sub> WWRLRSWFR<br>X <sub>1</sub> 是 $\beta$ -A、S 或不存在                              |
| 142.       | VEPEP-4         | X <sub>1</sub> WFRLSLRFW<br>X <sub>1</sub> 是 $\beta$ -A、S 或不存在                              |
| 143.       | VEPEP-5         | RXWXRLWXRLR<br>位置 2 中的 X 为 R 或 S; 并且位置 4 和 8 中的 X 彼此独立地为 W 或 F                              |
| 144.       | VEPEP-5         | X <sub>1</sub> WWRLWWRLR<br>X <sub>1</sub> 是 $\beta$ -A、S 或不存在                              |
| 145.       | VEPEP-5         | X <sub>1</sub> WFRLWFRLR<br>X <sub>1</sub> 是 $\beta$ -A、S 或不存在                              |
| 146.       | VEPEP-5         | X <sub>1</sub> WFRLWWRLR<br>X <sub>1</sub> 是 $\beta$ -A、S 或不存在                              |
| 147.       | VEPEP-5         | X <sub>1</sub> WWRLWFRLR<br>X <sub>1</sub> 是 $\beta$ -A、S 或不存在                              |
| 148.       | VEPEP-5         | X <sub>1</sub> RWWRLWWRL<br>X <sub>1</sub> 是 $\beta$ -A、S 或不存在                              |
| 149.       | VEPEP-5         | X <sub>1</sub> RSWFRLWFR<br>X <sub>1</sub> 是 $\beta$ -A、S 或不存在                              |
| 150.       | CADY            | GLWRALWRLLRSLWRLWLV                                                                         |
| 151.       | LNCOV-10<br>环状肽 | S*KVGGNYNYLY*R<br>*环化位点                                                                     |
| 152.       | LNCOV-11<br>环状肽 | K*VGGNYNYK*<br>*环化位点                                                                        |
| 153.       | LNCOV-12<br>环状肽 | G*NINYLYRL*<br>*环化位点                                                                        |
| 154.       | LNCOV-22<br>环状肽 | G*NINYLYRLFK*<br>*环化位点                                                                      |
| 155.       | LNCOV-17        | T*EYQAGSTK*                                                                                 |

[0574]

| SEQ ID NO. | 描述              | 核苷酸或氨基酸序列                     |
|------------|-----------------|-------------------------------|
|            | 环状肽             | *环化位点                         |
| 156.       | LNCOV-15<br>环状肽 | N*GVEGFNK*<br>*环化位点           |
| 157.       | LNCOV-16<br>环状肽 | V*EGFNCYF*<br>*环化位点           |
| 158.       | LNCOV-24<br>环状肽 | S*YGFQPTNGV*<br>*环化位点         |
| 159.       | LNCOV-13<br>环状肽 | G*FQPTNGVK*<br>*环化位点          |
| 160.       | LNCOV-14<br>环状肽 | T*NGVGYPYK*<br>*环化位点          |
| 161.       | DIVC-1          | GCAACTGAGGGAGCCTTGAAT         |
| 162.       | DIVC-2          | GACCAGGAATAATCAGACAA          |
| 163.       | DIVC-3          | GACAAGGCGTTCCAATTAACA         |
| 164.       | DIVC-4          | GACTTCCCTATGGTGCTAACA         |
| 165.       | DIVC-5          | GGCTGATGAAACTCAAGCCTT         |
| 166.       | DIVC-6          | GGCCAAACTGTCACTAAGAAA         |
| 167.       | DIVC-7          | GCAGACGTGGTCCAGAACAAA         |
| 168.       | DIVC-8          | GCCTCTTCTCGTTCCTCATCA         |
| 169.       | DIVC-9          | AAGCATATTGACGCATACAAA         |
| 170.       | DIVC-10         | GCAACAATCCATGAGCAGTGC         |
| 171.       | DIVC-31         | GGTGAAATCAAGGATGCTACT         |
| 172.       | DIVC-32         | GTGTAACCTTCTTCAATTGTCA        |
| 173.       | DIVC-33         | CAAGTCCTATTTCTGAACATG         |
| 174.       | DIVC-34         | GAACATGTTACCTTCTTCATC         |
| 175.       | DIVC-35         | TGCAGAGTATAAACTTTGTAA         |
| 176.       | DIVC-81         | GTTGATGACCCGTGTCCTATT         |
| 177.       | DIVC-82         | GACCCGTGTCCTATTCACTTC         |
| 178.       | DIVC-83         | GTGGATGAGGCTGGTTCTAAA         |
| 179.       | DIVC-84         | GCGTTGTTCTGTTCTATGAAGA        |
| 180.       | DIVC-85         | GTCCTATTCACTTCTATTCTA         |
| 181.       | PEP-1           | KETWWETWWTEWSQPKKKRKV         |
| 182.       | PEP-2           | KETWFETWFTEWSQPKKKRKV         |
| 183.       | PEP-3           | KWFETWFTEWPKKRK               |
| 184.       | MPG             | GALFLGLGAAGSTMGAWSQPKKR<br>KV |
| 185.       | 靶向肽             | YIGSR                         |
| 186.       | 接头              | GGGGS                         |

[0575]

| SEQ<br>ID<br>NO. | 描述       | 核苷酸或氨基酸序列                                                 |
|------------------|----------|-----------------------------------------------------------|
| 187.             | 接头       | SGGGG                                                     |
| 188.             | LNCOV-33 | Ac- IEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQS-A<br>hx-RSAGWRWRLWRVRSWSR-NH2 |

## 序列表

<110> 阿迪根有限公司(AADIGEN, LLC)  
<120> 用于治疗病毒感染的组合物和方法  
<130> 73737-20013.41  
<140> 尚未分配  
<141> 同时随同提交  
<150> FR2007849  
<151> 2020-07-24  
<160> 188  
<170> FastSEQ for Windows Version 4.0  
<210> 1  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 1  
Ser Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg  
1 5 10  
<210> 2  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 2  
Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu  
1 5  
<210> 3  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 3  
Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu  
1 5  
<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 4

Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys

1 5 10

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 5

Ser Thr Glu Tyr Gln Ala Gly Ser Thr

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 6

Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 7

Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe Pro

1 5

<210> 8

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 8

Tyr Phe Pro Leu Gln Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly

1 5 10 15

Tyr Gln

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 9

Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val

1 5 10

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 10

Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Lys

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 11

Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr

1 5

<210> 12

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、11、12、30

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 12

Ser Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Trp Arg Ala

1 5 10 15

Leu Trp Arg Leu Trp Arg Ser Leu Trp Arg Leu Leu Trp Lys

20 25 30

<210> 13

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、9、27

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 13

Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg

1 5 10 15

Leu Trp Arg Ser Leu Trp Arg Leu Leu Trp Lys

20 25

<210> 14

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、9、27

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 14

Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg

1 5 10 15

Leu Trp Arg Ser Leu Trp Arg Leu Leu Trp Lys

20 25

<210> 15

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、11、29

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 15

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Asn | Tyr | Asn | Tyr | Leu | Tyr | Arg | Leu | Phe | Lys | Leu | Trp | Arg | Ala | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Trp | Arg | Leu | Trp | Arg | Ser | Leu | Trp | Arg | Leu | Leu | Trp | Lys |     |     |     |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 16

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、9、27

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 16

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Glu | Tyr | Gln | Ala | Gly | Ser | Thr | Lys | Leu | Trp | Arg | Ala | Leu | Trp | Arg |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Leu | Trp | Arg | Ser | Leu | Trp | Arg | Leu | Leu | Trp | Lys |     |     |     |     |     |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 17

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、8、26

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 17

Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Lys Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu

1 5 10 15

Trp Arg Ser Leu Trp Arg Leu Leu Trp Lys

20 25

<210> 18

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、8、26

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 18

Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu

1 5 10 15

Trp Arg Ser Leu Trp Arg Leu Leu Trp Lys

20 25

<210> 19

<211> 36

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、18、36

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 19

Tyr Phe Pro Leu Gln Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly

1 5 10 15

Tyr Gln Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Trp Arg Ser Leu Trp Arg

20 25 30

Leu Leu Trp Lys

35

<210> 20

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、10、28

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 20

Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Leu Trp Arg Ala Leu Trp

1 5 10 15

Arg Leu Trp Arg Ser Leu Trp Arg Leu Leu Trp Lys

20 25

<210> 21

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、9、27

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 21

Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Lys Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg

1 5 10 15

Leu Trp Arg Ser Leu Trp Arg Leu Leu Trp Lys

20 25

<210> 22

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、10、28

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 22

Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr Lys Leu Trp Arg Ala Leu Trp  
1                    5                    10                    15  
Arg Leu Trp Arg Ser Leu Trp Arg Leu Leu Trp Lys  
                  20                    25

<210> 23

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 23

Ile Glu Glu Gln Ala Lys Thr Phe Leu Asp Lys Phe Asn His Glu Ala  
1                    5                    10                    15  
Glu Asp Leu Phe Tyr Gln Ser  
                  20

<210> 24

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 24

Glu Gln Ala Lys Thr Phe Leu Asp Lys Phe Asn His Glu Ala Glu Asp  
1                    5                    10                    15  
Leu Phe

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 25

Lys Thr Phe Leu Asp Lys Phe Asn His Glu Ala Glu Asp Leu Phe

1 5 10 15

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 26

Lys Thr Phe Leu Asp Lys Phe Asn His Glu Ala Glu Asp Leu Phe Tyr

1 5 10 15

Ser

<210> 27

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 27

Glu Gln Ala Lys Thr Phe Leu Asp Lys Phe Asn His Glu Ala Glu Asp

1 5 10 15

Leu Phe Lys Trp Ser Ala Phe Leu Lys Glu Gln Ser Thr Leu Ala Gln

20 25 30

Met Tyr Gly

35

<210> 28

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 28

Lys Thr Phe Leu Asp Lys Phe Asn His Glu Ala Glu Asp Leu Phe Pro

1 5 10 15

Gly Lys Trp Ser Ala Phe Leu Lys Glu Gln Ser Thr Leu Ala Gln Met

20 25 30

Tyr Gly

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 29

Thr Ala Trp Asp Leu Gly Lys Gly Asp Phe Arg Ile

1 5 10

<210> 30

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 30

Asn Met Thr Gln Gly Phe Trp Glu Asn Ser Met Leu Thr Asp

1 5 10

<210> 31

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 31

Asn Met Thr Gln Gly Phe Trp Glu Asn Pro Gly Gly Pro Thr Ala Trp

1 5 10 15

Asp Leu Gly Lys

20

<210> 32

<211> 41

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、23、41

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 32

Ile Glu Glu Gln Ala Lys Thr Phe Leu Asp Lys Phe Asn His Glu Ala

1 5 10 15

Glu Asp Leu Phe Tyr Gln Ser Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Trp

20 25 30

Arg Ser Leu Trp Arg Leu Leu Trp Lys

35 40

<210> 33

<211> 36

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、18、36

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 33

Glu Gln Ala Lys Thr Phe Leu Asp Lys Phe Asn His Glu Ala Glu Asp  
1                      5                      10                      15  
Leu Phe Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Trp Arg Ser Leu Trp Arg  
                    20                      25                      30  
Leu Leu Trp Lys  
                    35

<210> 34

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、15、33

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 34

Lys Thr Phe Leu Asp Lys Phe Asn His Glu Ala Glu Asp Leu Phe Leu  
1                      5                      10                      15  
Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Trp Arg Ser Leu Trp Arg Leu Leu Trp  
                    20                      25                      30  
Lys

<210> 35

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、17、35

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 35

Lys Thr Phe Leu Asp Lys Phe Asn His Glu Ala Glu Asp Leu Phe Tyr

1 5 10 15

Ser Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Trp Arg Ser Leu Trp Arg Leu

20 25 30

Leu Trp Lys

35

<210> 36

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、12、30

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 36

Thr Ala Trp Asp Leu Gly Lys Gly Asp Phe Arg Ile Leu Trp Arg Ala

1 5 10 15

Leu Trp Arg Leu Trp Arg Ser Leu Trp Arg Leu Leu Trp Lys

20 25 30

<210> 37

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、14、32

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 37

Asn Met Thr Gln Gly Phe Trp Glu Asn Ser Met Leu Thr Asp Leu Trp

1 5 10 15

Arg Ala Leu Trp Arg Leu Trp Arg Ser Leu Trp Arg Leu Leu Trp Lys

20 25 30

<210> 38

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、20、38

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 38

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | Met | Thr | Gln | Gly | Phe | Trp | Glu | Asn | Pro | Gly | Gly | Pro | Thr | Ala | Trp |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Asp | Leu | Gly | Lys | Leu | Trp | Arg | Ala | Leu | Trp | Arg | Leu | Trp | Arg | Ser | Leu |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Trp | Arg | Leu | Leu | Trp | Lys |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     | 35  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 39

<211> 53

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、35、53

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 39

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Gln | Ala | Lys | Thr | Phe | Leu | Asp | Lys | Phe | Asn | His | Glu | Ala | Glu | Asp |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Leu | Phe | Lys | Trp | Ser | Ala | Phe | Leu | Lys | Glu | Gln | Ser | Thr | Leu | Ala | Gln |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Met | Tyr | Gly | Leu | Trp | Arg | Ala | Leu | Trp | Arg | Leu | Trp | Arg | Ser | Leu | Trp |
|     |     |     | 35  |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Arg | Leu | Leu | Trp | Lys |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     | 50  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 40

<211> 50

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、32、50

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 40

```
Lys Thr Phe Leu Asp Lys Phe Asn His Glu Ala Glu Asp Leu Phe Lys
1           5           10           15
Trp Ser Ala Phe Leu Lys Glu Gln Ser Thr Leu Ala Gln Met Tyr Gly
           20           25           30
Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Trp Arg Ser Leu Trp Arg Leu Leu
           35           40           45
Trp Lys
           50
```

<210> 41

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、18、35

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 41

```
Glu Gln Ala Lys Thr Phe Leu Asp Lys Phe Asn His Glu Ala Glu Asp
1           5           10           15
Leu Phe Arg Ser Ala Gly Trp Arg Trp Arg Leu Trp Arg Val Arg Ser
           20           25           30
Trp Ser Arg
           35
```

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 42

```
Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr
```

1 5  
<210> 43  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 43  
Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe  
1 5 10  
<210> 44  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 44  
Thr Glu Tyr Gln Ala Gly Ser Thr  
1 5  
<210> 45  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 45  
Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn  
1 5  
<210> 46  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 46  
Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe  
1 5  
<210> 47  
<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 47

Lys Thr Phe Leu Asp Lys Phe Asn His Glu Ala Glu Asp Leu Phe Tyr

1

5

10

15

<210> 48

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 48

Lys Thr Phe Leu Asp Lys Phe Asn His Glu Ala Glu Asp Leu Phe Tyr

1

5

10

15

Ser

<210> 49

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 49

Lys Trp Ser Ala Phe Leu Lys Glu Gln Ser Thr Leu Ala Gln Met Tyr

1

5

10

15

<210> 50

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 50

Lys Trp Ser Ala Phe Leu Lys Glu Gln Ser Thr Leu Ala Gln Met Tyr

1

5

10

15

Gly

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 51

Asn Met Thr Gln Gly Phe Trp Glu Asn

1 5

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 52

Thr Ala Trp Asp Leu Gly Lys

1 5

<210> 53

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 7

<223> Xaa = V或S

<220>

<221> 变体

<222> 8

<223> Xaa = R、V或A

<220>

<221> 变体

<222> 9

<223> Xaa = S或L

<220>

<221> 变体

<222> 10

<223> Xaa = W或Y

<400> 53

Arg Trp Arg Leu Trp Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Arg

| 1                                                               | 5 | 10 |
|-----------------------------------------------------------------|---|----|
| <210> 54                                                        |   |    |
| <211> 17                                                        |   |    |
| <212> PRT                                                       |   |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |   |    |
| <220>                                                           |   |    |
| <223> 合成构建体                                                     |   |    |
| <220>                                                           |   |    |
| <221> 变体                                                        |   |    |
| <222> 3                                                         |   |    |
| <223> Xaa = A或V                                                 |   |    |
| <220>                                                           |   |    |
| <221> 变体                                                        |   |    |
| <222> 4                                                         |   |    |
| <223> Xaa = G或L                                                 |   |    |
| <220>                                                           |   |    |
| <221> 变体                                                        |   |    |
| <222> 5                                                         |   |    |
| <223> Xaa = W或Y                                                 |   |    |
| <220>                                                           |   |    |
| <221> 变体                                                        |   |    |
| <222> 12                                                        |   |    |
| <223> Xaa = V或S                                                 |   |    |
| <220>                                                           |   |    |
| <221> 变体                                                        |   |    |
| <222> 13                                                        |   |    |
| <223> Xaa = R、V或A                                               |   |    |
| <220>                                                           |   |    |
| <221> 变体                                                        |   |    |
| <222> 14                                                        |   |    |
| <223> Xaa = S或L                                                 |   |    |
| <220>                                                           |   |    |
| <221> 变体                                                        |   |    |
| <222> 15                                                        |   |    |
| <223> Xaa = W或Y                                                 |   |    |
| <400> 54                                                        |   |    |
| Arg Ser Xaa Xaa Xaa Arg Trp Arg Leu Trp Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Ser |   |    |
| 1                                                               | 5 | 10 |
| Arg                                                             |   | 15 |

<210> 55

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 55

Arg Ser Ala Gly Trp Arg Trp Arg Leu Trp Arg Val Arg Ser Trp Ser

1 5 10 15

Arg

<210> 56

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 56

Arg Ser Ala Leu Tyr Arg Trp Arg Leu Trp Arg Val Arg Ser Trp Ser

1 5 10 15

Arg

<210> 57

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 57

Arg Ser Ala Leu Tyr Arg Trp Arg Leu Trp Arg Ser Arg Ser Trp Ser

1 5 10 15

Arg

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 58

Arg Ser Ala Leu Tyr Arg Trp Arg Leu Trp Arg Ser Ala Leu Tyr Ser

1 5 10 15

$\langle 220 \rangle$

<221> 变体

<222> 8

<223> Xaa = W或Y

<220>

<221> 变体

<222> 15

<223> Xaa = V或S

<220>

<221> 变体

<222> 16

<223> Xaa = R、V或A

<220>

<221> 变体

<222> 17

<223> Xaa = S或L

<220>

<221> 变体

<222> 18

<223> Xaa = W或Y

<400> 60

Xaa Lys Trp Arg Ser Xaa Xaa Xaa Arg Trp Arg Leu Trp Arg Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa Xaa Ser Arg

20

<210> 61

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 61

Lys Trp Arg Ser Ala Gly Trp Arg Trp Arg Leu Trp Arg Val Arg Ser

1 5 10 15

Trp Ser Arg

<210> 62

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 62

Lys Trp Arg Ser Ala Leu Tyr Arg Trp Arg Leu Trp Arg Val Arg Ser

1 5 10 15

Trp Ser Arg

<210> 63

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 63

Lys Trp Arg Ser Ala Leu Tyr Arg Trp Arg Leu Trp Arg Ser Arg Ser

1 5 10 15

Trp Ser Arg

<210> 64

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 64

Lys Trp Arg Ser Ala Leu Tyr Arg Trp Arg Leu Trp Arg Ser Ala Leu

1 5 10 15

Tyr Ser Arg

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 65

Arg Trp Arg Leu Trp Arg Trp Ser Arg

1 5

<210> 66

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 66

Arg Ser Trp Ser Arg Val Arg Trp Leu Arg Trp Arg Trp Gly Ala Ser

1 5 10 15

Arg

<210> 67

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 67

Arg Ser Trp Ser Arg Val Arg Trp Leu Arg Trp Arg Trp Gly Ala Ser

1 5 10 15

Arg Trp Lys

<210> 68

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 2、6

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 68

Arg Ser Ala Gly Trp Arg Trp Arg Leu Trp Arg Val Arg Ser Trp Ser

1 5 10 15

Arg

<210> 69

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、8

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 69

Arg Ser Ala Gly Trp Arg Trp Arg Leu Trp Arg Val Arg Ser Trp Ser  
1 5 10 15

Arg

<210> 70

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 6、13

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 70

Arg Ser Ala Gly Trp Arg Trp Arg Leu Trp Arg Val Arg Ser Trp Ser  
1 5 10 15

Arg

<210> 71

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 2、6

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 71

Arg Ser Ala Leu Tyr Arg Trp Arg Leu Trp Arg Ser Arg Ser Trp Ser  
1 5 10 15

Arg

<210> 72

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、8

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 72

Arg Ser Ala Leu Tyr Arg Trp Arg Leu Trp Arg Ser Arg Ser Trp Ser

1                      5                      10                      15

Arg

<210> 73

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 6、13

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 73

Arg Ser Ala Leu Tyr Arg Trp Arg Leu Trp Arg Ser Arg Ser Trp Ser

1                      5                      10                      15

Arg

<210> 74

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 8、12

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 74

Arg Ser Ala Leu Tyr Arg Trp Arg Leu Trp Arg Ser Arg Ser Trp Ser

1                      5                      10                      15

Arg

<210> 75

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 12、16

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 75

Arg Ser Ala Leu Tyr Arg Trp Arg Leu Trp Arg Ser Arg Ser Trp Ser

1 5 10 15

Arg

<210> 76

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、8

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 76

Arg Ser Ala Leu Tyr Arg Trp Arg Leu Trp Arg Ser Ala Leu Tyr Ser

1 5 10 15

Arg

<210> 77

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 2、6

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 77

Arg Ser Ala Leu Tyr Arg Trp Arg Leu Trp Arg Ser Ala Leu Tyr Ser

1 5 10 15

Arg

<210> 78

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 8,12

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 78

Arg Ser Ala Leu Tyr Arg Trp Arg Leu Trp Arg Ser Ala Leu Tyr Ser

1

5

10

15

Arg

<210> 79

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 12,16

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 79

Arg Ser Ala Leu Tyr Arg Trp Arg Leu Trp Arg Ser Ala Leu Tyr Ser

1

5

10

15

Arg

<210> 80

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 2

<223> Xaa = F或W

<220>

<221> 变体

Leu Xaa Arg Ala Leu Trp Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Leu Trp Xaa Leu Xaa  
1 5 10 15  
Xaa Xaa Xaa  
<210> 81

<211> 19  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<220>  
<221> 变体  
<222> 2  
<223> Xaa = F或W  
<220>  
<221> 变体  
<222> 7  
<223> Xaa = R或S  
<220>  
<221> 变体  
<222> 9  
<223> Xaa = L、W、C或I  
<220>  
<221> 变体  
<222> 10  
<223> Xaa = R或S  
<220>  
<221> 变体  
<222> 11  
<223> Xaa = S、A、N或T  
<220>  
<221> 变体  
<222> 14  
<223> Xaa = R或S  
<220>  
<221> 变体  
<222> 16  
<223> Xaa = L或W  
<220>  
<221> 变体  
<222> 17  
<223> Xaa = W或R  
<220>  
<221> 变体

112

<223> Xaa = R或S

<220>

<221> 变体

<222> 16

<223> Xaa = L或W

<220>

<221> 变体

<222> 17

<223> Xaa = W或R

<220>

<221> 变体

<222> 18

<223> Xaa = K或R

<220>

<221> 变体

<222> 19

<223> Xaa = A或不存在

<400> 82

Leu Xaa Ala Arg Leu Trp Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Leu Trp Xaa Leu Xaa

1

5

10

15

Xaa Xaa Xaa

<210> 83

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 2

<223> Xaa = F或W

<220>

<221> 变体

<222> 9

<223> Xaa = L、W、C或I

<220>

<221> 变体

<222> 11

<223> Xaa = S、A、N或T

<220>  
<221> 变体  
<222> 16  
<223> Xaa = L或W  
<220>  
<221> 变体  
<222> 17  
<223> Xaa = W或R  
<220>  
<221> 变体  
<222> 18  
<223> Xaa = K或R  
<220>  
<221> 变体  
<222> 19  
<223> Xaa = A或不存在  
<400> 83  
Leu Xaa Arg Ala Leu Trp Arg Leu Xaa Arg Xaa Leu Trp Arg Leu Xaa  
1                      5                      10                      15  
Xaa Xaa Xaa  
<210> 84  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<220>  
<221> 变体  
<222> 2  
<223> Xaa = F或W  
<220>  
<221> 变体  
<222> 9  
<223> Xaa = L或W  
<220>  
<221> 变体  
<222> 11  
<223> Xaa = S、A或N  
<220>

<221> 变体

<222> 16

<223> Xaa = L或W

<220>

<221> 变体

<222> 17

<223> Xaa = W或R

<220>

<221> 变体

<222> 19

<223> Xaa = A或不存在

<400> 84

Leu Xaa Arg Ala Leu Trp Arg Leu Xaa Arg Xaa Leu Trp Arg Leu Xaa

1 5 10 15

Xaa Lys Xaa

<210> 85

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 11

<223> Xaa = S或T

<220>

<221> 变体

<222> 18

<223> Xaa = K或R

<400> 85

Leu Phe Arg Ala Leu Trp Arg Leu Leu Arg Xaa Leu Trp Arg Leu Leu

1 5 10 15

Trp Xaa

<210> 86

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 11

<223> Xaa = S或T

<220>

<221> 变体

<222> 18

<223> Xaa = K或R

<400> 86

Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Trp Arg Xaa Leu Trp Arg Leu Leu

1                      5                      10                      15

Trp Xaa Ala

<210> 87

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 9

<223> Xaa = L、C或I

<220>

<221> 变体

<222> 11

<223> Xaa = S或T

<220>

<221> 变体

<222> 18

<223> Xaa = K或R

<400> 87

Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Xaa Arg Xaa Leu Trp Arg Leu Trp

1                      5                      10                      15

Arg Xaa Ala

<210> 88

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

## 〈221〉 变体

<222> 9

<223> Xaa = L、C或I

<220>

<221> 变体

<222> 18

<223> Xaa = K或R

<400> 90

Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Xaa Arg Asn Leu Trp Arg Leu Leu

1                      5                      10                      15

Trp Xaa Ala

<210> 91

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 91

Leu Phe Arg Ala Leu Trp Arg Leu Leu Arg Ser Leu Trp Arg Leu Leu

1                      5                      10                      15

Trp Lys

<210> 92

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 92

Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Trp Arg Ser Leu Trp Arg Leu Leu

1                      5                      10                      15

Trp Lys Ala

<210> 93

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 93

Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Leu Arg Ser Leu Trp Arg Leu Trp

1                      5                      10                      15

Arg Lys Ala

<210> 94

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 94

Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Trp Arg Ser Leu Trp Arg Leu Trp

1 5 10 15

Arg Lys Ala

<210> 95

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 95

Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Leu Arg Ala Leu Trp Arg Leu Leu

1 5 10 15

Trp Lys Ala

<210> 96

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 96

Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Leu Arg Asn Leu Trp Arg Leu Leu

1 5 10 15

Trp Lys Ala

<210> 97

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 97

Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Trp Arg Ser Leu Trp Arg Leu Leu

|                                                                 |   |    |    |
|-----------------------------------------------------------------|---|----|----|
| 1                                                               | 5 | 10 | 15 |
| Trp Lys                                                         |   |    |    |
| <210> 98                                                        |   |    |    |
| <211> 18                                                        |   |    |    |
| <212> PRT                                                       |   |    |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |   |    |    |
| <220>                                                           |   |    |    |
| <223> 合成构建体                                                     |   |    |    |
| <400> 98                                                        |   |    |    |
| Lys Trp Leu Leu Arg Trp Leu Ser Arg Trp Leu Arg Trp Leu Ala Arg |   |    |    |
| 1                                                               | 5 | 10 | 15 |
| Trp Leu                                                         |   |    |    |
| <210> 99                                                        |   |    |    |
| <211> 18                                                        |   |    |    |
| <212> PRT                                                       |   |    |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |   |    |    |
| <220>                                                           |   |    |    |
| <223> 合成构建体                                                     |   |    |    |
| <220>                                                           |   |    |    |
| <221> 变体                                                        |   |    |    |
| <222> 7、11                                                      |   |    |    |
| <223> 如说明书的序列表中所示的修饰                                            |   |    |    |
| <400> 99                                                        |   |    |    |
| Leu Phe Arg Ala Leu Trp Arg Leu Leu Arg Ser Leu Trp Arg Leu Leu |   |    |    |
| 1                                                               | 5 | 10 | 15 |
| Trp Lys                                                         |   |    |    |
| <210> 100                                                       |   |    |    |
| <211> 18                                                        |   |    |    |
| <212> PRT                                                       |   |    |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |   |    |    |
| <220>                                                           |   |    |    |
| <223> 合成构建体                                                     |   |    |    |
| <220>                                                           |   |    |    |
| <221> 变体                                                        |   |    |    |
| <222> 7、11                                                      |   |    |    |
| <223> 如说明书的序列表中所示的修饰                                            |   |    |    |
| <400> 100                                                       |   |    |    |
| Leu Phe Leu Ala Arg Trp Arg Leu Leu Arg Ser Leu Trp Arg Leu Leu |   |    |    |
| 1                                                               | 5 | 10 | 15 |

Trp Lys

<210> 101

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 7、11

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 101

Leu Phe Arg Ala Leu Trp Ser Leu Leu Arg Ser Leu Trp Arg Leu Leu

1 5 10 15

Trp Lys

<210> 102

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 7、11

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 102

Leu Phe Leu Ala Arg Trp Ser Leu Leu Arg Ser Leu Trp Arg Leu Leu

1 5 10 15

Trp Lys

<210> 103

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 10、14

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 103

Leu Phe Arg Ala Leu Trp Arg Leu Leu Arg Ser Leu Trp Ser Leu Leu

1

5

10

15

Trp Lys

<210> 104

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 10、14

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 104

Leu Phe Leu Ala Arg Trp Arg Leu Leu Arg Ser Leu Trp Ser Leu Leu

1

5

10

15

Trp Lys

<210> 105

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 10、14

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 105

Leu Phe Arg Ala Leu Trp Arg Leu Leu Ser Ser Leu Trp Ser Leu Leu

1

5

10

15

Trp Lys

<210> 106

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 10、14

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 106

Leu Phe Leu Ala Arg Trp Arg Leu Leu Ser Ser Leu Trp Ser Leu Leu

1

5

10

15

Trp Lys

<210> 107

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 4、11

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 107

Leu Phe Ala Arg Leu Trp Arg Leu Leu Arg Ser Leu Trp Arg Leu Leu

1

5

10

15

Trp Lys

<210> 108

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在

<220>

<221> 变体

<222> 2

<223> Xaa = L或不存在

<220>

<221> 变体

<222> 3

<223> Xaa = R或不存在

<220>  
<221> 变体  
<222> 6  
<223> Xaa = L、R或G  
<220>  
<221> 变体  
<222> 7  
<223> Xaa = R、W或S  
<220>  
<221> 变体  
<222> 10  
<223> Xaa = S、P或T  
<220>  
<221> 变体  
<222> 11  
<223> Xaa = R或不存在  
<220>  
<221> 变体  
<222> 12  
<223> Xaa = W或P  
<220>  
<221> 变体  
<222> 13  
<223> Xaa = F、A或R  
<220>  
<221> 变体  
<222> 14  
<223> Xaa = S、L、P或R  
<220>  
<221> 变体  
<222> 15  
<223> Xaa = R或S  
<220>  
<221> 变体  
<222> 16  
<223> Xaa = W或不存在  
<220>  
<221> 变体  
<222> 17

<223> Xaa = A,R或不存在

<220>

<221> 变体

<222> 19

<223> Xaa = W或F

<400> 108

Xaa Xaa Xaa Trp Trp Xaa Xaa Trp Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa Trp Xaa Arg

20

<210> 109

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在

<220>

<221> 变体

<222> 2

<223> Xaa = L或不存在

<220>

<221> 变体

<222> 10

<223> Xaa = S或P

<220>

<221> 变体

<222> 13

<223> Xaa = F或A

<220>

<221> 变体

<222> 14

<223> Xaa = S,L或P

<220>

<221> 变体

<222> 15

<223> Xaa = R或S

<220>

<221> 变体

<222> 17

<223> Xaa = A或R

<220>

<221> 变体

<222> 19

<223> Xaa = W或F

<400> 109

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Xaa | Xaa | Arg | Trp | Trp | Leu | Arg | Trp | Ala | Xaa | Arg | Trp | Xaa | Xaa | Xaa | Trp |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     | 15  |     |     |     |
| Xaa | Trp | Xaa | Arg |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     | 20  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 110

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在

<400> 110

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Xaa | Leu | Arg | Trp | Trp | Leu | Arg | Trp | Ala | Ser | Arg | Trp | Phe | Ser | Arg | Trp |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     | 15  |     |     |     |
| Ala | Trp | Trp | Arg |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     | 20  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 111

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在

<400> 111

Xaa Leu Arg Trp Trp Leu Arg Trp Ala Ser Arg Trp Ala Ser Arg Trp  
1                      5                      10                      15  
Ala Trp Phe Arg  
                    20

<210> 112

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在

<400> 112

Xaa Arg Trp Trp Leu Arg Trp Ala Ser Arg Trp Ala Leu Ser Trp Arg  
1                      5                      10                      15  
Trp Trp Arg

<210> 113

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在

<400> 113

Xaa Arg Trp Trp Leu Arg Trp Ala Ser Arg Trp Phe Leu Ser Trp Arg  
1                      5                      10                      15  
Trp Trp Arg

<210> 114

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在

<400> 114

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Xaa | Arg | Trp | Trp | Leu | Arg | Trp | Ala | Pro | Arg | Trp | Phe | Pro | Ser | Trp | Arg |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

Trp Trp Arg

<210> 115

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在

<400> 115

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Xaa | Arg | Trp | Trp | Leu | Arg | Trp | Ala | Ser | Arg | Trp | Ala | Pro | Ser | Trp | Arg |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

Trp Trp Arg

<210> 116

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在

<220>

<221> 变体

<222> 4

<223> Xaa = R或G

<220>

<221> 变体

<222> 5

<223> Xaa = W或S

<220>

<221> 变体

<222> 8

<223> Xaa = S、T或P

<220>

<221> 变体

<222> 9

<223> Xaa = W或P

<220>

<221> 变体

<222> 10

<223> Xaa = A或R

<220>

<221> 变体

<222> 12

<223> Xaa = S或R

<400> 116

Xaa Trp Trp Xaa Xaa Trp Ala Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Trp Trp Arg

1 5 10 15

<210> 117

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> Xaa =  $\beta$ -A、S或不存在

<400> 117

Xaa Trp Trp Arg Trp Trp Ala Ser Trp Ala Arg Ser Trp Trp Arg

1 5 10 15

<210> 118

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在

<400> 118

Xaa Trp Trp Gly Ser Trp Ala Thr Pro Arg Arg Arg Trp Trp Arg

1 5 10 15

<210> 119

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在

<400> 119

Xaa Trp Trp Arg Trp Trp Ala Pro Trp Ala Arg Ser Trp Trp Arg

1 5 10 15

<210> 120

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 120

Ala Leu Arg Trp Trp Leu Arg Trp Ala Ser Arg Trp Phe Ser Arg Trp

1 5 10 15

Ala Trp Trp Arg

20

<210> 121

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 121

Arg Trp Trp Leu Arg Trp Ala Ser Arg Trp Phe Ser Arg Trp Ala Trp

| 1                               | 5 | 10 | 15 |
|---------------------------------|---|----|----|
| Arg                             |   |    |    |
| <210> 122                       |   |    |    |
| <211> 17                        |   |    |    |
| <212> PRT                       |   |    |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |   |    |    |
| <220>                           |   |    |    |
| <223> 合成构建体                     |   |    |    |
| <220>                           |   |    |    |
| <221> 变体                        |   |    |    |
| <222> 1                         |   |    |    |
| <223> Xaa = $\beta$ -A,S或不存在    |   |    |    |
| <220>                           |   |    |    |
| <221> 变体                        |   |    |    |
| <222> 2                         |   |    |    |
| <223> Xaa = K,R或L               |   |    |    |
| <220>                           |   |    |    |
| <221> 变体                        |   |    |    |
| <222> 3                         |   |    |    |
| <223> Xaa = F或W                 |   |    |    |
| <220>                           |   |    |    |
| <221> 变体                        |   |    |    |
| <222> 4                         |   |    |    |
| <223> Xaa = F,W或Y               |   |    |    |
| <220>                           |   |    |    |
| <221> 变体                        |   |    |    |
| <222> 5                         |   |    |    |
| <223> Xaa = E,R或S               |   |    |    |
| <220>                           |   |    |    |
| <221> 变体                        |   |    |    |
| <222> 6                         |   |    |    |
| <223> Xaa = K,R或L               |   |    |    |
| <220>                           |   |    |    |
| <221> 变体                        |   |    |    |
| <222> 7                         |   |    |    |
| <223> Xaa = F或W                 |   |    |    |
| <220>                           |   |    |    |
| <221> 变体                        |   |    |    |
| <222> 8                         |   |    |    |

<223> Xaa = F、W或Y

<220>

<221> 变体

<222> 9

<223> Xaa = R、T或S

<220>

<221> 变体

<222> 10

<223> Xaa = E、R或S

<220>

<221> 变体

<222> 11

<223> Xaa = F或W

<220>

<221> 变体

<222> 12

<223> Xaa = 不存在、F或W

<220>

<221> 变体

<222> 13

<223> Xaa = P或R

<220>

<221> 变体

<222> 14

<223> Xaa = R或L

<220>

<221> 变体

<222> 15

<223> Xaa = K、W或R

<220>

<221> 变体

<222> 16

<223> Xaa = R或F

<220>

<221> 变体

<222> 17

<223> Xaa = R或K

<400> 122

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

| 1                               | 5 | 10 | 15 |
|---------------------------------|---|----|----|
| Xaa                             |   |    |    |
| <210> 123                       |   |    |    |
| <211> 16                        |   |    |    |
| <212> PRT                       |   |    |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |   |    |    |
| <220>                           |   |    |    |
| <223> 合成构建体                     |   |    |    |
| <220>                           |   |    |    |
| <221> 变体                        |   |    |    |
| <222> 1                         |   |    |    |
| <223> Xaa = $\beta$ -A,S或不存在    |   |    |    |
| <220>                           |   |    |    |
| <221> 变体                        |   |    |    |
| <222> 2                         |   |    |    |
| <223> Xaa = K,R或L               |   |    |    |
| <220>                           |   |    |    |
| <221> 变体                        |   |    |    |
| <222> 4                         |   |    |    |
| <223> Xaa = F,W或Y               |   |    |    |
| <220>                           |   |    |    |
| <221> 变体                        |   |    |    |
| <222> 6                         |   |    |    |
| <223> Xaa = K,R或L               |   |    |    |
| <220>                           |   |    |    |
| <221> 变体                        |   |    |    |
| <222> 8                         |   |    |    |
| <223> Xaa = F,W或Y               |   |    |    |
| <220>                           |   |    |    |
| <221> 变体                        |   |    |    |
| <222> 9                         |   |    |    |
| <223> Xaa = R,T或S               |   |    |    |
| <220>                           |   |    |    |
| <221> 变体                        |   |    |    |
| <222> 10                        |   |    |    |
| <223> Xaa = E,R或S               |   |    |    |
| <220>                           |   |    |    |
| <221> 变体                        |   |    |    |
| <222> 11                        |   |    |    |

<223> Xaa = F或W

<220>

<221> 变体

<222> 14

<223> Xaa = K、W或R

<220>

<221> 变体

<222> 16

<223> Xaa = R或K

<400> 123

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Xaa | Xaa | Trp | Xaa | Glu | Xaa | Trp | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Pro | Arg | Xaa | Arg | Xaa |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

<210> 124

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> Xaa =  $\beta$ -A、S或不存在

<400> 124

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Xaa | Lys | Trp | Phe | Glu | Arg | Trp | Phe | Arg | Glu | Trp | Pro | Arg | Lys | Arg | Arg |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

<210> 125

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> Xaa =  $\beta$ -A、S或不存在

<400> 125

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Xaa | Lys | Trp | Trp | Glu | Arg | Trp | Trp | Arg | Glu | Trp | Pro | Arg | Lys | Arg | Arg |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

<210> 126

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在

<400> 126

Xaa Lys Trp Trp Glu Arg Trp Trp Arg Glu Trp Pro Arg Lys Arg Lys

1 5 10 15

<210> 127

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在

<400> 127

Xaa Arg Trp Trp Glu Lys Trp Trp Thr Arg Trp Pro Arg Lys Arg Lys

1 5 10 15

<210> 128

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在

<400> 128

Xaa Arg Trp Tyr Glu Lys Trp Tyr Thr Glu Phe Pro Arg Arg Arg Arg

1 5 10 15

<210> 129

<211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 合成构建体  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 1  
 <223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 3,11  
 <223> Xaa = 非天然氨基酸,并且其中在所述两个非天然氨基酸之间存在烃键联  
 <400> 129  
 Xaa Lys Xaa Trp Trp Glu Arg Trp Trp Arg Xaa Trp Pro Arg Lys Arg  
 1 5 10 15  
 Lys  
 <210> 130  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 合成构建体  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 1  
 <223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 2  
 <223> Xaa = K,R或L  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 3  
 <223> Xaa = F或W  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 5  
 <223> Xaa = R或S

<220>  
 <221> 变体  
 <222> 6  
 <223> Xaa = L或R  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 7  
 <223> Xaa = F或W  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 9  
 <223> Xaa = R或S  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 10  
 <223> Xaa = R或S  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 12  
 <223> Xaa = F或W  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 13  
 <223> Xaa = R或P  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 14  
 <223> Xaa = L或R  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 16  
 <223> Xaa = R或F  
 <400> 130  
 Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Trp Xaa  
 1 5 10 15  
 Arg  
 <210> 131  
 <211> 17  
 <212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在

<400> 131

Xaa Arg Trp Trp Arg Leu Trp Trp Arg Ser Trp Phe Arg Leu Trp Arg

1 5 10 15

Arg

<210> 132

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在

<400> 132

Xaa Leu Trp Trp Arg Arg Trp Trp Ser Arg Trp Trp Pro Arg Trp Arg

1 5 10 15

Arg

<210> 133

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在

<400> 133

Xaa Leu Trp Trp Ser Arg Trp Trp Arg Ser Trp Phe Arg Leu Trp Phe

1 5 10 15

Arg

<210> 134

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在

<400> 134

Xaa Lys Phe Trp Ser Arg Phe Trp Arg Ser Trp Phe Arg Leu Trp Arg

1

5

10

15

Arg

<210> 135

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在

<220>

<221> 变体

<222> 5,12

<223> Xaa = 非天然氨基酸,并且其中在所述两个非天然氨基酸之间存在烃键联

<400> 135

Xaa Arg Trp Trp Xaa Leu Trp Trp Arg Ser Trp Xaa Arg Leu Trp Arg

1

5

10

15

Arg

<210> 136

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 136



<222> 9  
 <223> Xaa = W或F  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 10  
 <223> Xaa = W或F  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 11  
 <223> Xaa = R或不存在  
 <400> 138  
 Xaa Trp Xaa Arg Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1                      5                      10  
 <210> 139  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 合成构建体  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 1  
 <223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在  
 <400> 139  
 Xaa Trp Trp Arg Leu Ser Leu Arg Trp Trp  
 1                      5                      10  
 <210> 140  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 合成构建体  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 1  
 <223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在  
 <400> 140  
 Xaa Trp Phe Arg Leu Ser Leu Arg Phe Trp Arg  
 1                      5                      10

<210> 141  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<220>  
<221> 变体  
<222> 1  
<223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在  
<400> 141  
Xaa Trp Trp Arg Leu Arg Ser Trp Phe Arg  
1 5 10  
<210> 142  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<220>  
<221> 变体  
<222> 1  
<223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在  
<400> 142  
Xaa Trp Phe Arg Leu Ser Leu Arg Phe Trp  
1 5 10  
<210> 143  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<220>  
<221> 变体  
<222> 2  
<223> Xaa = R或S  
<220>  
<221> 变体  
<222> 4,8

<223> Xaa = W或F  
<400> 143  
Arg Xaa Trp Xaa Arg Leu Trp Xaa Arg Leu Arg  
1                      5                      10  
<210> 144  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<220>  
<221> 变体  
<222> 1  
<223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在  
<400> 144  
Xaa Trp Trp Arg Leu Trp Trp Arg Leu Arg  
1                      5                      10  
<210> 145  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<220>  
<221> 变体  
<222> 1  
<223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在  
<400> 145  
Xaa Trp Phe Arg Leu Trp Phe Arg Leu Arg  
1                      5                      10  
<210> 146  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<220>  
<221> 变体  
<222> 1

<223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在  
<400> 146  
Xaa Trp Phe Arg Leu Trp Trp Arg Leu Arg  
1 5 10  
<210> 147  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<220>  
<221> 变体  
<222> 1  
<223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在  
<400> 147  
Xaa Trp Trp Arg Leu Trp Phe Arg Leu Arg  
1 5 10  
<210> 148  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<220>  
<221> 变体  
<222> 1  
<223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在  
<400> 148  
Xaa Arg Trp Trp Arg Leu Trp Trp Arg Leu  
1 5 10  
<210> 149  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<220>  
<221> 变体  
<222> 1

<223> Xaa =  $\beta$ -A,S或不存在

<400> 149

Xaa Arg Ser Trp Phe Arg Leu Trp Phe Arg

1 5 10

<210> 150

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 150

Gly Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Leu Arg Ser Leu Trp Arg Leu

1 5 10 15

Leu Trp Lys Val

20

<210> 151

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、11

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 151

Ser Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg

1 5 10

<210> 152

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、9

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 152

Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys

1 5

<210> 153

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、9

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 153

Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu

1 5

<210> 154

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、11

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 154

Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Lys

1 5 10

<210> 155

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、9

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 155

Thr Glu Tyr Gln Ala Gly Ser Thr Lys

1 5

<210> 156

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、8

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 156

Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Lys

1 5

<210> 157

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、8

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 157

Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe

1 5

<210> 158

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、10

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 158

Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val

1 5 10

<210> 159

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、9

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 159

Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Lys

1 5

<210> 160

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、10

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 160

Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr Lys

1 5 10

<210> 161

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 161

gcaactgagg gagccttgaa t

21

<210> 162

<211> 21

<212> DNA

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| 〈213〉 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| 〈220〉                           |    |
| 〈223〉 合成构建体                     |    |
| 〈400〉 162                       |    |
| gaccaggaac taatcagaca a         | 21 |
| 〈210〉 163                       |    |
| 〈211〉 21                        |    |
| 〈212〉 DNA                       |    |
| 〈213〉 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| 〈220〉                           |    |
| 〈223〉 合成构建体                     |    |
| 〈400〉 163                       |    |
| gacaaggcgt tccaattaac a         | 21 |
| 〈210〉 164                       |    |
| 〈211〉 21                        |    |
| 〈212〉 DNA                       |    |
| 〈213〉 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| 〈220〉                           |    |
| 〈223〉 合成构建体                     |    |
| 〈400〉 164                       |    |
| gacttccta tggtgctaac a          | 21 |
| 〈210〉 165                       |    |
| 〈211〉 21                        |    |
| 〈212〉 DNA                       |    |
| 〈213〉 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| 〈220〉                           |    |
| 〈223〉 合成构建体                     |    |
| 〈400〉 165                       |    |
| ggctgatgaa actcaagcct t         | 21 |
| 〈210〉 166                       |    |
| 〈211〉 21                        |    |
| 〈212〉 DNA                       |    |
| 〈213〉 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| 〈220〉                           |    |
| 〈223〉 合成构建体                     |    |
| 〈400〉 166                       |    |
| ggccaaactg tcactaagaa a         | 21 |
| 〈210〉 167                       |    |
| 〈211〉 21                        |    |

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| <212> DNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> 合成构建体                     |    |
| <400> 167                       |    |
| gcagacgtgg tccagaacaa a         | 21 |
| <210> 168                       |    |
| <211> 21                        |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> 合成构建体                     |    |
| <400> 168                       |    |
| gcctcttctc gttcctcatc a         | 21 |
| <210> 169                       |    |
| <211> 21                        |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> 合成构建体                     |    |
| <400> 169                       |    |
| aagcatattg acgcatacaa a         | 21 |
| <210> 170                       |    |
| <211> 21                        |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> 合成构建体                     |    |
| <400> 170                       |    |
| gcaacaatcc atgagcagtg c         | 21 |
| <210> 171                       |    |
| <211> 21                        |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> 合成构建体                     |    |
| <400> 171                       |    |
| ggtgaaatca aggatgctac t         | 21 |
| <210> 172                       |    |

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| <211> 21                        |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> 合成构建体                     |    |
| <400> 172                       |    |
| gtgtaacttc ttcaattgtc a         | 21 |
| <210> 173                       |    |
| <211> 21                        |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> 合成构建体                     |    |
| <400> 173                       |    |
| caagtcctat ttctgaacat g         | 21 |
| <210> 174                       |    |
| <211> 21                        |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> 合成构建体                     |    |
| <400> 174                       |    |
| gaacatgtta ccttcttcat c         | 21 |
| <210> 175                       |    |
| <211> 21                        |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> 合成构建体                     |    |
| <400> 175                       |    |
| tgcagagtat aaactttgta a         | 21 |
| <210> 176                       |    |
| <211> 21                        |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> 合成构建体                     |    |
| <400> 176                       |    |
| gttgatgacc cgtgcctat t          | 21 |

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| <210> 177                       |    |
| <211> 21                        |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> 合成构建体                     |    |
| <400> 177                       |    |
| gacccgtgtc ctattcactt c         | 21 |
| <210> 178                       |    |
| <211> 21                        |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> 合成构建体                     |    |
| <400> 178                       |    |
| gtggatgagg ctggttctaa a         | 21 |
| <210> 179                       |    |
| <211> 21                        |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> 合成构建体                     |    |
| <400> 179                       |    |
| gcgttggttcg ttctatgaag a        | 21 |
| <210> 180                       |    |
| <211> 21                        |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> 合成构建体                     |    |
| <400> 180                       |    |
| gtcctattca cttctattct a         | 21 |
| <210> 181                       |    |
| <211> 21                        |    |
| <212> PRT                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> 合成构建体                     |    |
| <400> 181                       |    |

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys  
1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val  
20

<210> 182

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 182

Lys Glu Thr Trp Phe Glu Thr Trp Phe Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys  
1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val  
20

<210> 183

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 183

Lys Trp Phe Glu Thr Trp Phe Thr Glu Trp Pro Lys Lys Arg Lys  
1 5 10 15

<210> 184

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 184

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly  
1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val  
20 25

<210> 185

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 185

Tyr Ile Gly Ser Arg

1 5

<210> 186

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 186

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 187

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 187

Ser Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 188

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1、23、40

<223> 如说明书的序列表中所示的修饰

<400> 188

Ile Glu Glu Gln Ala Lys Thr Phe Leu Asp Lys Phe Asn His Glu Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Arg Val Arg Ser Trp Ser Arg

35

40



图1A

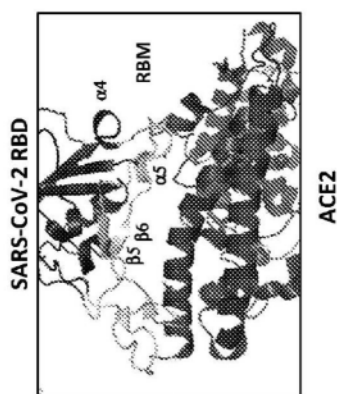


图1B

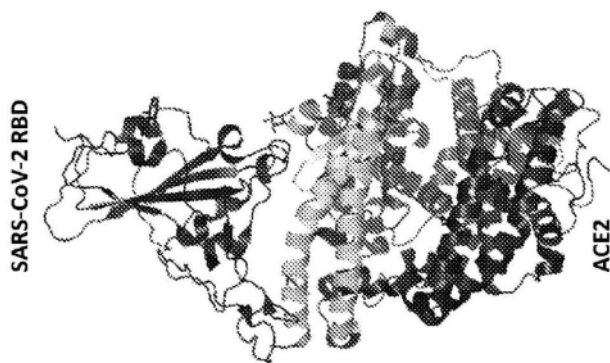


图1C

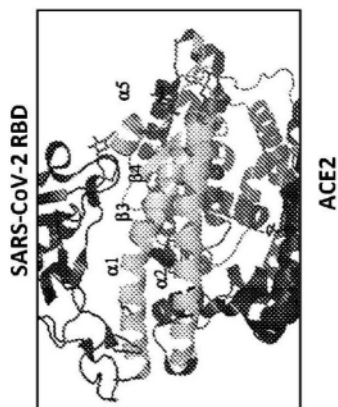


图1D



图2A

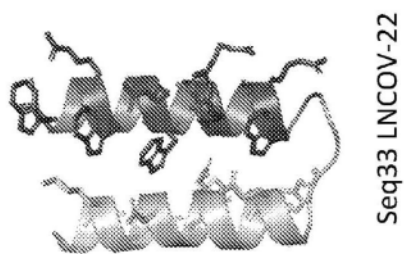


图2B

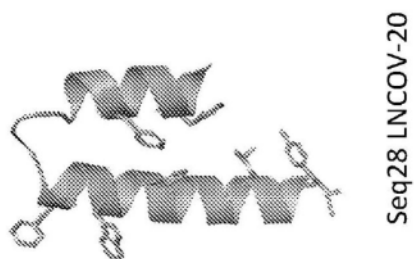


图2C

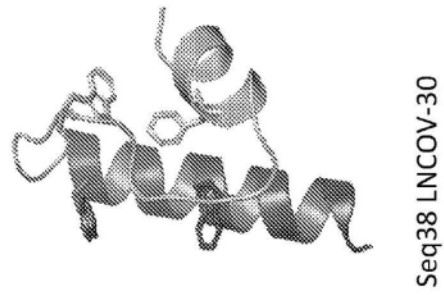


图2D



图2E

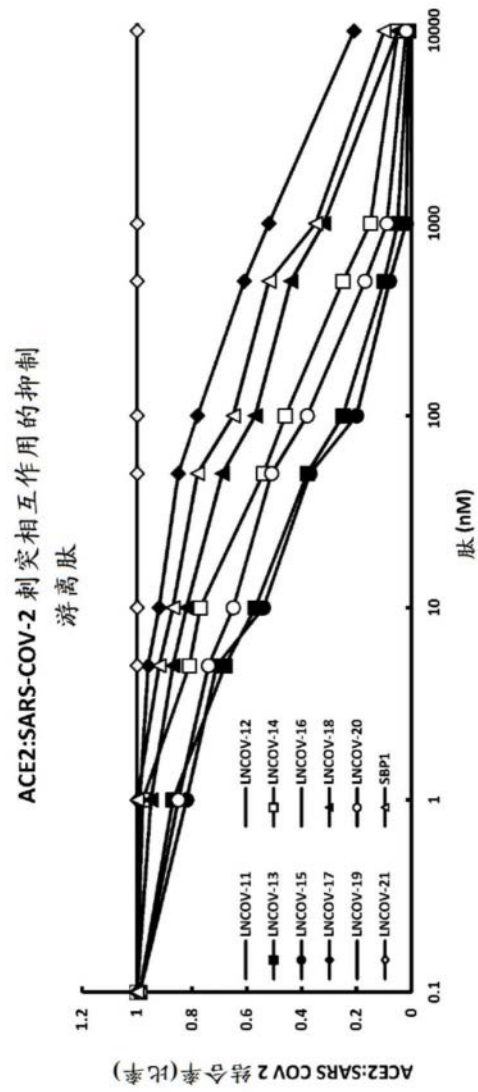


图3A

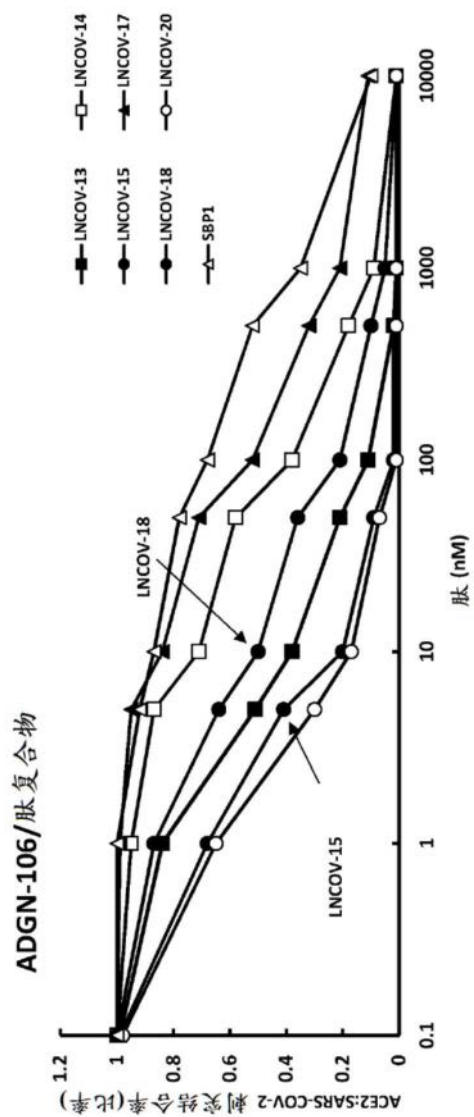


图3B

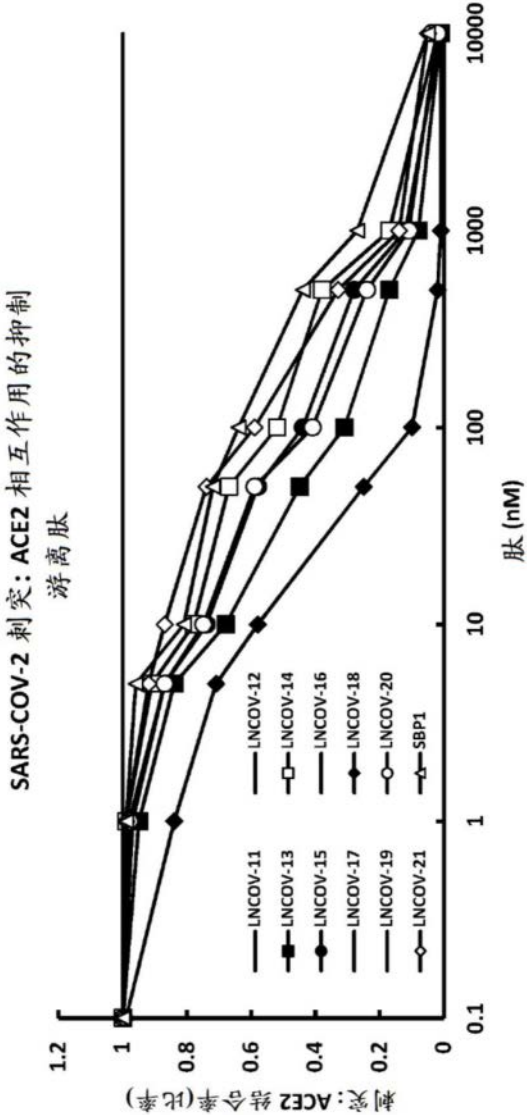


图4A

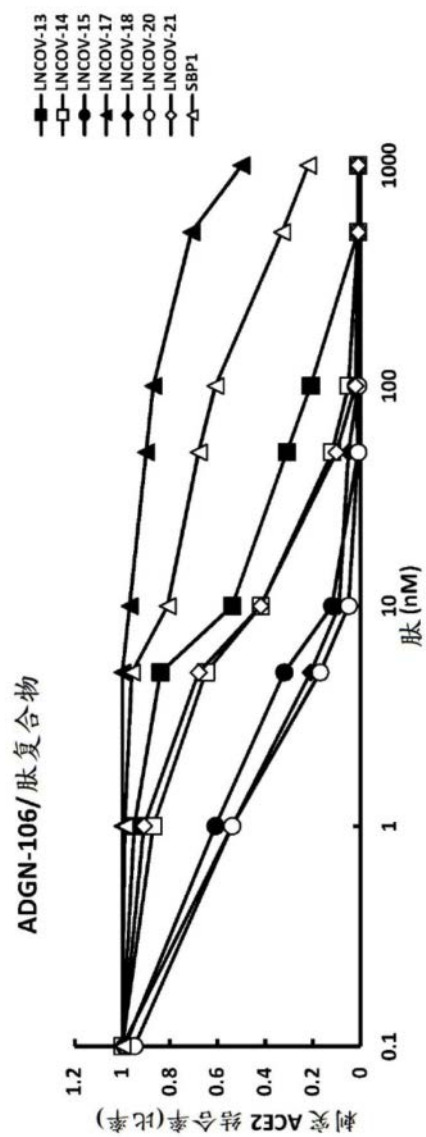


图4B

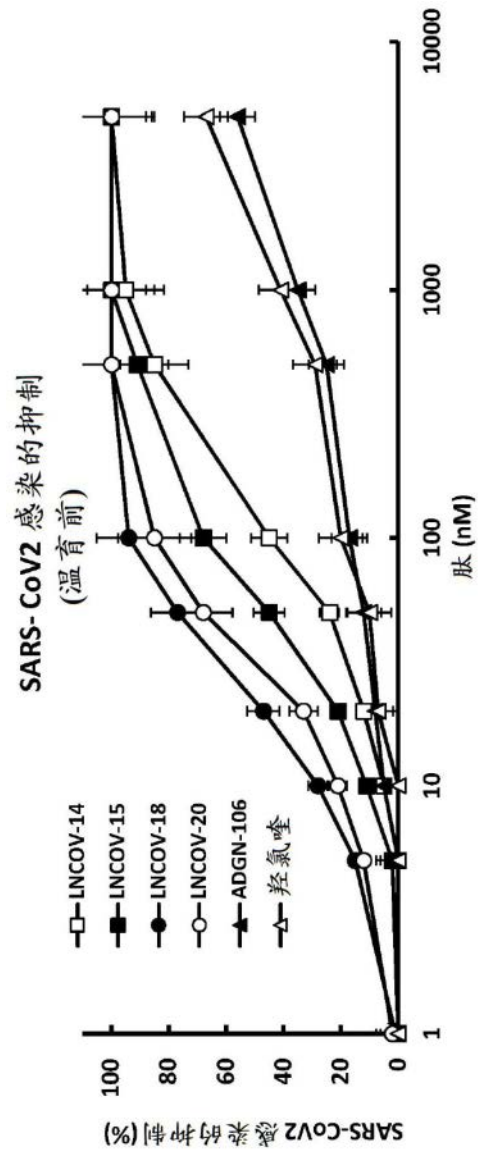


图5A

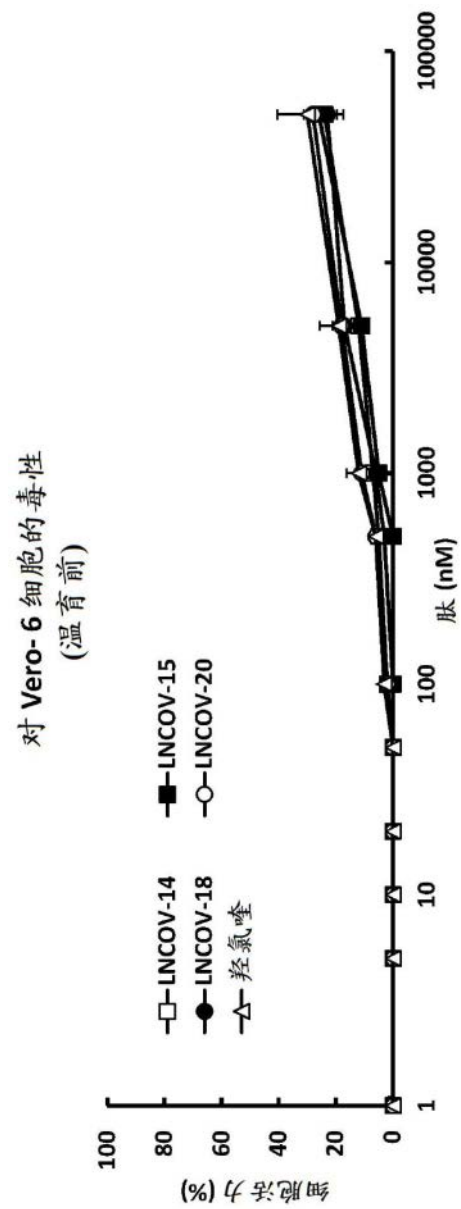


图5B

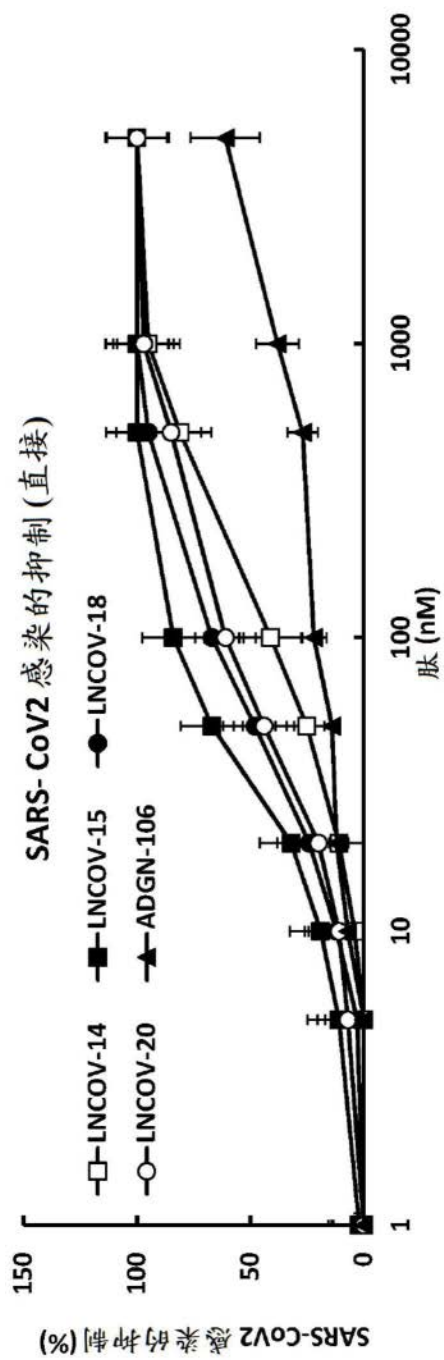


图5C

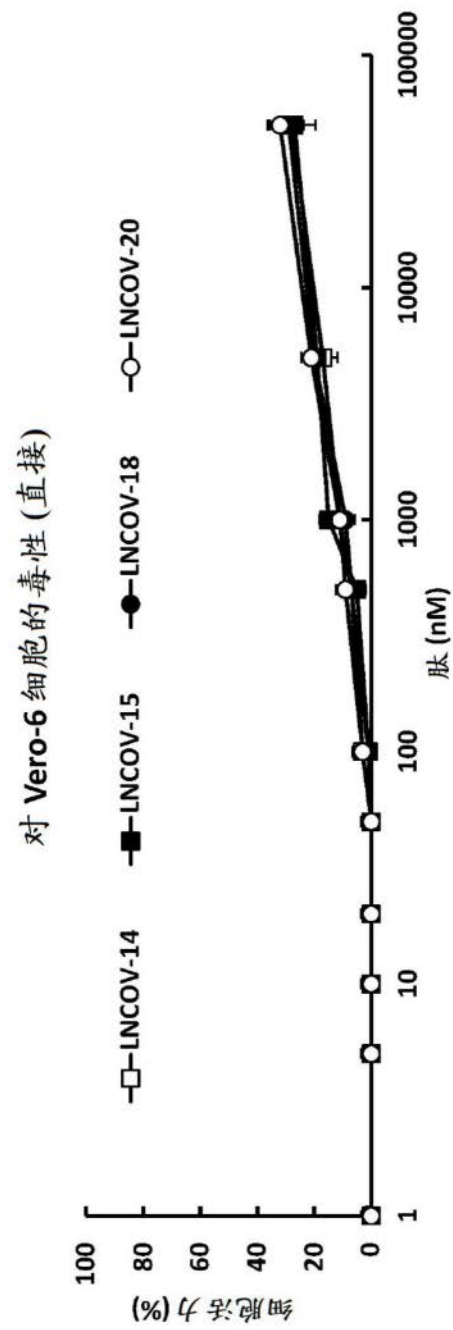


图5D

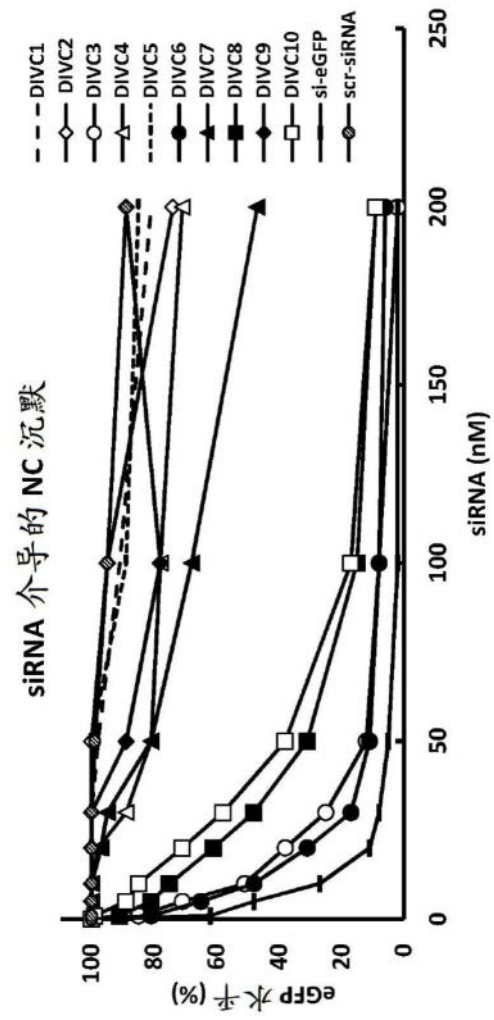


图6A

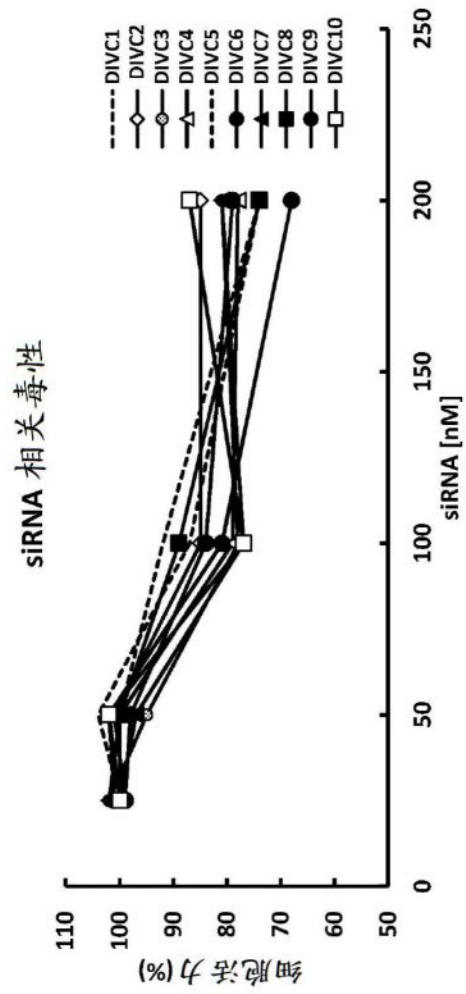


图6B

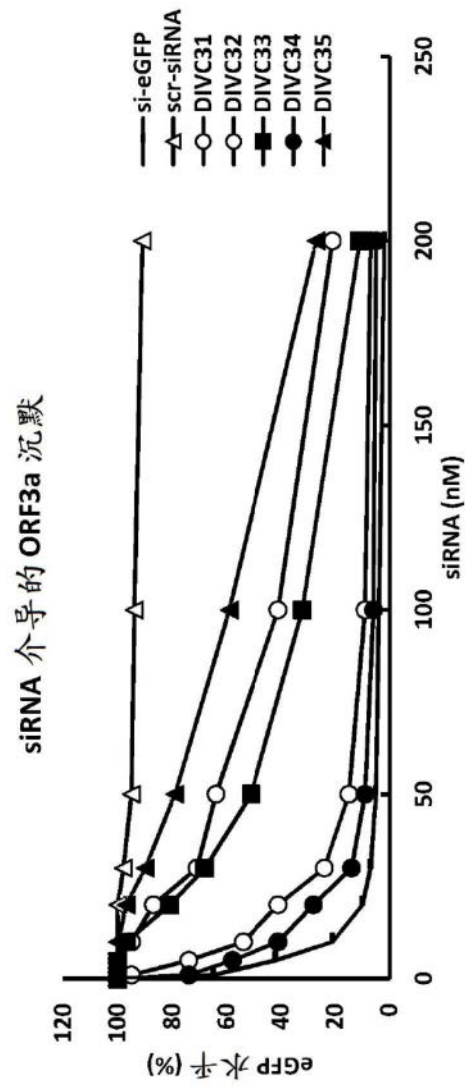


图7A

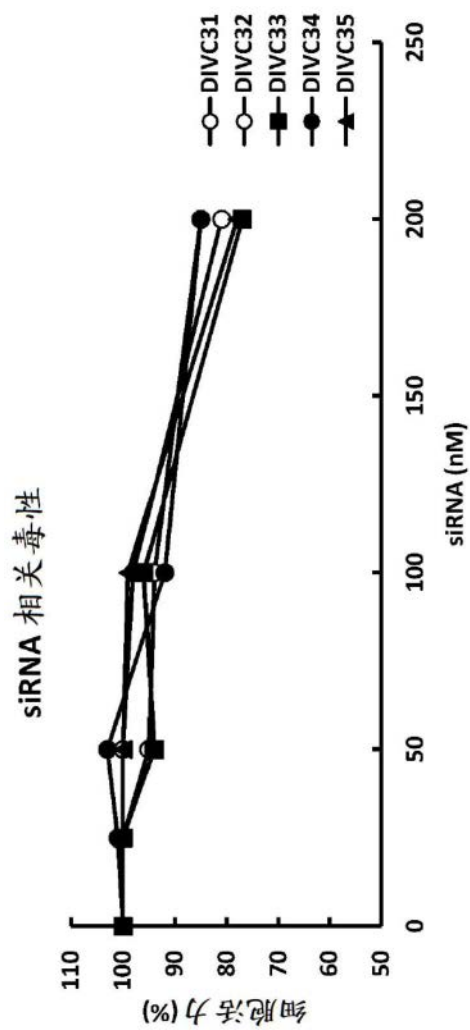


图7B

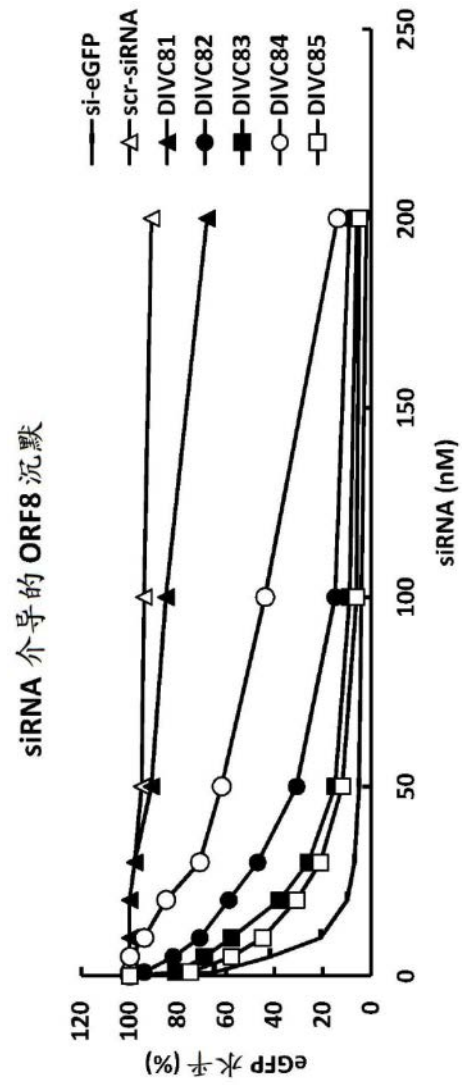


图8A

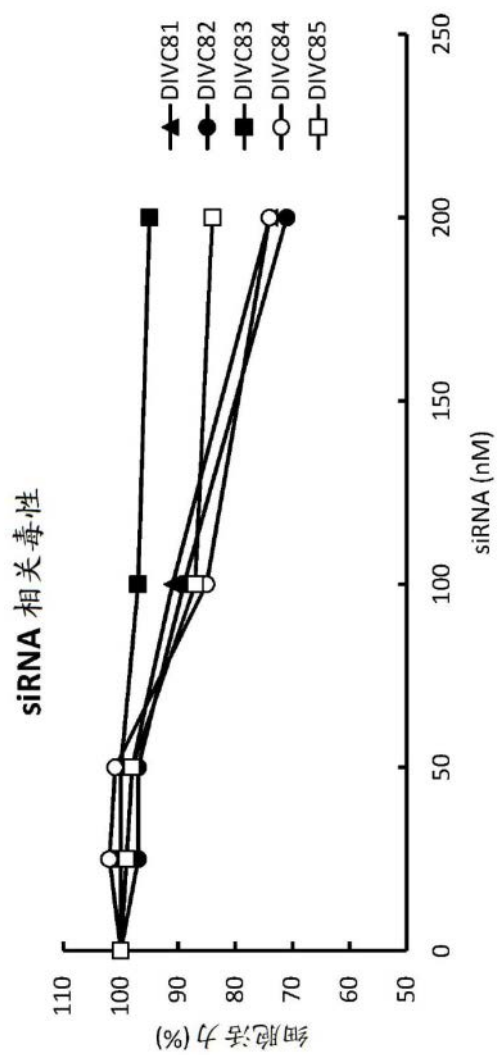


图8B

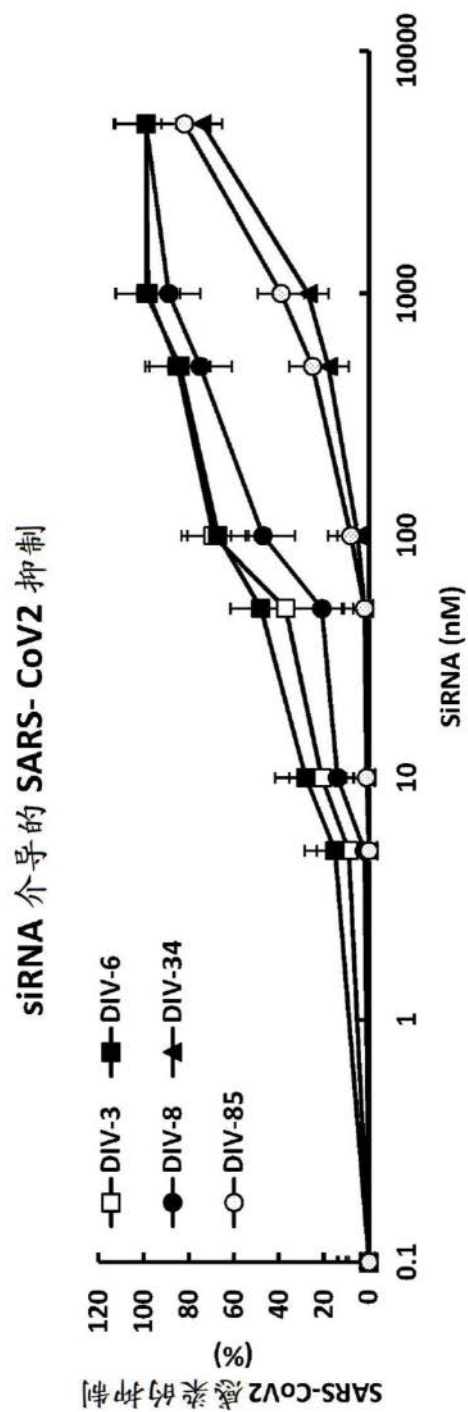


图9A

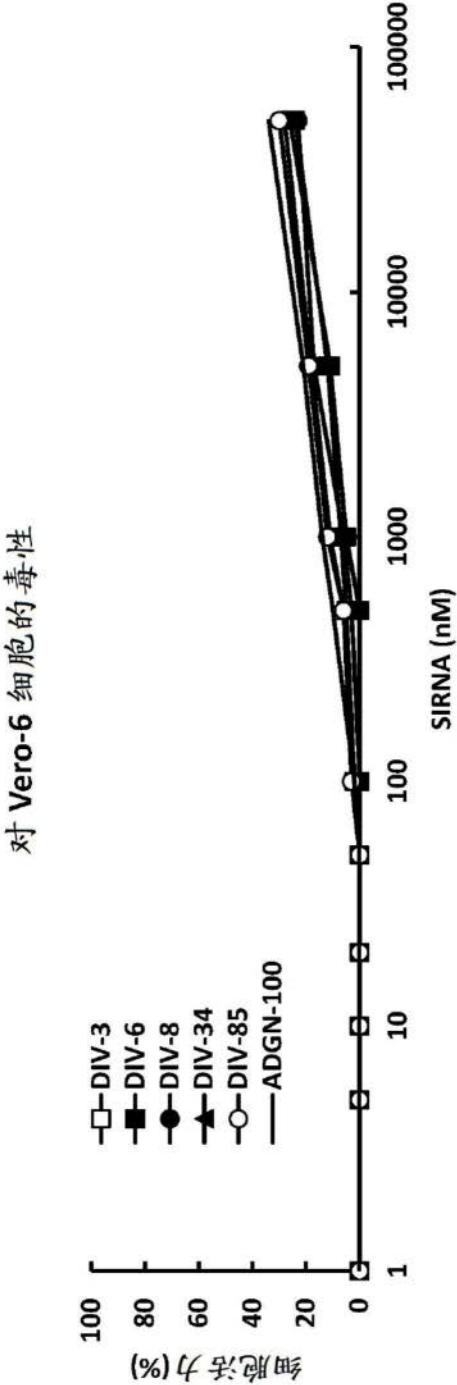


图9B

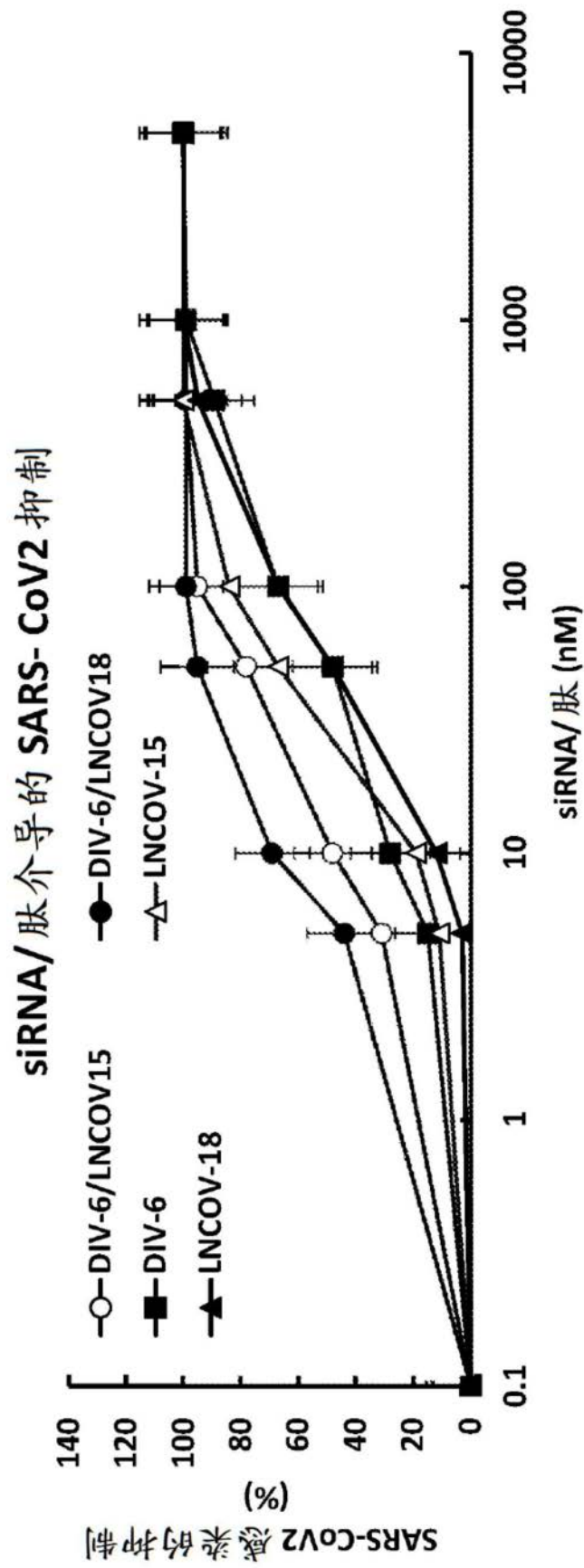


图10

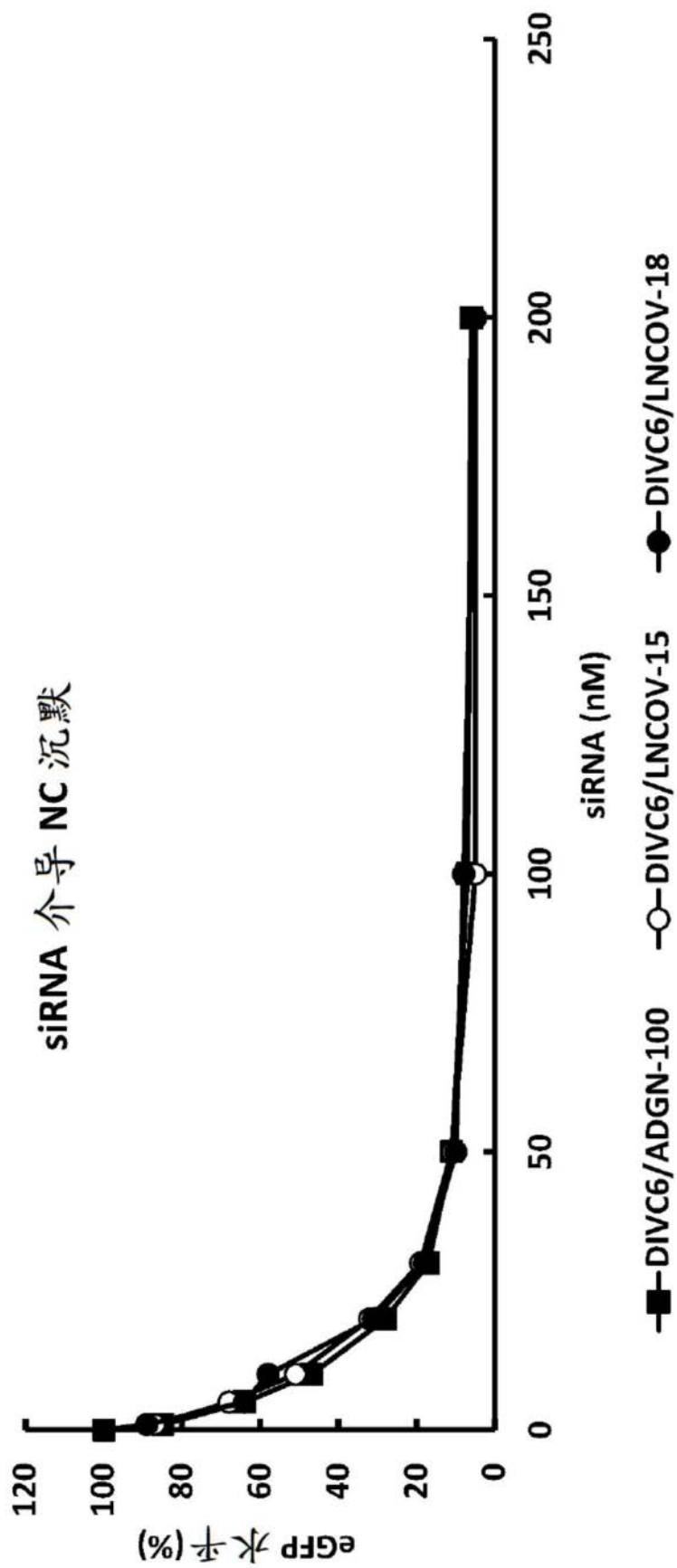


图11A

|                                                                 |                |
|-----------------------------------------------------------------|----------------|
| VEPEP9a1: ( $\beta$ A/S) LRWWLRWASRWF SRWAWWR<br>HHHHHHHHHHHHHH | SEQ ID NO: 110 |
| VEPEP9a2: ( $\beta$ A/S) LRWWLRWASRWASRWAFR<br>HHHHHHHHHHHHHH   | SEQ ID NO: 111 |
| VEPEP9b1: ( $\beta$ A/S) RWWLWRWASRWALSWRWWR                    | SEQ ID NO: 112 |
| VEPEP9b2: ( $\beta$ A/S) RWWLWRWASRWF LSWRWWR<br>HHHHHHHHHHHHHH | SEQ ID NO: 113 |
| VEPEP9c1: ( $\beta$ A/S) RWWLRWAPRWFPSRWWR<br>HHHH TTHH         | SEQ ID NO: 114 |
| VEPEP9c2: ( $\beta$ A/S) RWWLWRWASRWAPSWRWWR<br>HHHHHHHH        | SEQ ID NO: 115 |
| VEPEP9d: ( $\beta$ A/S) WWRWWASWARSWWR<br>HHHHHHHHHH            | SEQ ID NO: 117 |
| VEPEP9e: ( $\beta$ A/S) WVGSWATPRRRWWR<br>HHHHTT                | SEQ ID NO: 118 |
| VEPEP9f: ( $\beta$ A/S) WWRWWAPWARSWWR<br>HHHH THH              | SEQ ID NO: 119 |

图11B

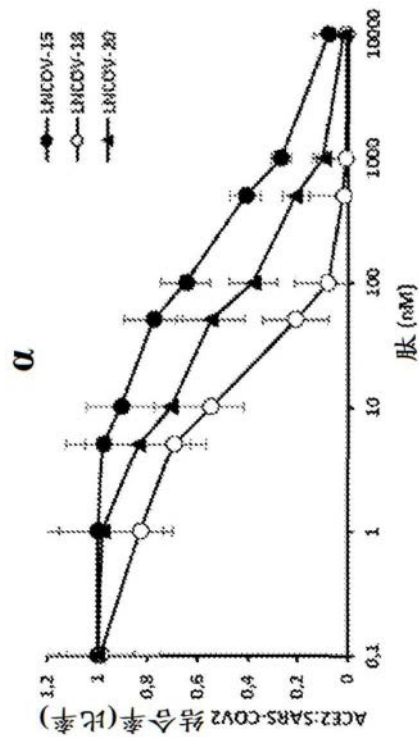


图12A

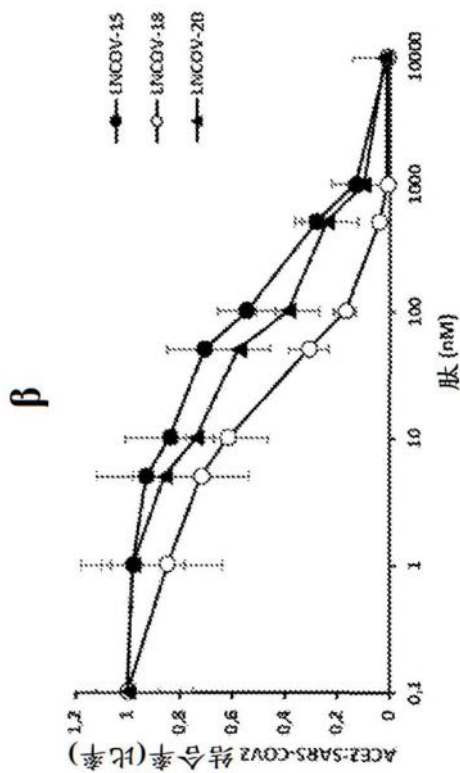


图12B

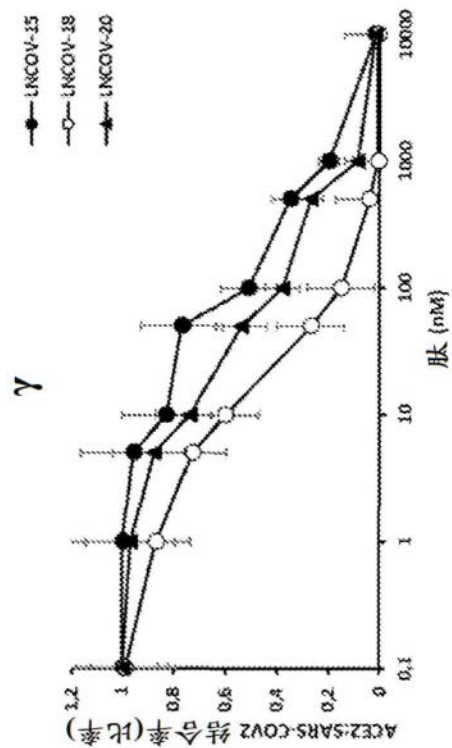


图12C

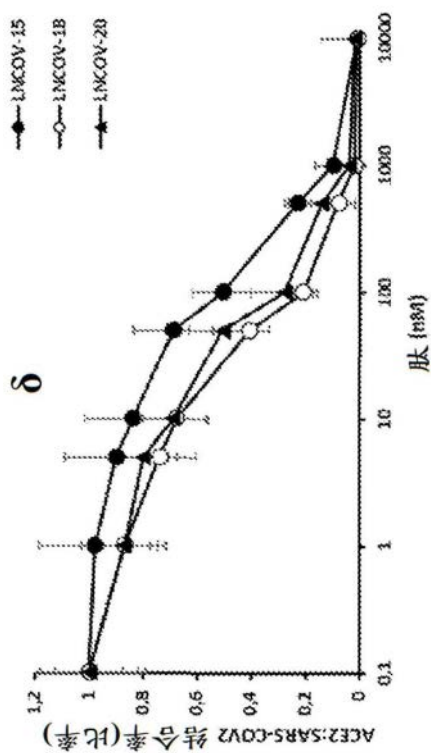


图12D

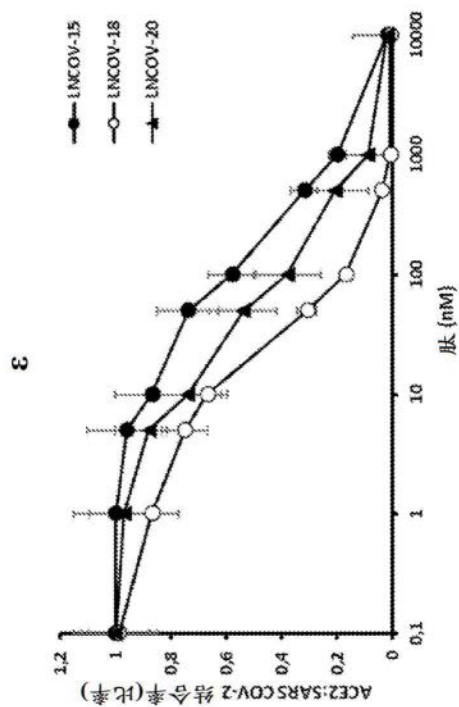


图12E

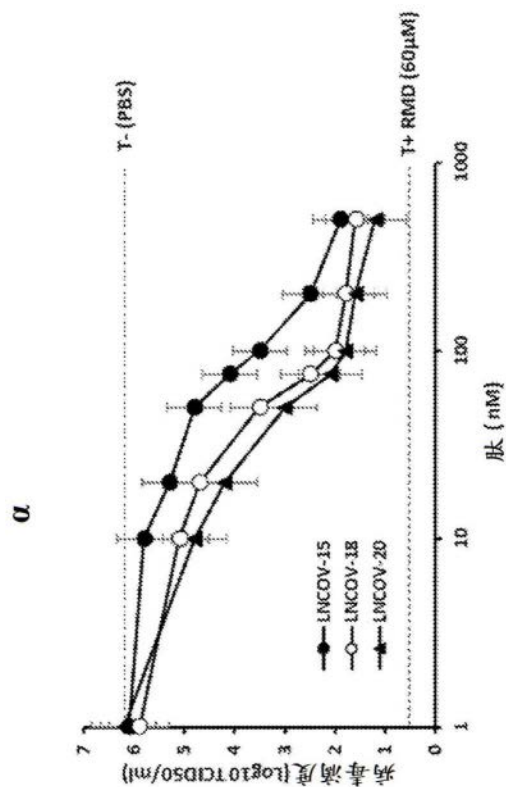


图13A

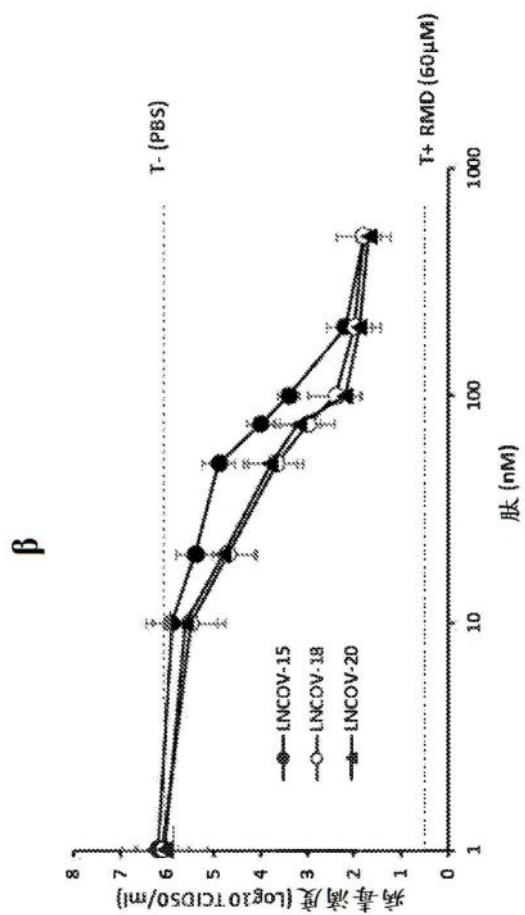


图13B

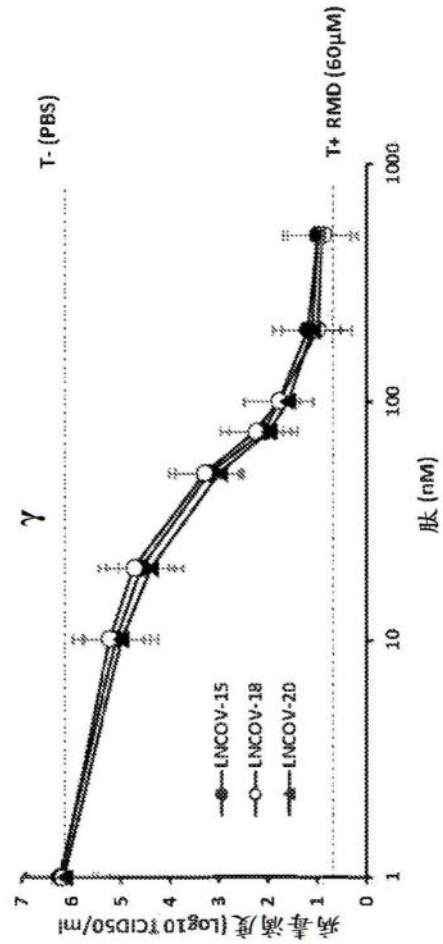


图13C

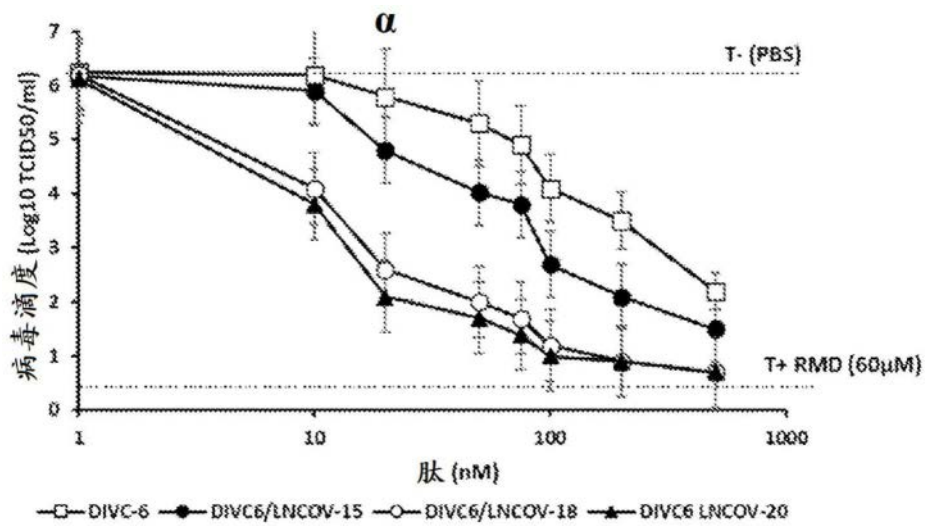


图14A

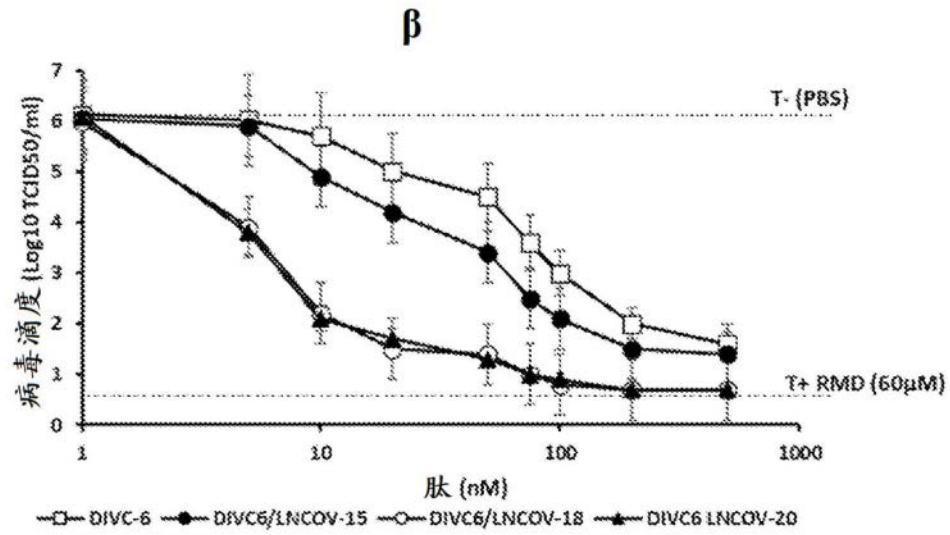


图14B

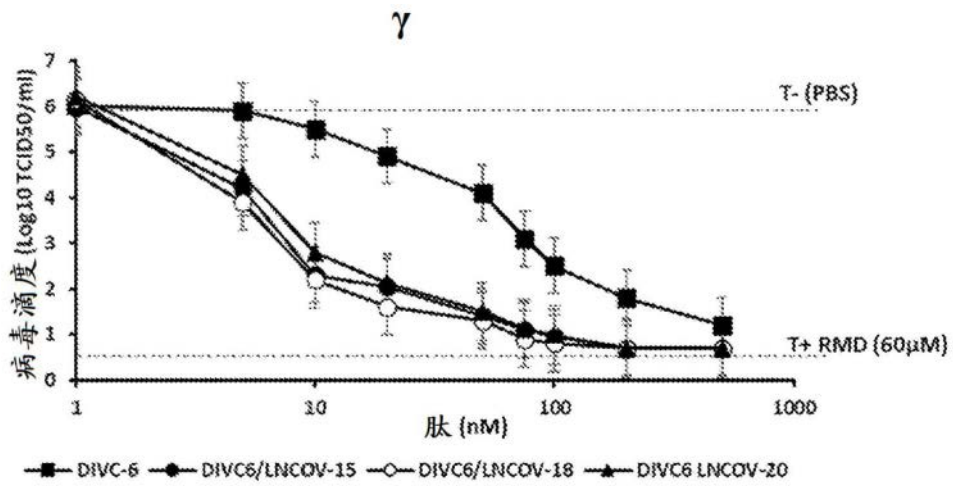


图14C

## 肺中的体内荧光信号

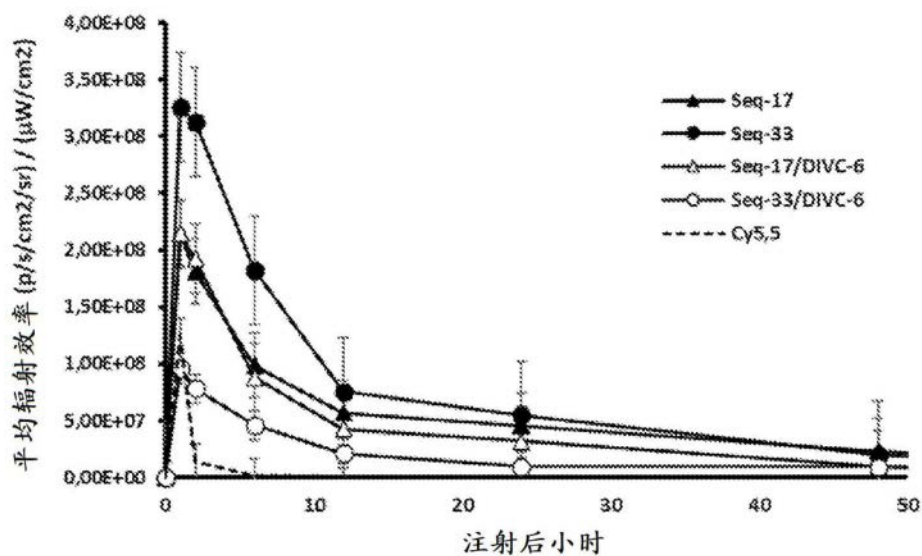


图15A

## 分离的器官中的Seq-17荧光信号

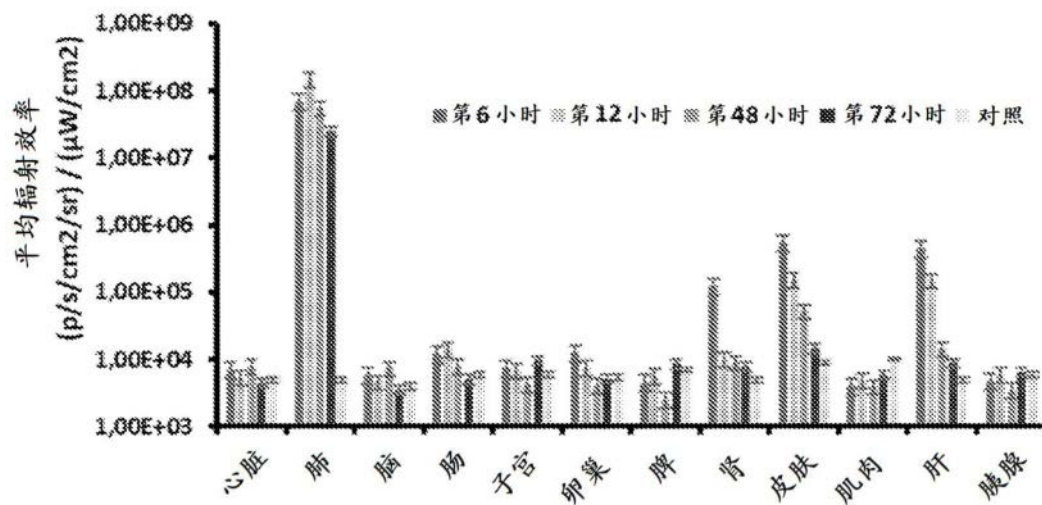


图15B

分离的器官中的 Seq-33 荧光信号

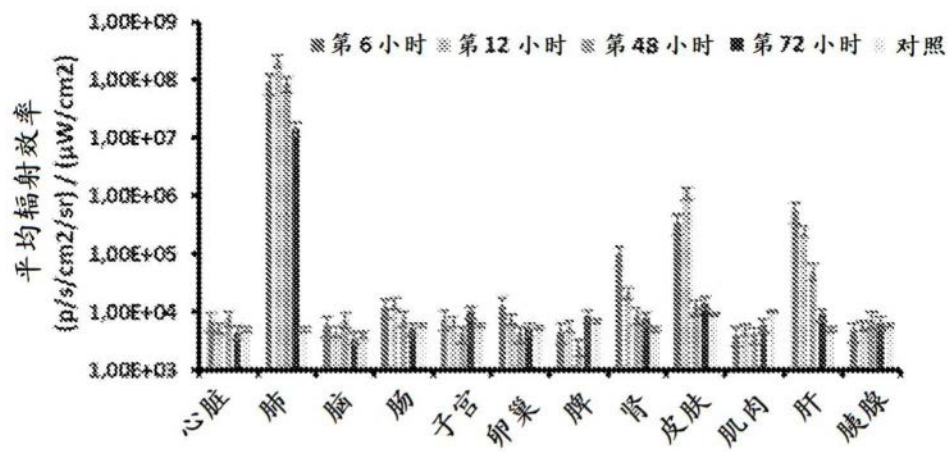


图15C

分离的器官中的 Seq-33/DIVC-6 荧光信号

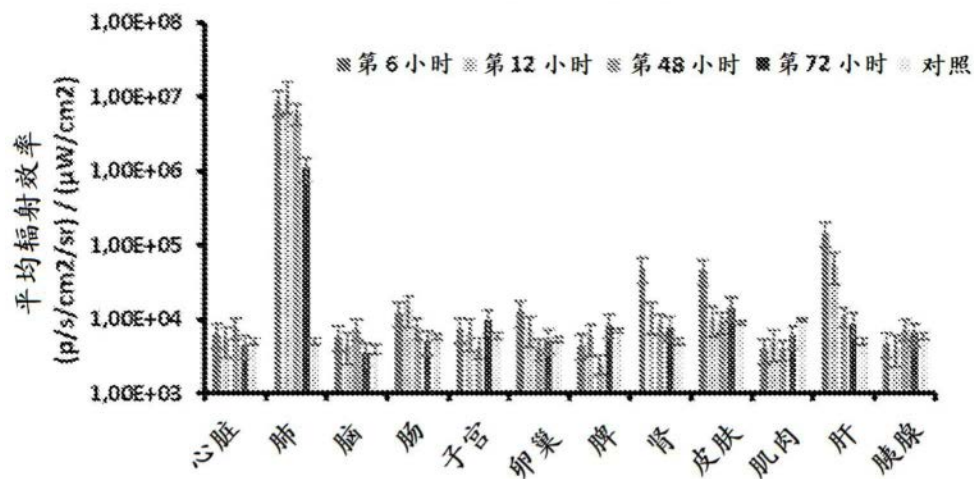


图15D

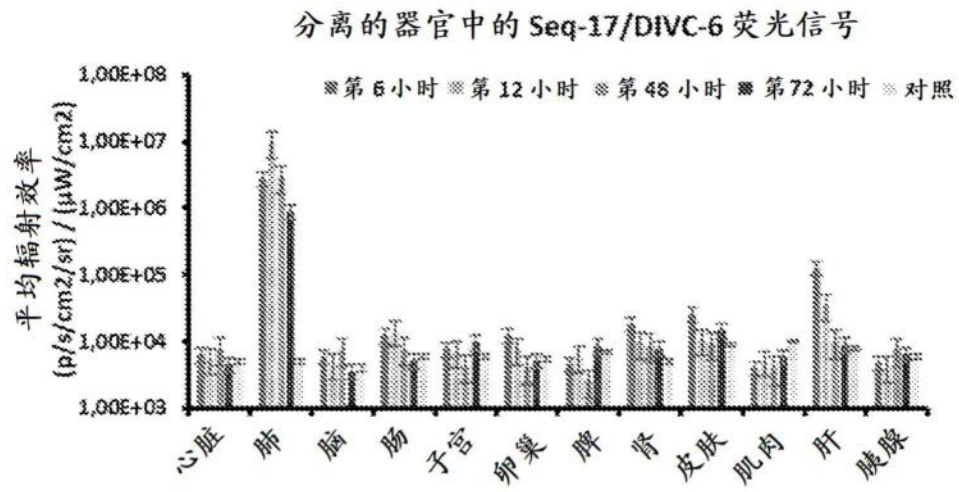


图15E

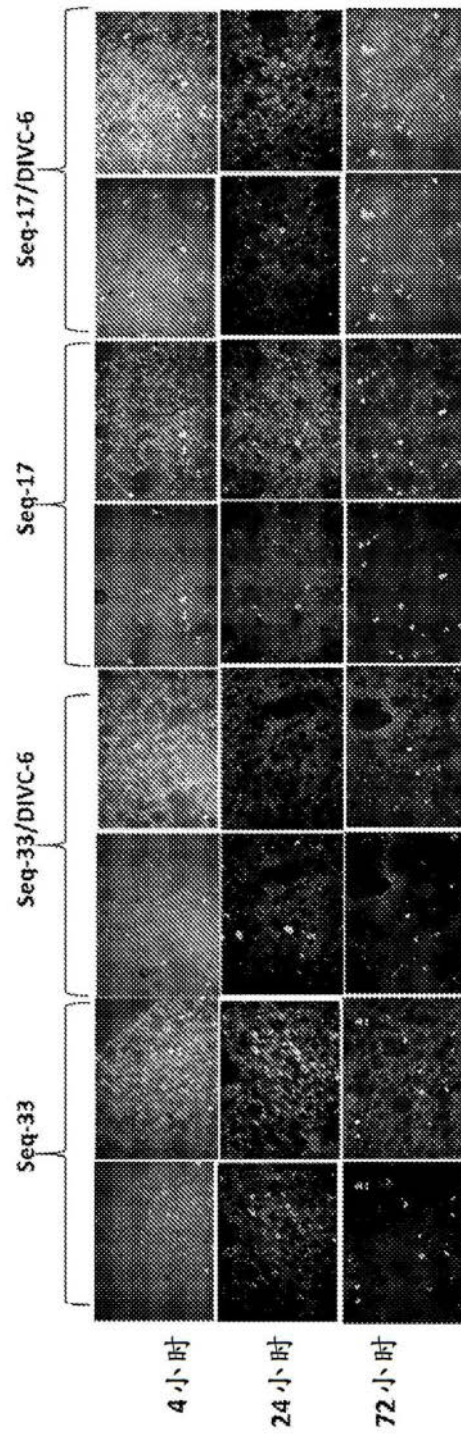


图16A

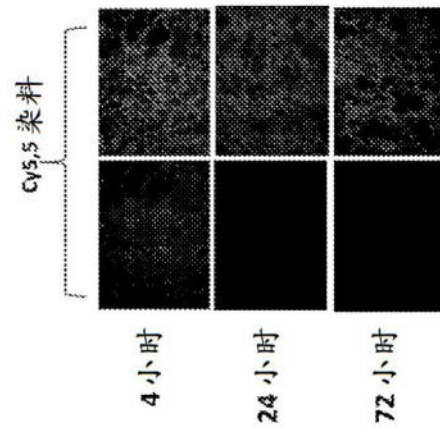


图16B

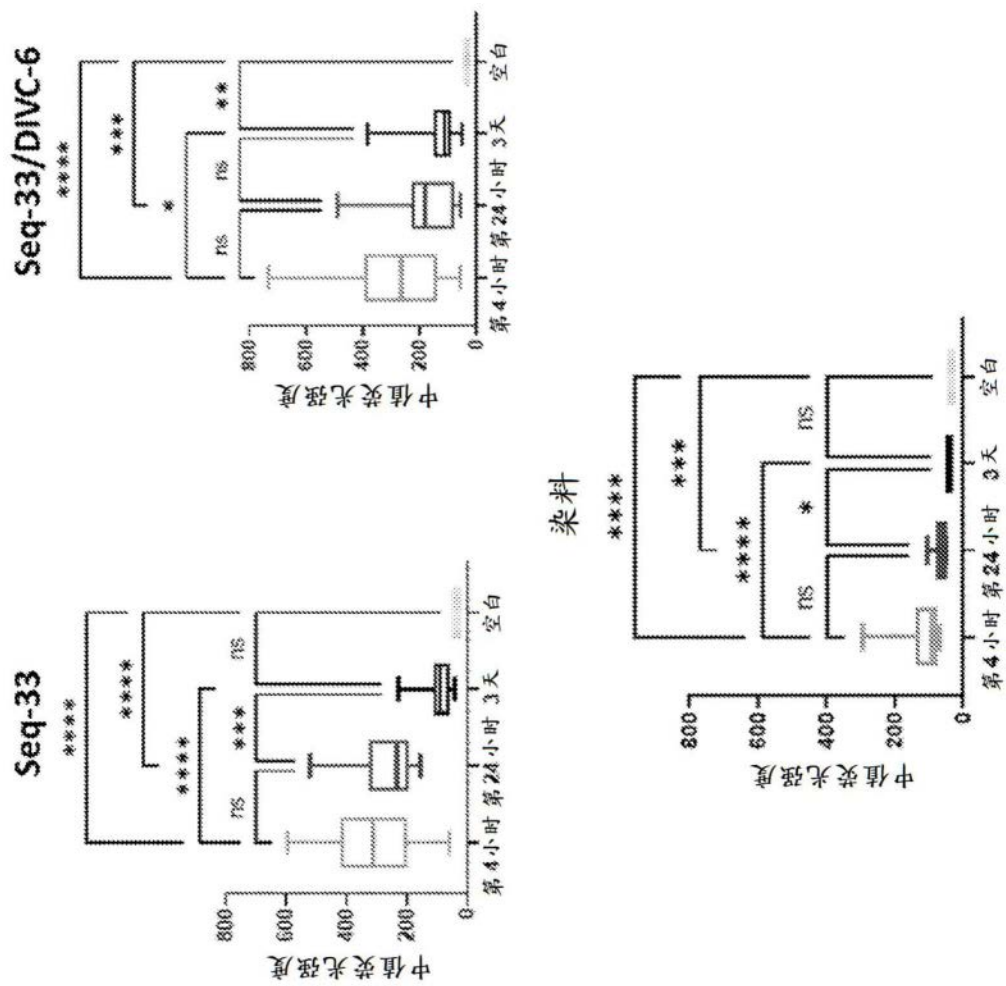


图17

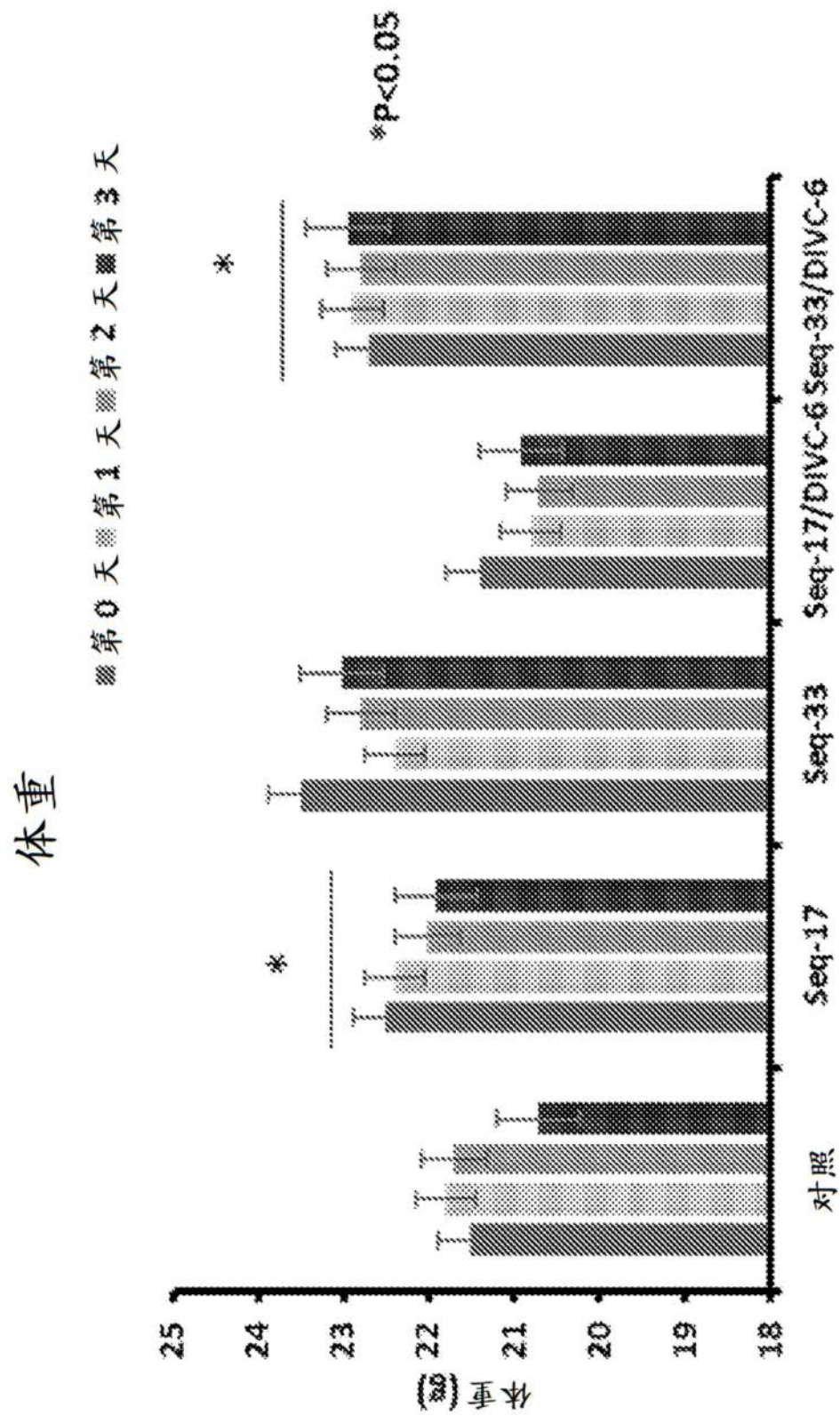


图18A

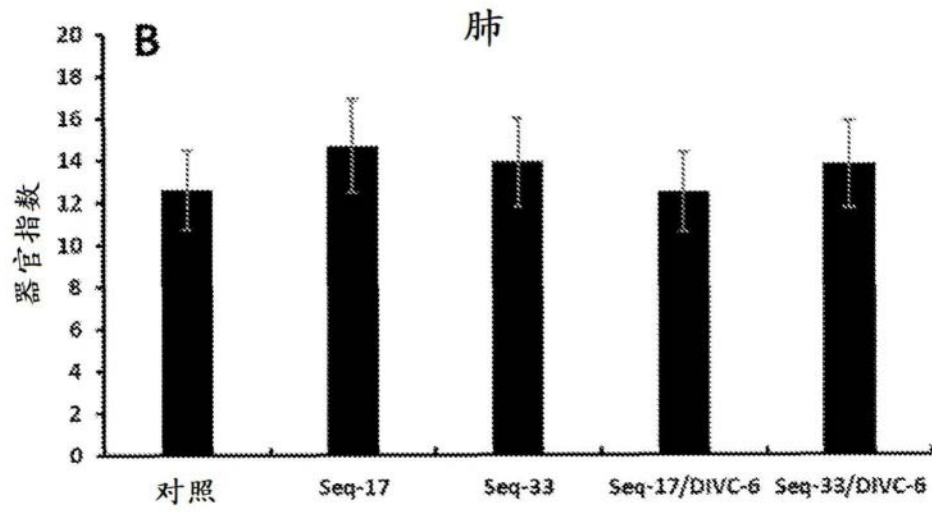


图18B

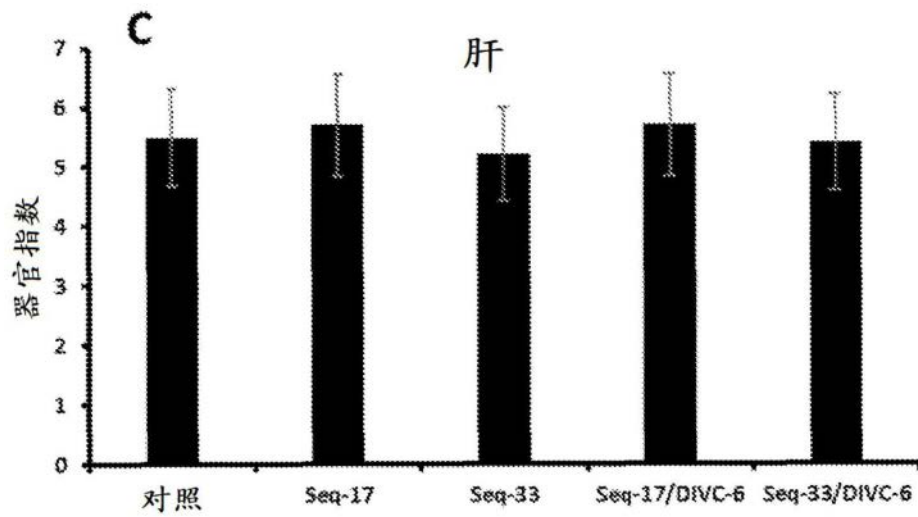


图18C

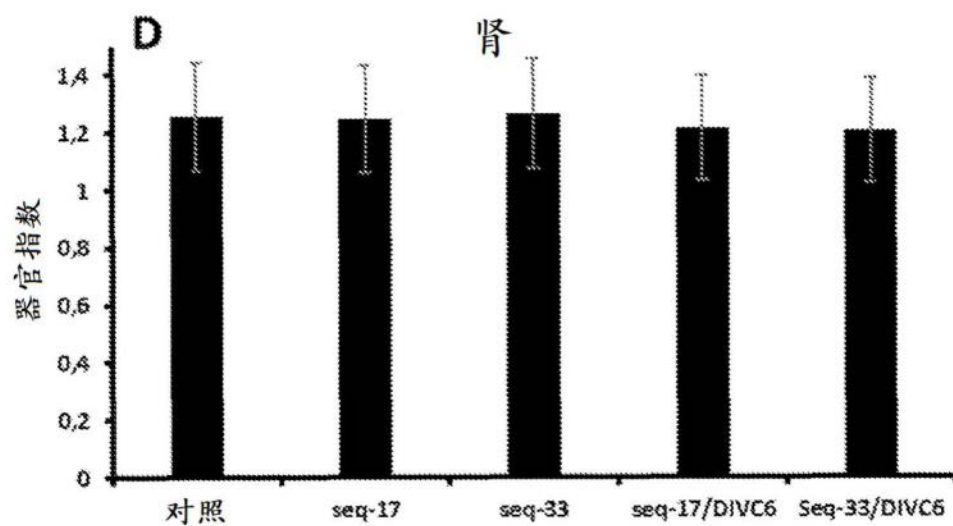


图18D

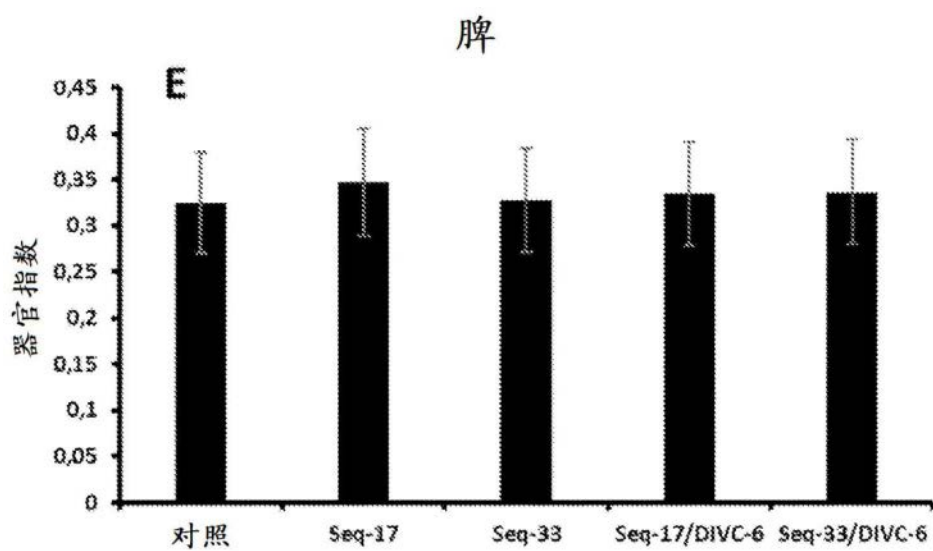


图18E

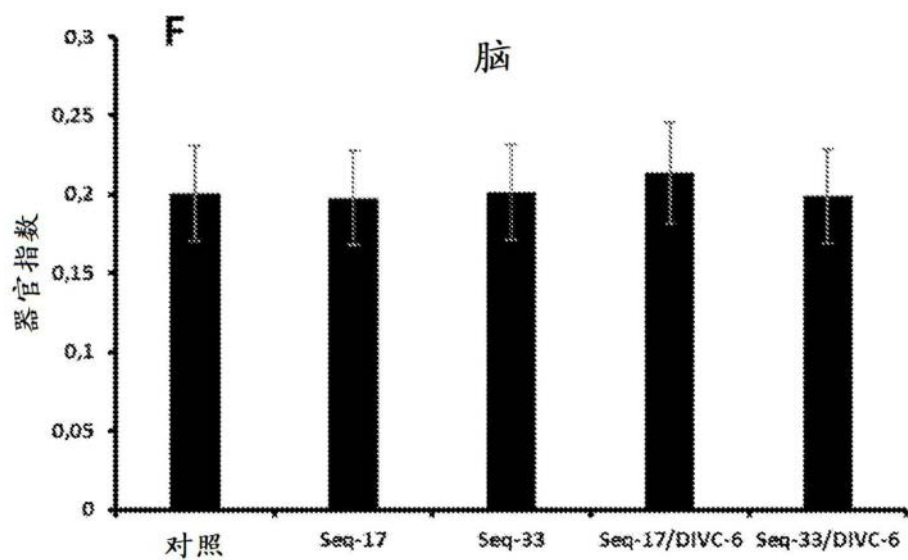


图18F

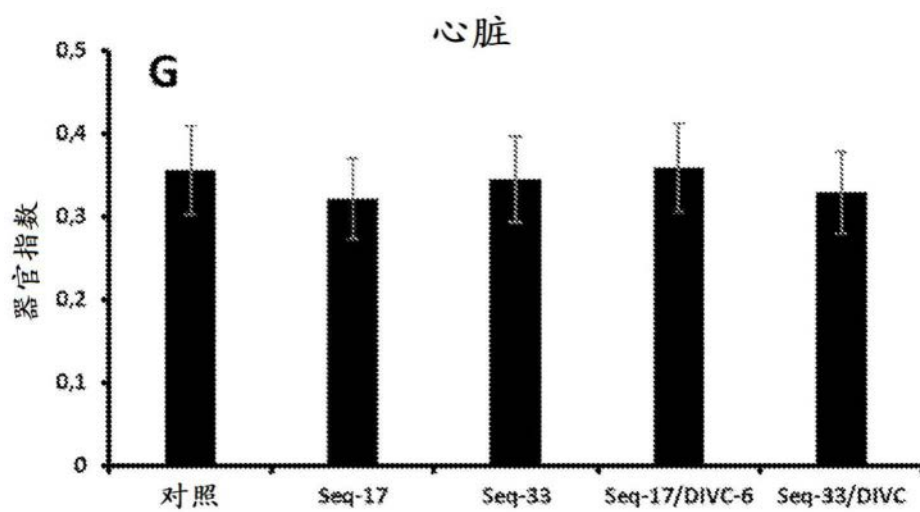


图18G

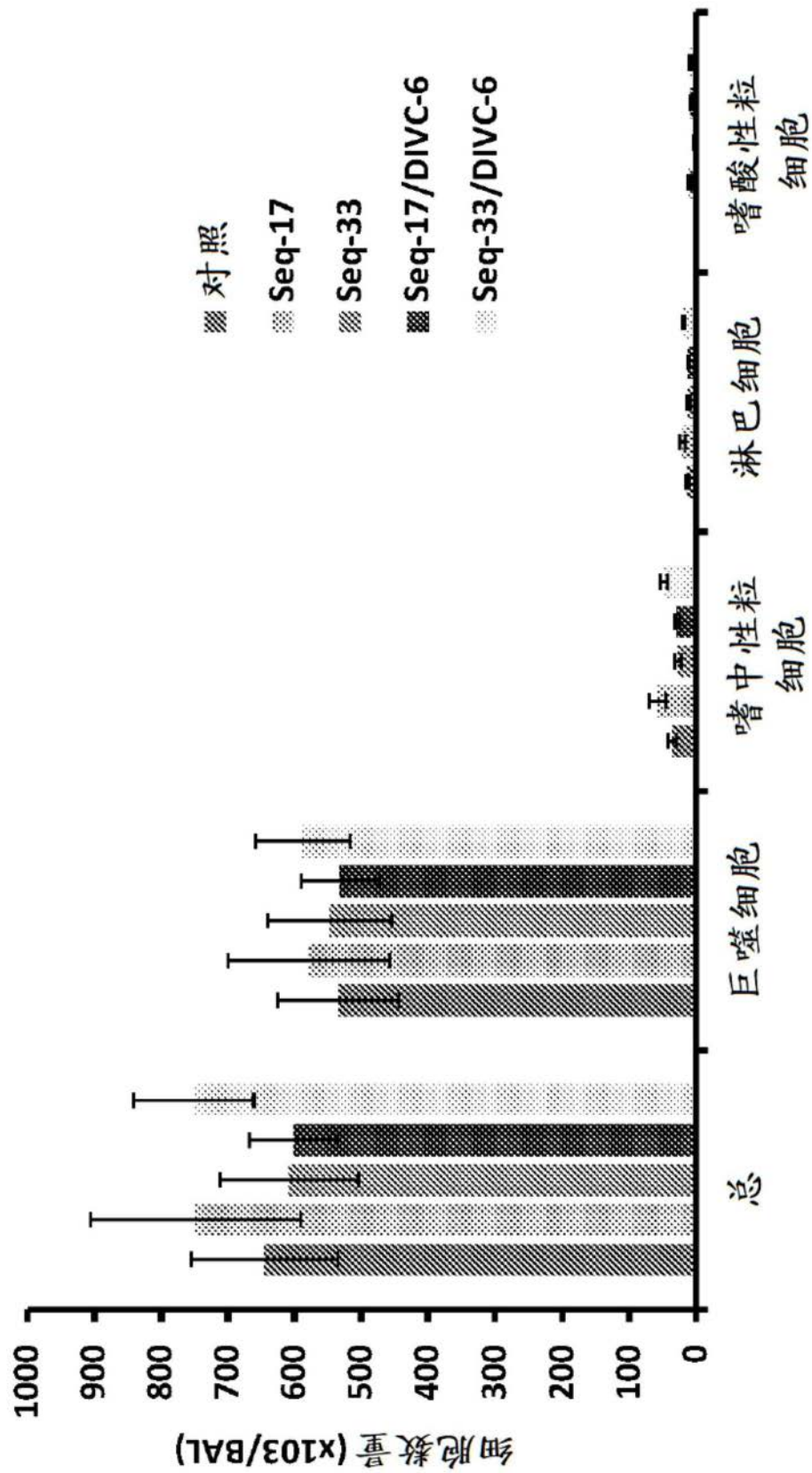


图19A

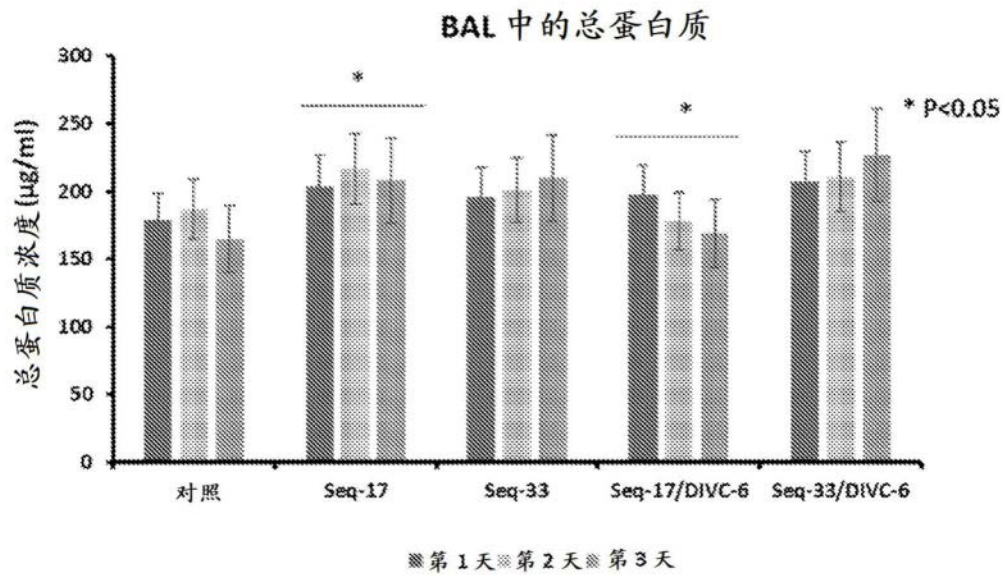


图19B

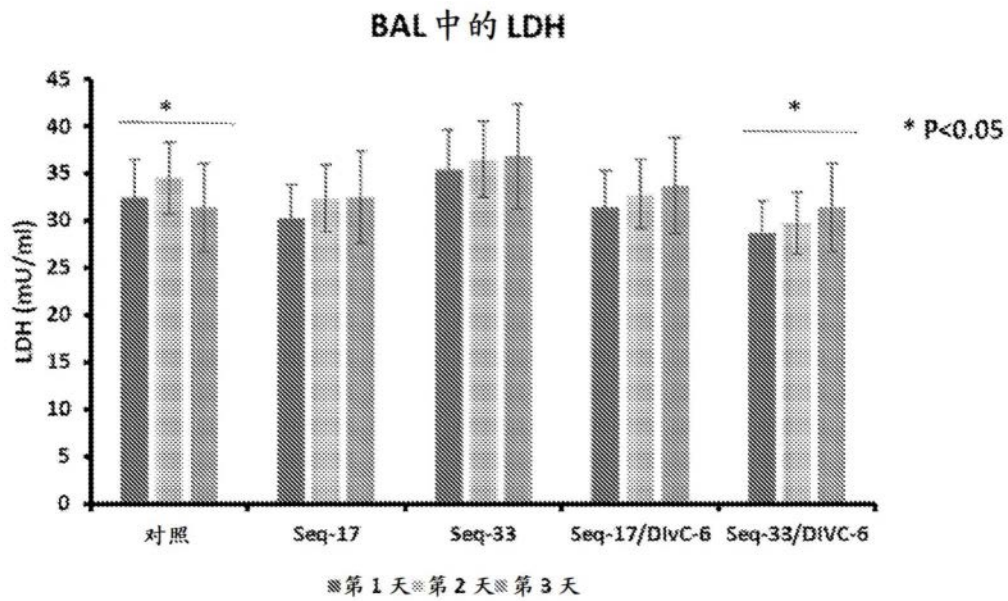


图19C

SARS-COV2 抑制剂的体内表征-血浆中的 AST 和 ALT 测定

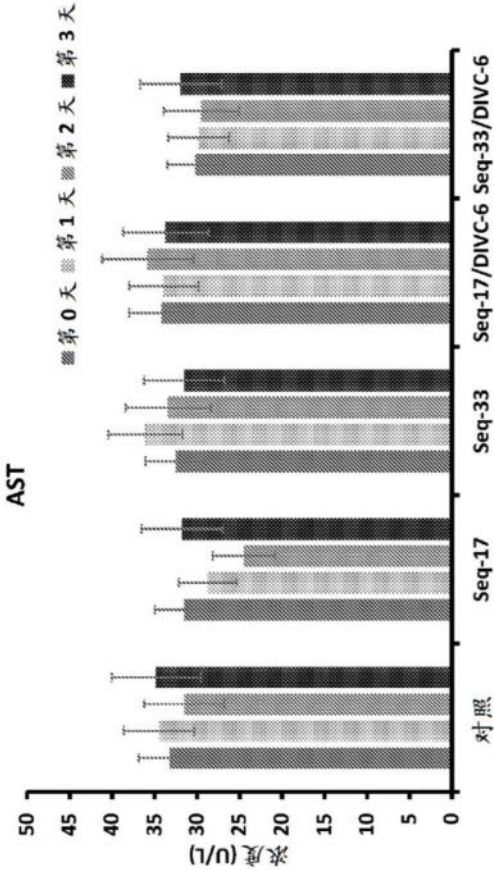


图 20A

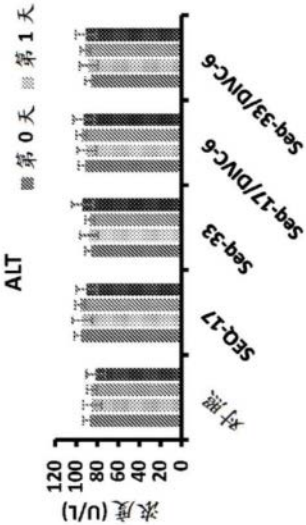


图 20B