



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119677782 A

(43) 申请公布日 2025. 03. 21

(21) 申请号 202380037493.3

(22) 申请日 2023.03.31

(30) 优先权数据

22166380.0 2022.04.01 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.10.30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2023/058432 2023.03.31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/187142 EN 2023.10.05

(71) 申请人 柏林自由大学

地址 德国

申请人 柏林合作研究学会

(72) 发明人 丹尼尔·劳斯特尔 罗宾·迪恩

塔季亚纳·波沃洛茨基

马库斯·巴尔杜阿

克里斯蒂安·哈肯贝格尔

塞巴斯蒂安·弗洛雷斯 扬·马雷

安德烈亚斯·赫尔曼

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

专利代理师 张福誉 陈九洲

(51) Int.Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 38/08 (2019.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

权利要求书2页 说明书18页

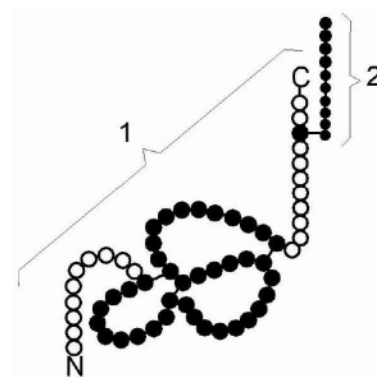
序列表(电子公布) 附图23页

(54) 发明名称

具有黏膜黏附性和病毒结合特性的双功能肽

(57) 摘要

本发明涉及双功能肽,其包含病毒结合部分(2)和与病毒结合部分(2)共价结合的黏蛋白结合部分(1)。病毒结合部分选自与SARS-CoV-2、甲型流感、乙型流感、鼻病毒和其他肠道病毒、人副流感病毒和/或偏肺病毒结合的肽。黏蛋白结合部分选自凝集素,例如三叶因子3。



1. 肽,其包含病毒结合部分(2)和与所述病毒结合部分(2)共价结合的黏蛋白结合部分(1),

其特征在于:所述病毒结合部分(2)包含或者是与以下具有至少95%同一性的肽:

SEQ ID NO.2,SEQ ID NO.3,SEQ ID NO.4,SEQ ID NO.5,SEQ ID NO.6,SEQ ID NO.7,SEQ ID NO.8,SEQ ID NO.9,SEQ ID NO.10,SEQ ID NO.11,SEQ ID NO.12,SEQ ID NO.13,SEQ ID NO.23,SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.25,SEQ ID NO.26,SEQ ID NO.27,SEQ ID NO.28,SEQ ID NO.29,SEQ ID NO.30,SEQ ID NO.31,SEQ ID NO.32,SEQ ID NO.33,SEQ ID NO.34,SEQ ID NO.35,SEQ ID NO.36,SEQ ID NO.37,SEQ ID NO.38,SEQ ID NO.39,SEQ ID NO.40,SEQ ID NO.41,SEQ ID NO.42,SEQ ID NO.43,SEQ ID NO.48,SEQ ID NO.49,SEQ ID NO.50,SEQ ID NO.51,SEQ ID NO.52,SEQ ID NO.53,SEQ ID NO.54,SEQ ID NO.55,SEQ ID NO.56,SEQ ID NO.57,SEQ ID NO.58,SEQ ID NO.59,SEQ ID NO.60,SEQ ID NO.61,SEQ ID NO.62,或SEQ ID NO.63;

以及

所述黏蛋白结合部分(1)包含或者是与SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.14、SEQ ID NO.20、SEQ ID NO.21或SEQ ID NO.22具有至少95%同一性的肽。

2. 根据权利要求1所述的肽,其特征在于所述黏蛋白结合部分(1)包含或者是与SEQ ID NO.1具有至少95%同一性的三叶因子3肽。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的肽,其特征在于所述肽包含至少两个病毒结合部分(2),其中所述黏蛋白结合部分(1)与所述至少两个病毒结合部分(2)中的至少一个共价结合。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的肽,其特征在于所述病毒结合部分(2)包含或者是与以下具有至少95%同一性的肽:

SEQ ID NO.2,SEQ ID NO.3,SEQ ID NO.4,SEQ ID NO.5,SEQ ID NO.6,SEQ ID NO.7,SEQ ID NO.8,SEQ ID NO.9,SEQ ID NO.10,SEQ ID NO.11,SEQ ID NO.12,SEQ ID NO.13,SEQ ID NO.23,SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.25,SEQ ID NO.26,SEQ ID NO.27,SEQ ID NO.28,SEQ ID NO.29,SEQ ID NO.30,SEQ ID NO.31,SEQ ID NO.32,SEQ ID NO.33,SEQ ID NO.34,SEQ ID NO.35,SEQ ID NO.36,SEQ ID NO.37,SEQ ID NO.38,SEQ ID NO.39,SEQ ID NO.40,SEQ ID NO.41,SEQ ID NO.42,或SEQ ID NO.43。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的肽,其特征在于:所述病毒结合部分(2)是与SEQ ID NO.2具有至少95%同一性的肽,以及所述黏蛋白结合部分(1)是与SEQ ID NO.1具有至少95%同一性的三叶因子3肽。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的肽,其特征在于:所述病毒结合部分(2)是与SEQ ID NO.3具有至少95%同一性的肽,以及所述黏蛋白结合部分(1)是与SEQ ID NO.1具有至少95%同一性的三叶因子3肽。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的肽,其特征在于所述肽与SEQ ID NO.18具有至少95%同一性。

8. 根据权利要求1至6中任一项所述的肽,其特征在于所述肽与SEQ ID NO.19具有至少95%同一性。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的肽,其用于预防或治疗病毒感染。

10. 根据权利要求1至7中任一项所述的、根据权利要求9所述应用的肽,其特征在于所述病毒感染是SARS-CoV-2感染。

11. 药物,其包含根据权利要求1至7中任一项所述的肽作为药物活性成分。

12. 根据权利要求11所述的药物,其特征在于所述药物被设计和配置成作为鼻喷雾剂或作为吸入喷雾剂进行施用。

13. 用于制备根据权利要求1至7中任一项所述的肽的方法,其包括以下步骤:

a) 使病毒结合部分前体与第一黏蛋白结合部分前体反应,所述第一黏蛋白结合部分前体包含黏蛋白结合部分(1)的第一部分,从而获得肽前体;以及

b) 使所述肽前体与第二黏蛋白结合部分前体反应,所述第二黏蛋白结合部分前体包含所述黏蛋白结合部分(1)的第二部分。

14. 根据权利要求13所述的方法,其特征在于所述病毒结合部分前体包含与病毒结合部分(2)共价结合的4-戊炔基部分。

15. 根据权利要求13或14所述的方法,其特征在于所述第一黏蛋白结合部分前体包含所述黏蛋白结合部分(1)的所有氨基酸的少于一半的氨基酸。

具有黏膜黏附性和病毒结合特性的双功能肽

[0001] 本发明涉及:根据权利要求1的前序部分所述的双功能肽,根据权利要求9的前序部分所述的这样的肽的医学用途,根据权利要求11的前序部分所述的包含这样的肽的药物,以及根据权利要求13的前序部分所述的用于制备这样的肽的方法。

[0002] 正在持续的SARS-CoV-2大流行表明,新出现和反复出现的病毒病原体对人群是持续性的威胁,需要快速和特异性响应来遏制广泛的病毒传播。尽管迅速实施了卫生学概念以减缓病毒传播,但疫苗和抗病毒治疗仍是对抗传染病的主要措施。然而,疫苗的开发和测试通常需要数年时间。抗病毒治疗为治疗已感染的个体提供了快速的解决方案。与大分子(例如蛋白质或肽)相比,小的有机化合物在抗病毒药物中占主导地位。然而,新的小分子药物的开发具有挑战性,因为它们的化学性质通常复杂,并因此难以制备具有大量多种不同的化合物类似物的筛选物。另外,抗性的发展是日益严重的问题,如抗流感的抗病毒药物(例如奥司他韦(oseltamivir)或金刚烷胺(amantadine))所证明的。

[0003] 预防性治疗作为对抗SARS-CoV-2大流行的另外的措施目前还没有得到使用,其是未抓住的可带来数种优势的机会。

[0004] Werner Hoffmann描述了来自三叶因子(trefoil factor, TFF3)和IgG-Fc结合蛋白(IgG-Fc-binding protein, FCGBP)的异二聚体。

[0005] 本发明的一个目的是提供用于预防性治疗病毒性疾病、理想地避免病毒感染的新的物质。

[0006] 该目的通过具有权利要求1的权利要求要素的肽来实现。这样的肽是双功能肽,其包含病毒结合部分和与病毒结合部分共价结合的黏蛋白结合部分。病毒结合部分和黏蛋白结合部分之间的结合可以是直接共价结合或通过接头的结合。

[0007] 病毒结合部分包含或者是与以下具有至少95%、特别是至少96%、特别是至少97%、特别是至少98%、特别是至少99%、特别是100%同一性的肽:

SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13, SEQ ID NO. 23, SEQ ID NO. 24, SEQ ID NO. 25, SEQ ID NO. 26, SEQ ID NO. 27, SEQ ID NO. 28, SEQ ID NO. 29, SEQ ID NO. 30, SEQ ID NO. 31, SEQ ID NO. 32, [0008] SEQ ID NO. 33, SEQ ID NO. 34, SEQ ID NO. 35, SEQ ID NO. 36, SEQ ID NO. 37, SEQ ID NO. 38, SEQ ID NO. 39, SEQ ID NO. 40, SEQ ID NO. 41, SEQ ID NO. 42, SEQ ID NO. 43, SEQ ID NO. 48, SEQ ID NO. 49, SEQ ID NO. 50, SEQ ID NO. 51, SEQ ID NO. 52, SEQ ID NO. 53, SEQ ID NO. 54, SEQ ID NO. 55, SEQ ID NO. 56, SEQ ID NO. 57, SEQ ID NO. 58, SEQ ID NO. 59, SEQ ID NO. 60, SEQ ID NO. 61, SEQ ID NO. 62, 或 SEQ ID NO. 63 。

[0009] SEQ ID NO. 2至13和23至43涉及特别适于与严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)结合的病毒结合部分。而SEQ ID NO. 2、3和23至41涉及线性病毒结合肽,SEQ ID NO. 4至13、42和43涉及部分环化的肽,即所谓的订书钉化肽(stapled peptide)。它们在两个不直接相邻(但仍在附近)的氨基酸之间包含至少一个桥。该桥像订书钉一样起作用,并且用于稳定相应的肽。桥可通过

相应氨基酸残基的两条侧链建立,或者通过除它们的常规侧链之外的与相应氨基酸残基共价结合的化学部分建立。在SEQ ID NO.42和43的情况下,桥是在两个半胱氨酸残基之间形成的二硫桥。

[0010] SEQ ID NO.48描述了特别适于结合甲型流感病毒(特别是H1、H3、H7毒株)的肽。该肽靶向甲型流感病毒的血凝素(HA蛋白),并且由Memczak et al.和Miriam Hoffmann et al.描述。

[0011] SEQ ID NO.49和50描述了特别适于结合甲型流感病毒(特别是H5N1毒株2.3.4分支,鸟类毒株(bird strain))的肽。这些肽靶向甲型流感病毒的血凝素(HA蛋白),并且来源于由Zuo et al.描述的抗体65C6的序列。

[0012] SEQ ID NO.51和52描述了特别适于结合甲型流感病毒(特别是H5N1毒株2.3.2.1分支,鸟类毒株)的肽。这些肽靶向在该毒株变体的HA蛋白中普遍存在的血凝素(HA蛋白)的特异性序列,例如在由Bui et al.描述的HA蛋白的序列中。

[0013] SEQ ID NO.53和54描述了特别适于结合乙型流感病毒的肽。这些肽靶向乙型流感病毒的神经氨酸酶,并且由Madsen et al.描述。

[0014] SEQ ID NO.55和56描述了特别适于结合鼻病毒(rhinovirus,RV)和其他肠道病毒(enterovirus,EV)的肽。这些肽来源于抗RV抗体,其由Hrebik et al.、Khan et al.和Smith et al.描述。

[0015] SEQ ID NO.57描述了特别适于结合人副流感病毒(human parainfluenza virus, HPIV)(特别是HIPV1和HIPV3毒株)的肽。该肽靶向HPIV的融合蛋白(F蛋白),并且来源于由Cabán et al.描述的抗HPIV抗体。

[0016] SEQ ID NO.58、59和60描述了特别适于结合偏肺病毒(metapneuvirus,MPV)和呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus,RSV)(特别是A亚型和/或B亚型)的肽。这些肽靶向MPV和RSV的融合蛋白(F蛋白)。它们来源于抗HPIV抗体,并且由Cabán et al.描述。

[0017] SEQ ID NO.61、62和63描述了特别适于结合RSV(特别是A亚型和/或B亚型)的肽。这些肽也靶向RSV的融合蛋白(F蛋白),并且由Issmail et al.、Zhu et al.和McLellan et al.描述。

[0018] 黏蛋白结合部分包含或者是与以下具有至少95%、特别是至少96%、特别是至少97%、特别是至少98%、特别是至少99%、特别是100%同一性的肽:SEQ ID NO.1(经修饰的三叶因子3,TFF3(C57K))、SEQ ID NO.14(天然TFF3)、SEQ ID NO.20(天然TFF1)、SEQ ID NO.21(天然TFF2)或SEQ ID NO.22(木菠萝凝集素(jacalin))。这些凝集素特别适于靶向患者的肠黏膜。TFF3是在气道中天然产生的蛋白质(Thim et al.2002)。

[0019] 本发明要求保护的肽能够增强呼吸道黏液的天然屏障功能。呼吸道黏液是呼吸道病原体接近它们呼吸道上皮靶细胞过程中遇到的第一道物理屏障。由于其高黏度和微生物结合特性,黏液是我们身体抗菌防御系统的重要部分并且通过纤毛运动有效清除吸附的病原体。本发明要求保护的肽可用于通过并入病毒病原体的结合位点来提高其抗菌特性,从而增强黏液(黏液增强)。然后滞留的病原体可以在到达上皮细胞层之前被清除,从而防止感染。因此,本方法是使用模块化仿生肽来提高和支持黏液的抗病毒效力。

[0020] 黏液增强是用于保护人们免受呼吸道感染的新的概念。本方法可与其他(非)药理学措施组合,以在未感染个体中降低感染的风险以及在已感染个体中降低传播和严重疾病

的风险。

[0021] 本发明要求保护的肽构成了可调节的基于肽的系统的核心,该系统具有可黏附于气道黏蛋白并且特异性吸附病毒的分子。肽的两个部分都可适应于响应快速变化的情况。这种仿生方法加强了黏液的天然抗病毒特性,并且由于肽组分来源于人蛋白质,所以认为副作用较低。双功能肽还可用于受感染患者的治疗,因为其也将捕获从受感染细胞中释放的病毒,从而降低病毒滴度并脱落到环境中。最后,本方法可与已建立的抗病毒措施组合,共同帮助降低感染的风险以及最小化疾病的风险。

[0022] 由于所要求保护的肽的模块化组成,肽的两个功能性部分都可适应于期望的应用。

[0023] 用于在黏蛋白结合部分和病毒结合部分之间建立共价结合的合适接头是聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)接头或氨基酸接头,所述氨基酸接头包含1至20个氨基酸、特别是2至19个氨基酸、特别是3至18个氨基酸、特别是4至17个氨基酸、特别是5至16个氨基酸、特别是6至15个氨基酸、特别是7至14个氨基酸、特别是8至13个氨基酸、特别是9至12个氨基酸、特别是10至11个氨基酸。二肽,例如GT二肽,是特别合适的接头。包含与SEQ ID NO.44、SEQ ID NO.45、SEQ ID NO.46或SEQ ID NO.47具有至少95%、特别是至少96%、特别是至少97%、特别是至少98%、特别是至少99%、特别是100%同一性的氨基酸序列的接头,或者由所述氨基酸序列组成的接头,也是特别合适的接头。SEQ ID NO.44是柔性接头的实例。SEQ ID NO.45是刚性接头的实例。SEQ ID NO.46代表由通过分选酶A(Sortase A)的化学-酶促偶联反应产生的连接肽。SEQ ID NO.47代表由通过转谷氨酰胺酶的化学-酶促偶联反应产生的连接肽。病毒结合部分或黏蛋白结合部分肽通过 γ -谷氨酰基- ϵ -赖氨酰基异肽键与谷氨酰基残基(Q7)偶联。

[0024] 在一个实施方案中,黏蛋白结合部分包含糖表位(glycotope)结合结构域,并且以以下亲和力与N-乙酰葡萄糖胺- α -1,4-半乳糖(N-acetylglucosamine- α -1,4-galactose, GlcNAc- α -1,4-Gal)二糖结合:至少150 μ M、特别是至少100 μ M、特别是至少75 μ M、特别是至少50 μ M、特别是至少25 μ M的亲和力,特别是以在25 μ M至150 μ M、特别是50 μ M至125 μ M,特别是75 μ M至100 μ M范围内的亲和力。GlcNAc- α -1,4-Gal二糖是特异性存在于黏蛋白(例如黏蛋白2(mucin 2, Muc2)、黏蛋白5AC(mucin 5AC, Muc5AC)和黏蛋白6(mucin 6, Muc6))中的糖表位。举例来说,天然三叶因子3(TFF3)对56 μ M的GlcNAc- α -1,4-Gal二糖具有结合亲和力(Järvå et al 2020)。

[0025] 在一个实施方案中,病毒结合部分在黏蛋白结合部分的第57位氨基酸处与黏蛋白结合部分共价结合。在一个实施方案中,第57位氨基酸是半胱氨酸残基。在一个实施方案中,第57位氨基酸是赖氨酸残基。在一个实施方案中,病毒结合部分在黏蛋白结合部分的C端与黏蛋白结合部分共价结合。特别是在后一个实施方案中,在黏蛋白结合部分的第57位(或在任何其他位置)上存在哪种氨基酸对于与病毒结合部分的结合能力没有特别的重要性。

[0026] 在一个实施方案中,肽包含至少两个病毒结合部分。在这种情况下,黏蛋白结合部分直接或通过接头与至少两个病毒结合部分中的至少一个共价结合。黏蛋白结合部分也可与超过一个的病毒结合部分结合。出于此目的,在一个实施方案中,分叉的接头(bifurcated linker)特别有帮助。这样的分叉的接头可用于将单个黏蛋白结合部分与多

个病毒结合部分偶联,所述多个病毒结合部分在偶联之后与黏蛋白结合部分距离差不多相等排列。

[0027] 在一个实施方案中,病毒结合部分是适于结合病毒刺突蛋白的部分。

[0028] 在一个实施方案中,病毒结合部分是肽。在一个实施方案中,病毒结合部分是抗微生物肽,例如防御素。retrocyclin是特别合适的防御素。在另一个实施方案中,病毒结合部分是非肽抗病毒残基,例如树突状或线性多硫酸盐/酯或多糖。

[0029] 在一个实施方案中,病毒结合部分包含或者是与以下具有至少95%、特别是至少96%、特别是至少97%、特别是至少98%、特别是至少99%、特别是100%同一性的肽:

SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13, SEQ ID NO. 23, SEQ ID NO. 24, SEQ ID NO. 25, SEQ ID NO. 26, SEQ ID NO. 27, SEQ ID NO. 28, SEQ ID NO. 29, SEQ ID NO. 30, SEQ ID NO. 31, SEQ ID NO. 32, SEQ ID NO. 33, SEQ ID NO. 34, SEQ ID NO. 35, SEQ ID NO. 36, SEQ ID NO. 37, SEQ ID NO. 38, SEQ ID NO. 39, SEQ ID NO. 40, SEQ ID NO. 41, SEQ ID NO. 42, 或 SEQ ID NO. 43

[0031] 这些序列涉及特别适于结合严重急性呼吸综合征冠状病毒2 (SARS-CoV-2) 的病毒结合部分。

[0032] 在一个实施方案中,病毒结合部分是肽,其中该肽的至少一个残基携带替换。在一个实施方案中,肽的C端被氨基基团替换。在一个实施方案中,肽的N端被乙酰基基团替换。在一个实施方案中,肽的C端被氨基基团替换,并且肽的N端被乙酰基基团替换。

[0033] 在一个实施方案中,病毒结合部分是 SEQ ID NO. 2 具有至少95%、特别是至少96%、特别是至少97%、特别是至少98%、特别是至少99%、特别是100%同一性的肽,并且黏蛋白结合部分 (1) 是与 SEQ ID NO. 1 具有至少95%、特别是至少96%、特别是至少97%、特别是至少98%、特别是至少99%、特别是100%同一性的三叶因子3肽。SEQ ID NO. 2 描述了表示为p4的肽,该肽在过去已经显示出以高亲和力与严重急性呼吸综合征冠状病毒1 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 1, SARS-CoV-1) 结合 (Han et al., 2006)。尽管 SARS-CoV-1 和 SARS-CoV-2 之间存在结构差异,但出乎意料地发现 p4 肽也非常适于与 SARS-CoV-2 结合。

[0034] 在一个实施方案中,病毒结合部分是 SEQ ID NO. 3 具有至少95%、特别是至少96%、特别是至少97%、特别是至少98%、特别是至少99%、特别是100%同一性的肽,并且黏蛋白结合部分 (1) 是与 SEQ ID NO. 1 具有至少95%、特别是至少96%、特别是至少97%、特别是至少98%、特别是至少99%、特别是100%同一性的三叶因子3肽。SEQ ID NO. 3 描述了表示为p6的肽,该肽在过去已经显示出以高亲和力与严重急性呼吸综合征冠状病毒1 (SARS-CoV-1) 结合 (Han et al., 2006)。尽管 SARS-CoV-1 和 SARS-CoV-2 之间存在结构差异,但出乎意料地发现, p6 肽也非常适于与 SARS-CoV-2 结合。因此,就 SARS-CoV-2 而言, p6 肽的结合亲和力大约是 p4 肽的亲和力的两倍高。有趣的是, p6 还能以比 SARS-CoV-2 野生型甚至更高的亲和力结合 SARS-CoV-2 变体 α 和 δ (参见表1)。

[0035] 观察到相比于线性 p6 肽, p6 肽的订书钉化变体对 SARS-CoV-2 的亲和力甚至更高。在一个实施方案中,病毒结合部分是 SEQ ID NO. 10 具有至少95%、特别是至少96%、特别

是至少97%、特别是至少98%、特别是至少99%、特别是100%同一性的肽。该肽是p6肽的订书钉化变体。在下文中,其也被称为p6-cyc或p6(R)₁₅(S)₂₂。

[0036] 下表1中总结了不同病毒结合部分对SARS-CoV-2的结合亲和力(表示为解离常数Kd)。其是通过微量热泳动(microscale thermophoresis, MST)确定的。可以清楚地看到, p4和p6肽(后者呈其线性呈其环化形式二者)以纳摩尔的结合常数与目前传播的SARS-CoV-2变体的数个受体结合结构域结合。

[0037] 表1:不同病毒结合部分的特性。

肽名称	序列 ^{*1}	SEQ ID NO.	SARS-CoV-2 靶毒株	Kd/ μ M	PBS/% ^{*2} 中的螺旋度	PBS:TFE, 1:1 ^{*3} 中的螺旋度
p4	EEQAKTFLDKFNHEA EDLFYQSS	2	2019-nCov	0.93 $\pm$ 0.21	0	100
p6	EEQAKTFLDKFNHEA EDLFYQSSGLGKDF R	3	2019-nCov	0.45 $\pm$ 0.10	0	39
p6-cyc	EEQAKTFLDKFNHEX EDLFYQXSGLGKDF R	10	2019-nCov	0.27 $\pm$ 0.14	25	43
p6	见上文	3	B.1.1.7 (α)	0.32 $\pm$ 0.06	0	39
p6	见上文	3	B.1.617.2 (δ)	0.19 $\pm$ 0.09	0	39
p6	见上文	3	B.1.1.529 ($\omicron$)	0.28	0	39

[0039] ^{*1}在p6-cyc的第15位的X(X₁₅)是烯基化(R)-Ala残基;在p6-cyc的第22位的X(X₂₂)是烯基化(S)-Ala残基;该肽通过7-十一碳烯基残基在X₁₅和X₂₂之间具有环化。

[0040] ^{*2}PBS=磷酸缓冲盐水(phosphate-buffered saline)

[0041] ^{*3}TFE=三氟乙醇(trifluoroethanol)

[0042] 在一个实施方案中,肽与SEQ ID NO.18或SEQ ID NO.19具有至少95%、特别是至少96%、特别是至少97%、特别是至少98%、特别是至少99%、特别是100%同一性。这些SEQ ID NO.涉及合成的和重组的TFF-3-p6肽,这些肽被证明具有非常适合用于解决本发明目的的特性。

[0043] 在一个方面中,本发明涉及根据先前说明的肽作为药物的用途。

[0044] 在一个方面中,本发明涉及根据先前说明的肽在预防或者治疗病毒感染中的医学用途。

[0045] 在一个实施方案中,待治疗或预防的病毒感染是SARS-CoV-2感染。

[0046] 在一个方面中,本发明涉及用于在需要这样的治疗的患者中治疗或预防病毒感染的医学方法。如本文中使用的术语“患者”涉及人或动物患者。哺乳动物是特别合适的动物患者。方法包括向患者施用根据先前说明的肽的步骤(例如,以包含该肽的药物的形式)。在

一个实施方案中,这种施用是通过将肽提供给患者的鼻或口来完成的。这可通过以喷雾剂的剂型提供肽而特别容易实现。然后,可施用肽,例如作为如鼻喷雾剂或吸入喷雾剂的气雾剂。在施用之后,其将接着接触患者的黏膜,并且将允许肽通过黏蛋白结合部分与黏膜的结合。之后,肽将在患者的黏膜上保持其结合形式,并且由于其病毒结合部分将能够从患者吸入的空气中“过滤”出病毒。

[0047] 在一个方面中,本发明涉及用于在有此需要的患者中增强黏液的医学方法。该方法包括向患者施用根据先前说明的肽的步骤(例如,以包含该肽的药物的形式)。

[0048] 在一个方面中,本发明涉及包含根据先前说明的肽作为药物活性成分的药物。该药物可包含其他药物活性成分。在一个实施方案中,肽是唯一的药物活性成分。

[0049] 在一个实施方案中,配制药剂使其可作为气雾剂(例如鼻喷雾剂或吸入喷雾剂)施用。然后,药物(以及随其作为药物活性成分的肽)在其施用之后直接接触鼻咽区的黏膜。这进而导致如上所说明的黏液增强。作为结果,患者的黏液被更好地准备以结合并随后消除患者所面对的病毒(通过从环境中吸入病毒,或者通过从患者身体的经病毒感染的细胞中呼出病毒)。

[0050] 在一个方面中,本发明涉及用于制备根据先前说明的肽的方法。该方法包括如下说明的步骤。首先,病毒结合部分前体与第一黏蛋白结合部分前体反应。在这种情况下,第一黏蛋白结合部分前体包含最终黏蛋白结合部分的第一部分。该反应导致肽前体的形成。

[0051] 之后,肽前体与第二黏蛋白结合部分前体反应。第二黏蛋白结合部分前体包含黏蛋白结合部分的第二部分。作为该第二反应步骤的结果,形成了最终肽。当然,也可完成其他中间反应步骤。举一个实例,可将黏蛋白结合部分分成超过两个黏蛋白结合部分前体。然后,将单独的黏蛋白结合部分前体一个接一个地与已形成的肽前体反应,以最终产生肽。

[0052] 在一个实施方案中,病毒结合部分前体包含与最终肽的黏蛋白结合部分建立共价键的4-戊炔基部分。该4-戊炔基部分可仍存在(全部或部分)于最终肽中。在一个实施方案中,其可充当病毒结合部分和黏蛋白结合部分之间的接头。

[0053] 在一个实施方案中,肽包含在病毒结合部分和黏蛋白结合部分之间充当接头的三唑残基。在一个实施方案中,肽包含在病毒结合部分和黏蛋白结合部分之间充当接头的聚乙二醇残基。在一个实施方案中,这样的聚乙二醇残基与三唑残基组合以形成接头。

[0054] 在一个实施方案中,第一黏蛋白结合部分前体包含黏蛋白结合部分所有氨基酸的少于一半。如果仅使用两个黏蛋白结合部分前体,那么第二黏蛋白结合部分前体包含黏蛋白结合部分所有氨基酸的超过一半。举一个具体的实例,第一黏蛋白结合部分前体包含黏蛋白结合部分的第36至59位氨基酸,所述黏蛋白结合部分在该实施方案中是三叶因子3肽。此外,第二黏蛋白结合部分前体包含黏蛋白弯曲部分的第1至35位氨基酸。在第一黏蛋白结合部分前体(对应于黏蛋白结合部分的C端部分)与病毒结合部分反应之后,进行第二黏蛋白结合部分前体(对应于黏蛋白结合部分的N端部分)与已形成的第一黏蛋白结合部分前体和病毒结合部分的构建体(即肽前体)的反应。作为结果,形成了最终肽。

[0055] 肽的所有实施方案可以以任何期望的方式组合,并且可以单独或以任何任意方式转移至用途、药物和不同方法中。同样,不同用途的所有实施方案可以以任何期望的方式组合,并且可以单独或以任何任意方式转移至肽、相应的其他用途、药物和不同方法中。同样,药物的所有实施方案可以以任何期望的方式组合,并且可以单独或以任何任意方式转移至

肽、不同用途和不同方法中。此外,不同方法的所有实施方案可以以任何期望的方式组合,并且可以单独或以任何任意方式转移至肽、不同用途和相应的其他方法中。

[0056] 以下将参考示例性实施方案和附图来说明本发明方面的另一些细节。在图中:

[0057] 图1A示意性地示出了双功能肽的第一个实施方案的结构;

[0058] 图1B示意性地示出了双功能肽的第二个实施方案的结构;

[0059] 图2A示出了对应于SEQ ID NO.15的第一黏蛋白结合部分前体的一个实施方案的一级结构;

[0060] 图2B示出了对应于SEQ ID NO.16的第二黏蛋白结合部分前体的一个实施方案的一级结构;

[0061] 图2C示出了对应于SEQ ID NO.17的病毒结合部分前体的一个实施方案的一级结构;

[0062] 图3示出了对应于SEQ ID NO.18的肽的一个实施方案的一级结构,该肽包含由图2A和2B的第一和第二黏蛋白结合部分前体形成的黏蛋白结合部分,以及由图2C的病毒结合部分前体形成的病毒结合部分;

[0063] 图4示出了对应于SEQ ID NO.4的病毒结合部分的一个实施方案的一级结构;

[0064] 图5示出了对应于SEQ ID NO.5的病毒结合部分的一个实施方案的一级结构;

[0065] 图6示出了对应于SEQ ID NO.6的病毒结合部分的一个实施方案的一级结构;

[0066] 图7示出了对应于SEQ ID NO.7的病毒结合部分的一个实施方案的一级结构;

[0067] 图8示出了对应于SEQ ID NO.8的病毒结合部分的一个实施方案的一级结构;

[0068] 图9示出了对应于SEQ ID NO.9的病毒结合部分的一个实施方案的一级结构;

[0069] 图10示出了对应于SEQ ID NO.10的病毒结合部分的一个实施方案的一级结构;

[0070] 图11示出了对应于SEQ ID NO.11的病毒结合部分的一个实施方案的一级结构;

[0071] 图12示出了对应于SEQ ID NO.12的病毒结合部分的一个实施方案的一级结构;

[0072] 图13示出了对应于SEQ ID NO.13的病毒结合部分的一个实施方案的一级结构;

[0073] 图14示出了举例说明p6肽与不同SARS-CoV-2变体之间的结合亲和力的图;

[0074] 图15示出了举例说明对应于SEQ ID NO.18的双功能合成TFF3-p6肽与不同SARS-CoV-2变体之间的结合亲和力的图;

[0075] 图16示出了举例说明对应于SEQ ID NO.23的p4肽变体与SARS-CoV-2 (2019-nCoV)的受体结合结构域之间的结合亲和力的图;

[0076] 图17示出了举例说明对应于SEQ ID NO.24的p4肽变体与SARS-CoV-2 (2019-nCoV)的受体结合结构域之间的结合亲和力的图;

[0077] 图18示出了举例说明对应于SEQ ID NO.25的p4肽变体与SARS-CoV-2 (2019-nCoV)的受体结合结构域之间的结合亲和力的图;

[0078] 图19示出了举例说明对应于SEQ ID NO.26的p4肽变体与SARS-CoV-2 (2019-nCoV)的受体结合结构域之间的结合亲和力的图;

[0079] 图20示出了举例说明对应于SEQ ID NO.28的p4肽变体与SARS-CoV-2 (2019-nCoV)的受体结合结构域之间的结合亲和力的图;

[0080] 图21示出了举例说明对应于SEQ ID NO.29的p4肽变体与SARS-CoV-2 (2019-nCoV)的受体结合结构域之间的结合亲和力的图;

[0081] 图22示出了举例说明对应于SEQ ID NO.30的p4肽变体与SARS-CoV-2 (2019-nCoV)的受体结合结构域之间的结合亲和力的图;

[0082] 图23示出了举例说明对应于SEQ ID NO.31的p4肽变体与SARS-CoV-2 (2019-nCoV)的受体结合结构域之间的结合亲和力的图;

[0083] 图24示出了举例说明对应于SEQ ID NO.32的p4肽变体与SARS-CoV-2 (2019-nCoV)的受体结合结构域之间的结合亲和力的图;

[0084] 图25示出了举例说明对应于SEQ ID NO.33的p4肽变体与SARS-CoV-2 (2019-nCoV)的受体结合结构域之间的结合亲和力的图;

[0085] 图26示出了举例说明对应于SEQ ID NO.34的p4肽变体与SARS-CoV-2 (2019-nCoV)的受体结合结构域之间的结合亲和力的图;

[0086] 图27示出了举例说明对应于SEQ ID NO.35的p4肽变体与SARS-CoV-2 (2019-nCoV)的受体结合结构域之间的结合亲和力的图;

[0087] 图28示出了举例说明对应于SEQ ID NO.36的p4肽变体与SARS-CoV-2 (2019-nCoV)的受体结合结构域之间的结合亲和力的图;

[0088] 图29示出了举例说明对应于SEQ ID NO.37的p4肽变体与SARS-CoV-2 (2019-nCoV)的受体结合结构域之间的结合亲和力的图;

[0089] 图30示出了举例说明对应于SEQ ID NO.38的p4肽变体与SARS-CoV-2 (2019-nCoV)的受体结合结构域之间的结合亲和力的图;

[0090] 图31示出了举例说明对应于SEQ ID NO.39的p4肽变体与SARS-CoV-2 (2019-nCoV)的受体结合结构域之间的结合亲和力的图;

[0091] 图32示出了举例说明对应于SEQ ID NO.40的p4肽变体与SARS-CoV-2 (2019-nCoV)的受体结合结构域之间的结合亲和力的图;

[0092] 图33示出了举例说明对应于SEQ ID NO.41的p6肽变体与SARS-CoV-2 (2019-nCoV)的受体结合结构域之间的结合亲和力的图;

[0093] 图34示出了举例说明对应于SEQ ID NO.42的p6肽变体与SARS-CoV-2 (2019-nCoV)的受体结合结构域之间的结合亲和力的图;

[0094] 图35示出了举例说明对应于SEQ ID NO.43的p6肽变体与SARS-CoV-2 (2019-nCoV)的受体结合结构域之间的结合亲和力的图;以及

[0095] 图36示出了举例说明对应于SEQ ID NO.19的双功能重组TFF3-p6肽与不同SARS-CoV-2变体之间的结合亲和力的图。

[0096] 图1A示意性地举例说明了双功能肽(即TFF3-p6)的第一个实施方案的结构。这是其中三叶因子3(TFF3)肽1是黏蛋白结合部分的肽,其中p6肽2是病毒结合部分。TFF3肽1具有对应于SEQ ID NO.1的一级序列。p6肽2具有对应于SEQ ID NO.3的一级序列。p6肽2与TFF3肽的第57位赖氨酸共价结合。

[0097] 图1A示出了双功能肽的一个替代实施方案。在该图和所有随后的图中,相似的要素将用相同的附图标记来表示。在此,p6肽2与TFF3肽1的C端共价结合。

[0098] TFF3-p6的合成将在下文中更详细地说明。

[0099] 对于TFF3的产生,遵循了Braga Emidio et al.2021的方案。相对于Braga Emidio et al.公布的合成路线,通过替换第57位的半胱氨酸将叠氮赖氨酸引入TFF3。

[0100] 代表第一病毒结合部分前体的一个实施方案的TFF3 (36至59) (C57AzK) 使用第57位的叠氮赖氨酸(AzK)的相应结构单元完全在Rink酰胺树脂上通过SPPS制备。

[0101] TFF3_(36至59) C57AzK [M+H]⁺=2825.31g/mol, [M+2H]³⁺/3=943.7g/mol. 一级结构如图2A中所示。

[0102] 代表第二病毒结合部分前体的一个实施方案的TFF3 (1至35) -Nbz在Rink酰胺树脂上合成,其最初通过常规偶联方法用3-苄基甲氧基羰基-4-二氨基苯甲酸(3-fluorenylmethoxycarbonyl-4-diaminobenzoic acid, Fmoc-Dbz) (5当量(eq) Fmoc-Dbz、4.9当量六氟磷酸盐氮杂苯并三唑四甲基脲(hexafluorophosphate azabenzotriazole tetramethyl uronium, HATU)、10当量N,N-二异丙基乙胺(N,N-diisopropylethylamine, Dipea),在二甲基甲酰胺(dimethylformamide, DMF)中足以制备0.2M关于3-Fmoc-4-二氨基苯甲酸(Fmoc-Dbz)的溶液)官能化。然后,进行常规的固相肽合成(solid phase peptide synthesis, SPPS)。将最后的残基作为Boc保护的氨基酸添加。将肽在树脂中组装之后,通过以下来激活C端:用对硝基苯基氯甲酸酯(5当量, CH₂Cl₂, 45分钟)酰化,随后添加碱(Dipea, 0.5M在DMF中20分钟),以促进苯胺的分子内攻击,从而形成树脂结合的苯并咪唑啉酮。使用94:2.5:2.5:1.0的三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA):1,2-乙二硫醇(1,2-Ethanedithiol, EDT):H₂O:三异丙基硅烷(Triisopropylsilane, TIPS)从树脂上进行切割,将粗制物溶解在3mL含有0.1% TFA的30%乙腈(MeCN)/H₂O中,过滤,并注入制备型高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)系统上进行纯化。TFF3 (1至35) -Nbz. 3980.4: M⁺, 996.1: (M+4H)⁴⁺/4一级结构如图2B中所示。

[0103] 代表病毒结合部分的一个实施方案的戊炔基-(PEG)₂-p6在Rink酰胺树脂上通过SPPS直至两个PEG单元而形成。然后,通过手工偶联4-戊炔酸(5当量4-戊炔酸、4.9当量HATU和10当量Dipea,在DMF中足以制备0.2M关于4-戊炔酸的溶液)。偶联进行两次,进行1.5小时。然后,将肽用95:2.5:2.5的TFA:H₂O:TIPS切割,并通过制备型HPLC进行纯化。Penty-p6 [M+H]⁺=3975.90g/mol, [M+2H]³⁺/3=994.9g/mol. 一级结构如图2C中所示。

[0104] 在小瓶中,从1mM溶液添加CuSO₄ (10当量),并且与THPTA (50当量)混合。在混合其他试剂的同时允许形成有机金属复合物。

[0105] 为了通过第57位叠氮赖氨酸和戊炔基-(PEG)₂-p6的炔基之间的点击化学形成肽前体,将戊炔基-(PEG)₂-p6 (1.5当量)和TFF3 (36至59) (C57AzK) (1.0当量)溶解在1.5mL Eppendorf管中的反应缓冲液(10mM NH₄HCO₃)中。随后,从200mM的储备溶液中添加氨基胍(100当量)。然后,将CuSO₄和THPTA的混合物添加至反应混合物中。最后,将抗坏血酸钠(100当量)添加至反应并用HCl/KOH将pH调节至8.0。让氮气流入反应管中。然后将反应管立即密封。随后在37℃下搅拌孵育物12小时。通过将1μL的反应粗制物溶解在20μL 30% MeCN/H₂O中,并随后添加三(2-羧乙基)膦(tris(2-carboxyethyl)phosphine, TCEP)以达到30mM浓度来形成对照。在37℃下孵育5分钟之后,通过HPLC-质谱(HPLC-mass spectrometry, HPLC-MS)分析样品。

[0106] 对于TFF3 (1至35) -Nbz与TFF3 (36至59) (C57K-Pentyp6)之间的天然化学连接,将TFF3 (1至35) -Nbz (1.0当量)和TFF3 (36至59) (C57K-Pentyp6) (0.8当量)溶解在反应缓冲液(6M盐酸胍、100mM的Na₂HPO₄和30mM TCEP,用HCl/NaOH将pH调节至7.0)中。然后添加2-巯基乙磺酸盐(mercaptoethanesulfonate, MeSNa) (100当量),并将反应在室温下持续搅拌4小

时。通过将1 μ L的反应粗制物溶解在20 μ L 30%乙腈(MeCN)/H₂O中,并随后添加TCEP以达到30mM浓度来形成对照。在37℃下孵育5分钟之后,通过HPLC-MS分析样品。当不再残留痕量硫酸酯时,通过添加含有0.1%TFA的30%MeCN/H₂O将反应的体积提高至3mL,过滤,并注入制备型HPLC系统上进行纯化。获得TFF3-C57K(Penty-p6),其具有

[0107] $[M+H]^+ = 10600.96\text{g/mol}$, $[M+8H]^{8+}/8 = 1326.1\text{g/mol}$, $[M+9H]^{9+}/9 = 1178.8\text{g/mol}$ $[M+10H]^{10+}/10 = 1061.1\text{g/mol}$ 。

[0108] 一级结构如图3中所示。

[0109] 天然TFF3也以重组方式产生。为了实现这一点,遵循并调整了Järvå et al., 2020的方案。

[0110] 然后在5'末端延伸TFF3序列以引入纯化标签。之后,使用不依赖序列和连接的克隆(sequence-and ligation-independent cloning, SLIC)将产物整合至质粒pET28b中用于细菌表达。最终的质粒通过测序得到批准并转化至BL21 CodonPlus (DE3) RIPL (R=精氨酸, I=异亮氨酸, P=脯氨酸, L=亮氨酸)细胞中用于细菌表达。这将在下文中更详细地说明。

[0111] 转化的大肠杆菌(E coli)BL21 CodonPlus (DE3) RIPL的指数生长原种培养物的制备

[0112] 将大肠杆菌BL21CodonPlus (DE3) RIPL细胞用相应的质粒转化。将细胞在含有50 μ g/mL链霉素、25 μ g/ μ L氯霉素和50 μ g/mL卡那霉素的溶源性肉汤(lysogeny broth, LB)琼脂平板上划线,并且在37℃下在培养箱中孵育过夜。挑取一个菌落并且接种含有50 μ g/mL链霉素、25 μ g/ μ L氯霉素和50 μ g/mL卡那霉素的LB培养基,并且在旋转振荡培养箱中以250rpm、在37℃下孵育过夜。将Terrific肉汤(Terrific broth, TB)培养基用在600nm处测量的起始光密度(OD₆₀₀)为0.02的LB培养基接种,并且在旋转振荡培养箱中以250rpm和37℃孵育。培养物生长至OD₆₀₀为>2.867。将7.527% DMSO添加至该培养物中,并将混合物(预培养物)在液氮中速冻,并储存在-80℃下用于进一步使用。

[0113] 蛋白质的表达和洗涤

[0114] 将TB培养基用OD₆₀₀为0.04的预培养物接种。将培养物在旋转振荡培养箱中以250rpm、在26℃下孵育24小时。在24小时之后,将细菌培养物在冰上冷却15分钟,并且用离心机以3000g离心15分钟。弃去上清液,并且将细胞重悬于洗涤缓冲液(基于HEPES, pH 7)+DNA酶I+苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF)中。将混悬液以3000g离心15分钟,并且弃去上清液。重复洗涤步骤。

[0115] 将靶蛋白在用His-标签和Strep-标签(用于链霉亲和素的结合基序)纯化的串联亲和纯化时进行纯化。蛋白酶切割位点允许蛋白质从柱中洗脱。将经洗脱的蛋白质透析并5728SDS-PAGE上验证。

[0116] 内酰胺订书钉化肽的制备

[0117] 所有的内酰胺订书钉化肽均是在Rink酰胺树脂上制备的。异肽键形成的结构单元为N- α -Fmoc-N- ϵ -4-甲基三苯甲基-L-赖氨酸(以下表示为MttK)和N- α -Fmoc-L-天冬氨酸 β -2-苯基异丙酯(以下表示为PhiPr)。在SPPS之后,将结合在树脂中的肽用在二氯甲烷(dichloromethane, DCM)中的2% TFA处理,以诱导4-甲基三苯甲基和2-苯基异丙基脱保护。然后,使异肽键形成发生,随后添加在DMF中的0.9当量的HATU和2当量DIPEA。在DMF和

DCM中充分冲洗之后,进行偶联混合物的第二次添加。使用95:2.5:2.5的TFA:H₂O:TIPS将肽从树脂上切割,并且用冷乙醚沉淀。然后将肽过滤、干燥,并且重新溶解在含有0.1% TFA的30% MeCN/H₂O中至最终体积为3mL。在过滤之后,将样品注入制备型HPLC系统中进行纯化。

[0118] 内酰胺订书钉化肽的所得结构如图4至图9中所示。

[0119] 不同环状病毒结合部分对SARS-CoV-2的结合亲和力(表示为解离常数K_d)总结于下表2中。其是通过微量热泳动(MST)确定的。可以清楚地看到,环状p6肽以微摩尔的结合常数与SARS-CoV-2结合。

[0120] 表2:不同环状病毒结合部分的特性。

肽名称	序列	SEQ ID NO.	替换	螺旋度/%	K _d / μM
p6(K) ₄ (D) ₈	EEQ(K ₄)KTF(D ₈)DKFN HEAEDLFYQSSGLGK GDFFR	4	A4K, L8D	2	n.d.
p6(K) ₈ (D) ₁₂	EEQAKTF(K ₈)DKF(D ₁₂) HEAEDLFYQSSGLGK GDFFR	5	L8K, N12D	10	5 ± 3
p6(K) ₁₁ (D) ₁₅	EEQAKTFLDK(K ₁₁)NH E(D ₁₅)EDLFYQSSGLG KGDFFR	6	F11K, A15D	n.d.	n.d.
p6(K) ₁₅ (D) ₁₉	EEQAKTFLDKFNHE (K ₁₅)EDL(D ₁₉)YQSSGL GKGDFFR	7	A15K, F19D	n.d.	n.d.
p6(K) ₁₈ (D) ₂₂	EEQAKTFLDKFNHEA ED(K ₁₈)FYQ(D ₂₂)SGLG KGDFFR	8	L18K, S22D	8	n.d.
p6(K) _{8,18} (D) _{12,22}	EEQAKTF(K ₈)DKF(D ₁₂) HEAED(K ₁₈)FYQ(D ₂₂)S GLGKGDFFR	9	A4K, L8D, L18K, S22D	28	10 ± 1

[0122] n.d. = 未确定

[0123] 通过关环复分解(ring closing metathesis, RCM)的订书钉化病毒结合部分的制备

[0124] 对于RCM反应,使用了以下非典型氨基酸:

[0125] S5Fmoc = Fmoc - (S) - 2 - (4 - 戊烯基)Ala - OH

[0126] R8Fmoc = Fmoc - (R) - 2 - (7 - 辛烯基)Ala - OH

[0127] 对于这些氨基酸(amino acid, AA)的偶联条件为:3.0当量AA、2.9当量HATU、6当量DIPEA。添加DMF以达到相对于AA的0.2M浓度。

[0128] 对于所有天然氨基酸,偶联条件为:5.0当量AA、4.9当量HATU、10当量DIPEA。添加DMF以达到相对于AA的0.2M浓度。

[0129] 在通过测试切割确认了非订书钉化肽的质量之后,进行RCM。将树脂用1mL DCM (3×1 分钟)洗涤,并随后用1mL的1,2-二氯乙烷(1,2-Dichloroethane,DCE) (3×1 分钟)洗涤。将树脂(50 μ mol)用1mL的Grubbs第一代催化剂在DCE(相对于树脂替换的20mol%)中的6mM的溶液处理。将所得混悬液在氮气下在20至25℃下通过连续鼓泡搅拌2小时。之后,将溶剂排出。然后进行Grubbs催化剂的双添加。随后,将树脂用1mL的DCE (3×1 分钟)洗涤,并随后用1mL的DCM (3×1 分钟)洗涤,并随后在氮气流下干燥。使用95:2.5:2.5的TFA:H₂O:TIPS将肽从树脂上切割。将粗制物用冷乙醚沉淀,过滤并干燥。将产物重新溶解在含有0.1% TFA的30% MeCN/H₂O中至最终体积为3mL。在过滤之后,将样品注入制备型HPLC系统中进行纯化。

[0130] 通过将Fmoc脱保护的树脂在1mL的N-甲基-2-吡咯烷酮(N-methyl-2-pyrrolidone,NMP)中溶胀10分钟并将溶剂排出,对RCM产物进行乙酰化。然后,制备2mL的乙酸酐和DIPEA在NMP中的溶液(体积比为85:315:1,600)并添加至树脂中。将混合物在氮气下轻轻鼓泡搅拌进行45分钟,并随后将溶剂排出。随后用DCM和DMF进行充分洗涤。最后,如上所述进行切割和纯化。

[0131] 在脱保护之后,肽含有i) S5残基(烯基化的S-丙氨酸)和R8残基(烯基化的R-丙氨酸)或者ii)两个S5残基。烯基桥在i) S5残基和R8残基之间或者在ii)两个S5残基之间形成。在S5残基和R8残基的情况下,该烯基桥是7-十一碳烯基残基。此外,在两个S5残基的情况下,烯基桥是4-辛烯基残基。

[0132] RCM产生的订书钉化肽的所得结构如图10至图13中所示。

[0133] 不同环状病毒结合部分的特性,包括对SARS-CoV-2的结合亲和力(表示为解离常数K_d)总结于下表3中。结合亲和力是通过微量热泳动(MST)确定的。可以清楚地看到,环状p6肽p6(R8)₁₅(S5)₂₂以纳摩尔的结合常数与SARS-CoV-2结合。

[0134] 表3:不同环状病毒结合部分的特性。

[0135]	肽名称	序列	SEQ ID NO.	替换	螺旋度/ %	Kd / μM
	p6(R8) ₁₅ (S5) ₂₂	EEQAKTFLDKFNHE (R8)EDLFYQ(S5)SGLG KGDFR	10	A15(R8), S22(S5)	28	0.275 $\pm$ 0.142
	Ac- p6(R8) ₁₅ (S5) ₂₂	Ac- EEQAKTFLDKFNHE (R8)EDLFYQ(S5)SGLG KGDFR	11	A15(R8), S22(S5)	25	n.d
	p6(S5) ₁₈ (S5) ₂₂	EEQAKTFLDKFNHEA ED(S5)FYQ(S5)SGLG KGDFR	12	L18(S5), S22(S5)	4	n.d.
	Ac- p6(S5) ₁₈ (S5) ₂₂	Ac- EEQAKTFLDKFNHEA ED(S5)FYQ(S5)SGLG KGDFR	13	L18(S5), S22(S5)	10	n.d.

[0136] n.d. = 未确定

[0137] 肽结合亲和力和测量

[0138] 使用微量热泳动 (MST) 进行亲和力测量。在此,化学和热扩散的比率 (Soret效应) 根据结合配体 (在此:肽) 的数目影响经标记化合物 (在此:RBD) 的迁移率。在MST中,红外激光诱导局部热点并随后诱导温度梯度。分子在水-蛋白质界面上根据其特性沿着该梯度移动。结合配体导致观察到的蛋白质的有序水壳的变化,并且还可改变或增加有效表面电势。这导致热泳行为的变化,其表现为热泳幅度的提高或降低。添加不同浓度的配体之后,在荧光中的变化 (y轴) 可相对于配体浓度作图。根据在荧光中的半最大值变化 (饱和曲线的拐点),蛋白质-配体相互作用的Kd可根据质量-作用定律 (Jerabek-Willemsen et al.2014) 的应用来推导。

[0139] 使用第2代NHS-Red标记试剂盒 (NanoTemper) 进行RBD标记和纯化。将RBD溶液用水稀释至10 μM ,在pH 8.0的碳酸钠水性溶液中重新缓冲,并且在黑暗中以300 μM 的红色染料中孵育。尺寸排阻色谱法允许获得不含未经反应染料的经标记RBD。从光谱测量分析,标记效率约为1:1 (蛋白质:染料)。亲和力测量在补充有0.05% (v/v) 吐温20的Dulbecco磷酸缓冲盐水 (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, DPBS) (不含Ca²⁺和Mg²⁺),和优质毛细管 (NanoTemper) 中进行。

[0140] 然后通过使用PBS+0.05%吐温20作为稀释剂对每种肽进行16次连续的1:1稀释 (每次稀释的最终体积为10 μL) 来测量MST。然后将每个经稀释的样品与10 μL 的10nM经标记RBD储备液一起孵育,因此在每个样品中总是保持5nM浓度的经标记的靶蛋白。

[0141] 然后在NanoTemper Technologies Monolith NT.115Pico仪器中,以20%的激发功率和40%的MST功率获取MST信号。在IR激光启动之后1.5秒分析信号,并且如先前所示 (Bhatia et al.2017) 对获得的数据进行拟合。这些条件对于所有测量的样品均保持相同。

[0142] p6对RBD (SARS-CoV-2, o B.1.1.529) 的亲合力测量

[0143] 此外,将化学合成的p6肽(根据SEQ ID NO.3)针对恒定浓度(5nM)的经荧光标记的SARS-CoV-2o变体(毒株B.1.1.529)的RBD进行滴定。确定了解离常数(Kd)为280nM。因此,p6肽也显示出对SARS-CoV-2o变体的高结合亲和力。

[0144] 图14示出了使用MST技术的p6肽(根据SEQ ID NO.3)针对来自SARS-CoV-2的野生型(实心圆)、 α 变体(空心圆)、 δ 变体(三角形)和o变体(正方形)的经荧光标记的受体结合结构域(receptor binding domain,RBD)的先前说明的亲合力表征的结果(野生型、 α 变体和 δ 变体:N=3,误差条显示SEM)。可以清楚地看到,p6肽以高亲和力与所有SARS-CoV-2变体/毒株结合(这些实验的定量结果也参见表1)。

[0145] p4和p6衍生物

[0146] 合成多个另外的p4和p6衍生物,并且在MST实验中测试了这些p4和p6衍生物针对受体结合结构域的亲合力,如上文针对p6肽所说明的。

[0147] 如在Sarto et al.2022中所述合成所有p4衍生物。p6衍生物p6-刚性、p6-dis和p6-刚性-dis以TFA盐的形式从PSL(Peptide Specialty Laboratories GmbH,Heidelberg)订购。在到达之后,将肽在PBS中重构,在液氮中速冻,并且储存在-80°C下直至进一步使用。

[0148] 表4列出了不同的测试p4衍生物以及从亲合力测量中获得的解离常数。所有肽的半胱氨酸残基都处于其正常的、还原状态。亲合力测量的结果也在图16至32中示出。

[0149] 表4:p4衍生物(病毒结合部分)的特性。

[0150]

肽名称	序列	SEQ ID NO.	SARS-CoV-2 靶毒株	Kd/ μ M	95 % CI / μ M ^{*4}
p4C2	ECQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSS	23	2019-nCov	0.034	[0.02, 0.056]
p4C3	EECAKTFLDKFNHEAEDLFYQSS	24	2019-nCov	0.042	[0.024, 0.071]
p4C4	EEQCKTFLDKFNHEAEDLFYQSS	25	2019-nCov	1.298	[0.31, 6.241]
p4C5	EEQACTFLDKFNHEAEDLFYQSS	26	2019-nCov	2.141	[0.557, 7.241]
p4C6	EEQAKCFLDKFNHEAEDLFYQSS	27	2019-nCov	n.d.	n.d.
p4C7	EEQAKTCLDKFNHEAEDLFYQSS	28	2019-nCov	1.941	[0.791, 5.117]
p4C8	EEQAKTFCDKFNHEAEDLFYQSS	29	2019-nCov	0.281	[0.179, 0.432]
p4C9	EEQAKTFLCKFNHEAEDLFYQSS	30	2019-nCov	3.226	[1.901, 5.501]
p4C10	EEQAKTFLDCFNHEAEDLFYQSS	31	2019-nCov	0.331	[0.11, 0.958]
p4C11	EEQAKTFLDKCNHEAEDLFYQSS	32	2019-nCov	0.012	[0.006, 0.021]
p4C12	EEQAKTFLDKFCHEAEDLFYQSS	33	2019-nCov	2.048	[1.026, 4.409]
p4C13	EEQAKTFLDKFNCEAEDLFYQSS	34	2019-nCov	0.028	[-0.012, 2.55]
p4C4,8	EEQCKTFCDKFNHEAEDLFYQSS	35	2019-nCov	0.059	[0.04, 0.085]
p4C8,12	EEQAKTFCDKFCHEAEDLFYQSS	36	2019-nCov	0.047	[0.007, 0.348]
p4C11,15	EEQAKTFLDKCNHECEDLFYQSS	37	2019-nCov	0.068	[0.047, 0.099]
p4C15,19	EEQAKTFLDKFNHECEDLCYQSS	38	2019-nCov	0.238	[0.155, 0.371]
p4C18,22	EEQAKTFLDKFNHEAEDCFYQCS	39	2019-nCov	0.218	[0.156, 0.302]
p4C4,8,18,22	EEQCKTFCDKFNHEAEDCFYQCS	40	2019-nCov	0.400	[0.156, 0.302]

[0151] ^{*4}CI=置信区间

[0152] n.d.=未确定

[0153] 所有显示出针对SARS-CoV-2RBD的解离常数小于0.3、特别是小于0.2、特别是小于0.1、特别是小于0.05、特别是小于0.04、特别是小于0.03、特别是小于0.02的p4衍生物是特

别合适的病毒结合部分。

[0154] 表5列出了不同的测试p6衍生物以及从亲和力和力测量中获得的解离常数。所有肽的半胱氨酸残基都处于其氧化状态,以便其形成分子内二硫键。亲和力测量的结果也在图33至35中示出。

[0155] 表5:p6衍生物(病毒结合部分)的特性。

	肽名称	序列	SEQ ID NO.	SARS-CoV-2 靶毒株	Kd/ μ M	95 % CI / μ M
[0156]	p6- 刚性	EAAAKEEQAKTFLDKFNHEAE DLFYQSSGLGKGDRC	41	2019-nCov	4.531	[0.954, 21.4]
	p6- dis	EEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQ SCGLGKGDRC	42	2019-nCov	2.596	[1.174, 5.771]
	p6-刚性- dis	EAAAKEEQAKTFLDKFNHEAE DLFYQSCGLGKGDRC	43	2019-nCov	5.135	[1.487, 16.9]

[0157] TFF3-p6的重组产生

[0158] TFF3-p6也以重组方式产生。为实现这一点,遵循并调整了Järvå et al., 2020的方案。

[0159] 然后延伸TFF3序列以引入纯化标签和TEV(烟草蚀纹病毒(Tobacco Etch Virus))蛋白酶切割位点(于5'端)以及p6(于3'端)。之后,使用不依赖序列和连接的克隆(SLIC)将产物整合至质粒pET28b中用于细菌表达。最终的质粒通过测序得到认可,并且转化至BL21CodonPlus (DE3) RIPL细胞中用于细菌表达。这是按照在上文段落“转化的大肠杆菌BL21CodonPlus (DE3) RIPL的指数生长原种培养物的制备”中的详细说明进行的。

[0160] 蛋白质的表达和洗涤

[0161] 用OD₆₀₀为0.04的预培养物接种TB培养基。将培养物在旋转振荡培养箱中以250rpm、在26℃下孵育24小时。在24小时之后,将细菌培养物在冰上冷却15分钟,并且用离心机以3000g离心15分钟。弃去上清液,并且将细胞重悬于洗涤缓冲液(基于HEPES, pH 8)中。将混悬液以3000g离心15分钟,并且弃去上清液。重复洗涤步骤。通过超声将细菌细胞在裂解缓冲液(基于HEPES, pH 8)中裂解。将裂解物以12.000g离心45分钟,弃去沉淀,并且将上清液通过0.2 μ m过滤器过滤。

[0162] 蛋白质的纯化

[0163] 将靶蛋白用His-标签和Strep-标签(链霉亲和素的结合基序)纯化进行串联亲和纯化时进行纯化。将咪唑(Imidazole, ImH)添加至经过滤的细菌裂解物中至最终浓度为40mM。使用Äkta Pure 25 (Cytiva)快速蛋白质液相色谱(fast protein liquid chromatography, FPLC)装置将裂解物施加至HisTrap柱(Cytiva)上。将柱用洗涤缓冲液(300mM NaCl, 50mM Tris-碱, 40mM ImH, pH 7.5)洗涤,将蛋白质用洗脱缓冲液(300mM NaCl, 50mM Tris-碱, 400mM ImH, pH 7.5)洗脱,并且将洗脱以级分收集。将含有目的产物的级分通过SDS-PAGE鉴定并合并。

[0164] 将合并的级分施加至使用Äkta Pure 25的Strep-Tactin XT 4Flow柱(IBA Lifesciences)。将柱用洗涤缓冲液(100mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, pH 8)洗涤,将蛋白质用洗脱缓冲液(100mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 50mM生物素, pH 8)洗脱,并且将洗脱物以级分收集。将含有目的产物的级分通过SDS-PAGE鉴定,并且在针对PBS (pH

7.4) 进行透析之前合并。使用NanoDrop2000分光光度计(Thermo Fisher Scientific)通过在280nm处的吸收光谱确定蛋白质含量。

[0165] 为了去除串联亲和纯化标签,根据制造商的建议,每15 μ g经纯化的产物使用1U ProTEV Plus,将经纯化的产物与ProTEV Plus(Promega)一起在30 $^{\circ}$ C下孵育过夜。

[0166] 将ImH添加至反应混合物至最终浓度为40mM,然后将其施加至使用Äkta Pure 25的HisTrap柱,并且将柱用洗涤缓冲液(300mM NaCl,50mM Tris-碱,40mM ImH,pH 7.5)洗涤。将流过的最终产物(TFF3-p6)以级分收集,而将切割的纯化标签和ProTEV Plus(也含有His-标签)保留在柱中。将含有最终产物的级分通过SDS-PAGE鉴定,合并并且针对PBS(pH 7.4)进行透析。使用Vivaspin PES离心浓缩器(Sartorius)将体积降低至通过NanoDrop2000确定的最终蛋白质浓度为1mg/ml至3mg/ml。将溶液在液氮中速冻,并且储存在-20 $^{\circ}$ C下直至进一步使用。通过SDS-PAGE和超高效液相色谱-质谱(Ultra-Performance-Liquid-Chromatography-Mass-Spectrometry,UPLC/MS)控制正确的最终产物和纯度。

[0167] TFF-p6对SARS-CoV-2的RBD的亲合力测量

[0168] 在这些实验中,化学合成的TFF3-p6(TFF3-C57K(Penty-p6)或TFF3-p6syn;其一级结构如图3中所示并且在SEQ ID NO.18中重现),以及根据SEQ ID NO.19的重组TFF3-p6(TFF3-p6rec)针对恒定浓度(5nM)的经荧光标记的野生型SARS-CoV2(也表示为nCov2019)和SARS-CoV2的 δ 变体(也表示为 δ (B.1.617.2))的RBD进行滴定。所得的解离常数(Kd)列于表6中。该TFF3-p6 syn的亲合力测量结果如图15中所示,以及该TFF3-p6 rec的亲合力测量结果如图36中所示。

[0169] 表6: TFF-p6对SARS-CoV-2的RBD的亲合力测量的解离常数。

[0170]	肽名称	SEQ ID NO.	SARS-CoV-2 靶毒株	Kd / μ M	95% CI / μ M
	TFF3-p6 rec	19	2019-nCov	0.141	[0.109, 0.182]
	TFF3-p6 rec	19	δ (B.1.617.2)	0.243	[0.117, 0.495]
	TFF3-p6 syn	18	2019-nCov	12.69	[6.87, 23.8]
	TFF3-p6 syn	18	δ (B.1.617.2)	2.672	[1.263, 5.67]

[0171] 细胞毒性测定

[0172] 使用细胞计数试剂盒(Hycultec, HY-K0301)根据制造商的说明确定细胞生存力。

[0173] A549、HBE和Calu-3细胞在补充有10%(v/v)FBS、100U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的DMEM中培养。将细胞以 5×10^4 个细胞/mL的密度接种至96孔板在每孔90 μ L DMEM培养基中在37 $^{\circ}$ C和5% CO₂下过夜。

[0174] 将溶于去离子水中的10 μ L的重组TFF3-p6或标签-TFF3-p6(仍含有亲和标签)添加至包括阳性(1% SDS)和阴性对照(载剂;培养基, H₂O)的系列稀释液(6.6×10^{-6} M至 6.6×10^{-10} M)中,并在37 $^{\circ}$ C和5% CO₂下另外孵育48小时。对于背景减除,还使用了不含细胞而仅含样品的孔。在孵育48小时之后,添加CCK8溶液(10 μ L/孔),并且使用Tecan板读取器(SPARK, TECAN-reader Tecan Group Ltd.)来测量在染料孵育约3小时之后的吸光度(450nm/650nm)。通过在减去背景信号之后将未经处理的对照设定为100%来计算细胞生存

力。

[0175] 重组TFF3-p6和标签-TFF3-p6均未显示出与阴性对照的显著差异。相反,在所有情况下,细胞生存力约为100%。相比之下,阳性对照显示出细胞生存力为0%或接近0%。

[0176] 抗病毒效力

[0177] 为了测试TFF3-p6的抗病毒效力,使用了假病毒感染系统。该系统基于缺乏VSV包膜糖蛋白但含有eGFP和SARS-CoV-2刺突蛋白(VSV Δ G-CoV-2; Markus Hoffmann et al.)的水疱性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)。

[0178] 将TFF3-p6或PBS(对照)与VSV Δ G-CoV-2以在100 μ L中的50 μ M TFF3-p6和 2.625×10^4 ffu/mL病毒的最终浓度一起孵育30分钟。将混合物添加至VetoE6细胞,并在37 $^{\circ}$ C下在细胞培养箱中孵育24小时。使用荧光显微镜拍照并确定感染细胞的数目。

[0179] 与PBS对照相比,TFF3-p6可将VSV Δ G-CoV2假病毒对VetoE6细胞的感染降低约40%。

[0180] 在前面章节中引用的参考文献列表

[0181] 1.Bhatia,Sumati,et al."Linear polysialoside outperforms dendritic analogs for inhibition of influenza virus infection in vitro and in vivo." Biomaterials 138(2017):22-34.

[0182] 2.Braga Emidio,Nayara,et al."Chemical Synthesis of TFF3 Reveals Novel Mechanistic Insights and a Gut-Stable Metabolite." Journal of Medicinal Chemistry 64.13(2021):9484-9495.

[0183] 3.Bui,Vuong N.,et al."Pathogenicity of an H5N1 avian influenza virus isolated in Vietnam in 2012 and reliability of conjunctival samples for diagnosis of infection." Virus Research 179(2014):125-132.

[0184] 4.CabAn,Madelyn,et al."Cross-protective antibodies against common endemic respiratory viruses." NaCre Communications 14.1(2023):798.

[0185] 5.Han,Dong P.,Adam Penn-Nicholson,and Michael W.Cho."Identification of critical determinants on ACE2 for SARS-CoV entry and development of a potent entry inhibitor." Virology 350.1(2006):15-25.

[0186] 6.Hoffmann,Markus,et al."SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor." Cell 181.2(2020):271-280.

[0187] 7.Hoffmann,Miriam,Nicole L.Snyder,and Laura Hartmann."Polymers Inspired by Heparin and Heparan Sulfate for Viral Targeting." Macromolecules 55.18(2022):7957-7973.

[0188] 8.Hoffmann,Werner."Trefoil factor family(TFF) peptides and their different roles in the mucosal innate immune defense and more:An update." Current Medicinal Chemistry 28.36(2021):7387-7399.

[0189] 9.Hrebik,Dominik,et al."ICAM-1 induced rearrangements of capsid and genome prime rhinovirus 14 for activation and uncoating." Proceedings of the National Academy of Sciences 118.19(2021):e2024251118.

- [0190] 10.Issmail,Leila,et al."Prefusion-specific antibody-derived peptides trivalently presented on DNA-nanoscaffolds as an innovative strategy against RSV entry."Frontiers in Virology 2(2022).
- [0191] 11.Järva,Michael A.,et al."Trefoil factors share a lectin activity that defines their role in mucus."Nature Communications 11.1(2020):1-9.
- [0192] 12.Jerabek-Willemsen M.,et al."MicroScale Thermophoresis:Interaction analysis and beyond."Journal of Molecular Structure 1077(2014):101-113.
- [0193] 13.Khan,Abdul Ghafoor,et al."Human rhinovirus type 54 infection via heparan sulfate is less efficient and strictly dependent on low endosomal pH."Journal of Virology 81.9(2007):4625-4632.
- [0194] 14.Madsen,Anders,et al."Human antibodies targeting influenza B virus neuraminidase active site are broadly protective."Immunity 53.4(2020):852-863.
- [0195] 15.McLellan,Jason S.,et al."Structure-based design of a fusion glycoprotein vaccine for respiratory syncytial virus."science 342.6158(2013):592-598.
- [0196] 16.Memczak,Henry,et al."Anti-hemagglutinin antibody derived lead peptides for inhibitors of influenza virus binding."PLoS One 11.7(2016):e0159074.
- [0197] 17.Sarto,Carolina,et al."Atomistic insight into the essential binding event of ACE2-derived peptides to the SARS-CoV-2 spike protein."Biological Chemistry 403.5-6(2022):615-624.
- [0198] 18.Smith,Thomas J.,et al."Neutralizing antibody to human rhinovirus 14 penetrates the receptor-binding canyon."Nature 383.6598(1996):350-354.
- [0199] 19.Thim,L.,F.Madsen,and S.S.Poulsen."Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels."European Journal of Clinical Investigation 32.7(2002):519-527.
- [0200] 20.Zhu,Qing,et al."A highly potent extended half-life antibody as a potential RSV vaccine surrogate for all infants."Science Translational Medicine 9.388(2017):eaaj1928.
- [0201] 21.Zuo,Teng,et al."Comprehensive analysis of antibody recognition in convalescent humans from highly pathogenic avian influenza H5N1 infection."Nature Communications 6.1(2015):8855.

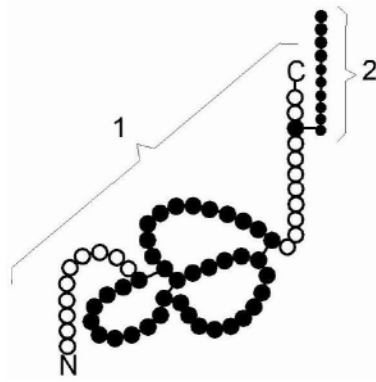


图1A

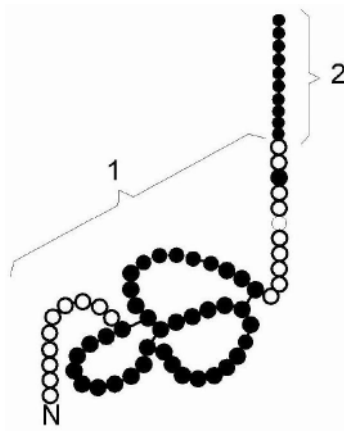


图1B



图2A

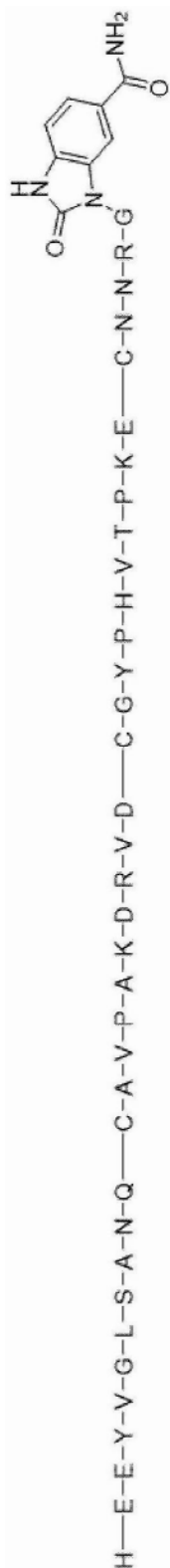


图2B



图2C

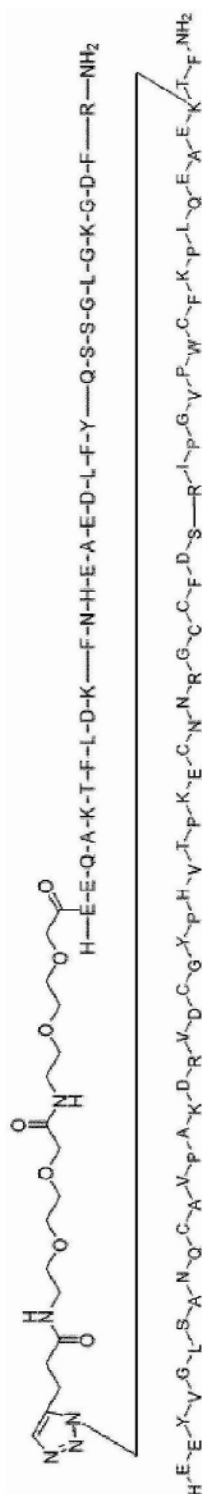


图3

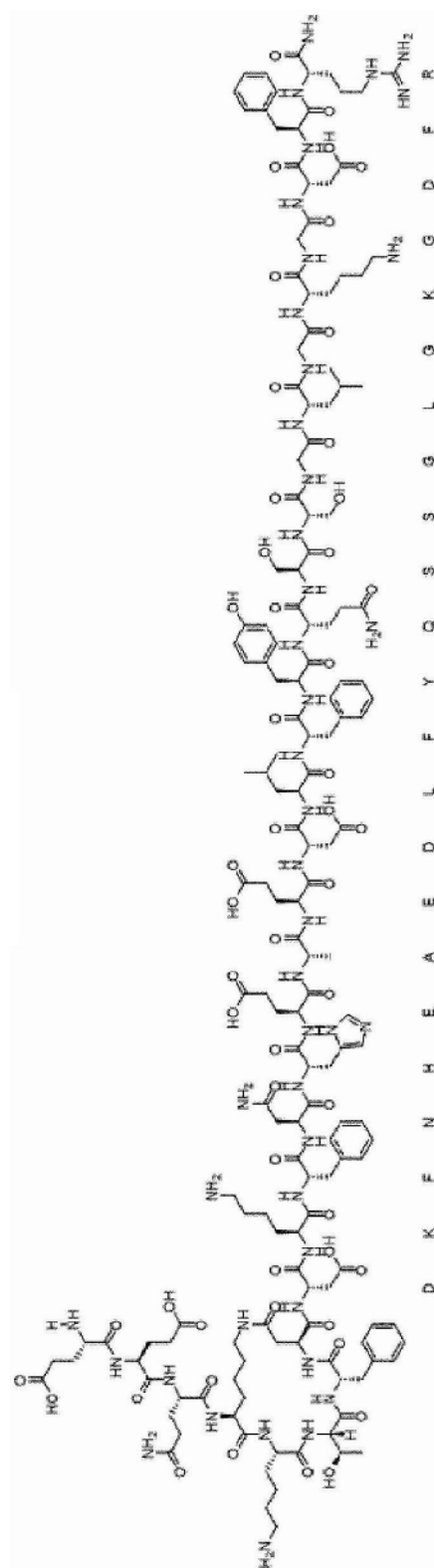


图4

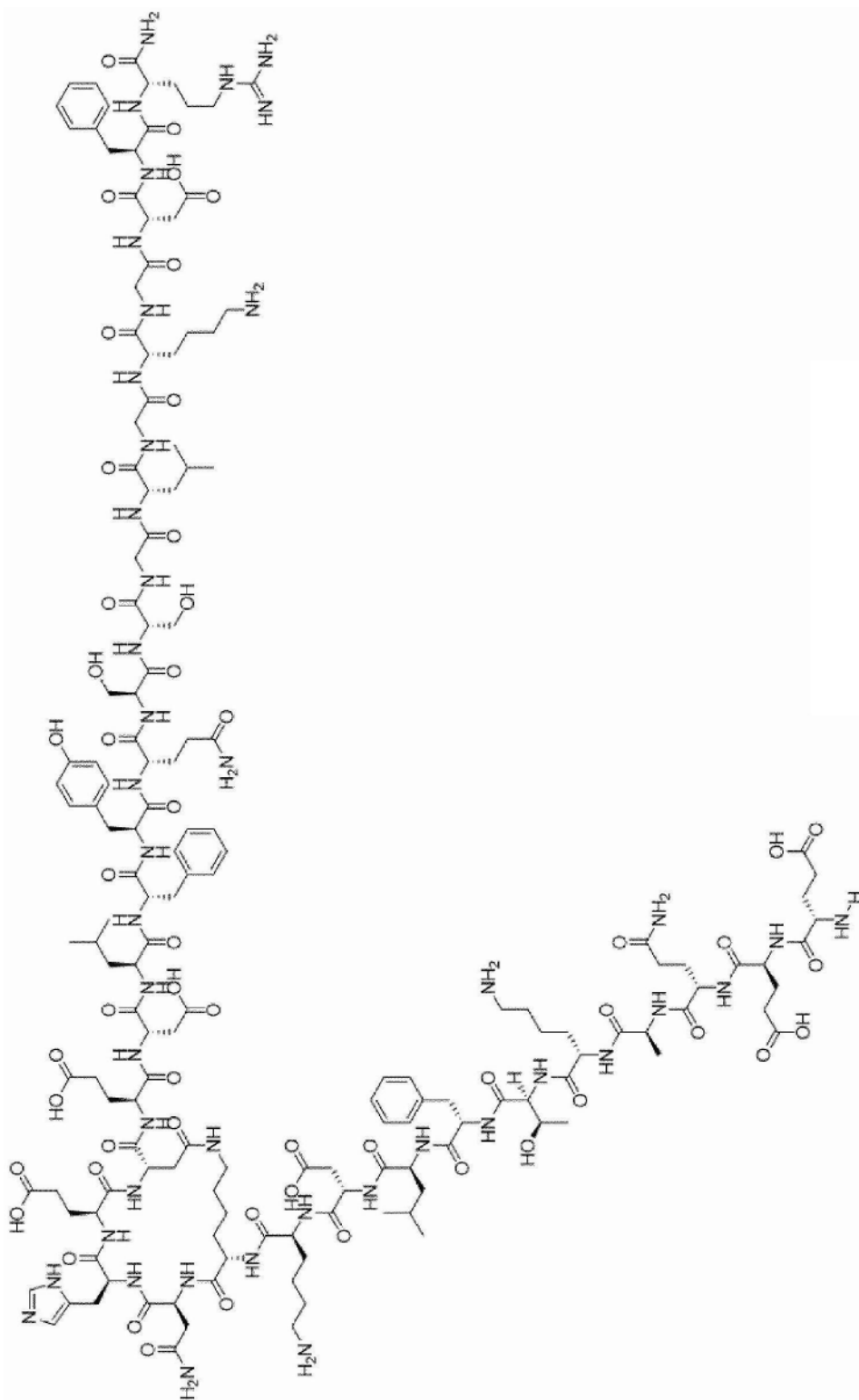


图6

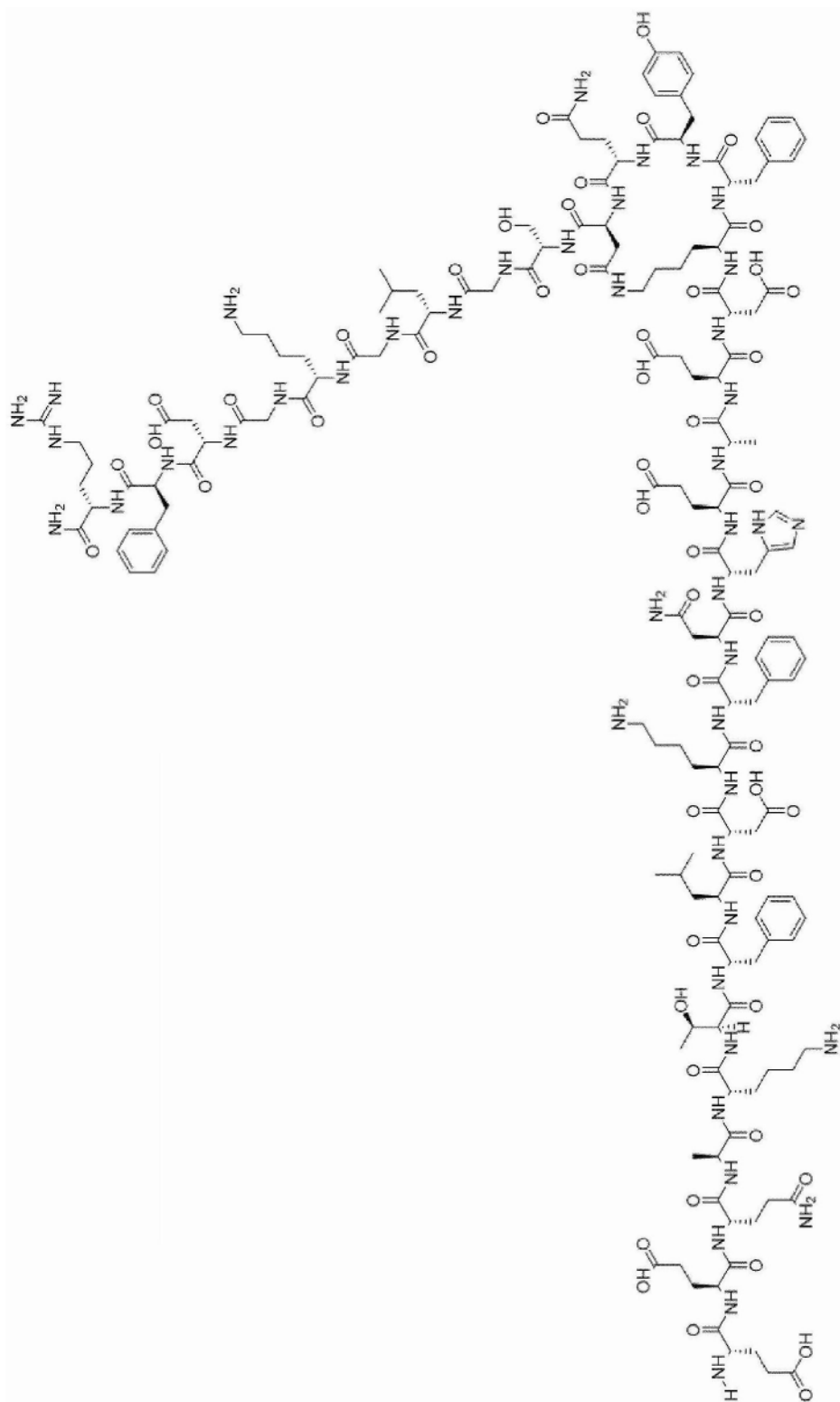


图8

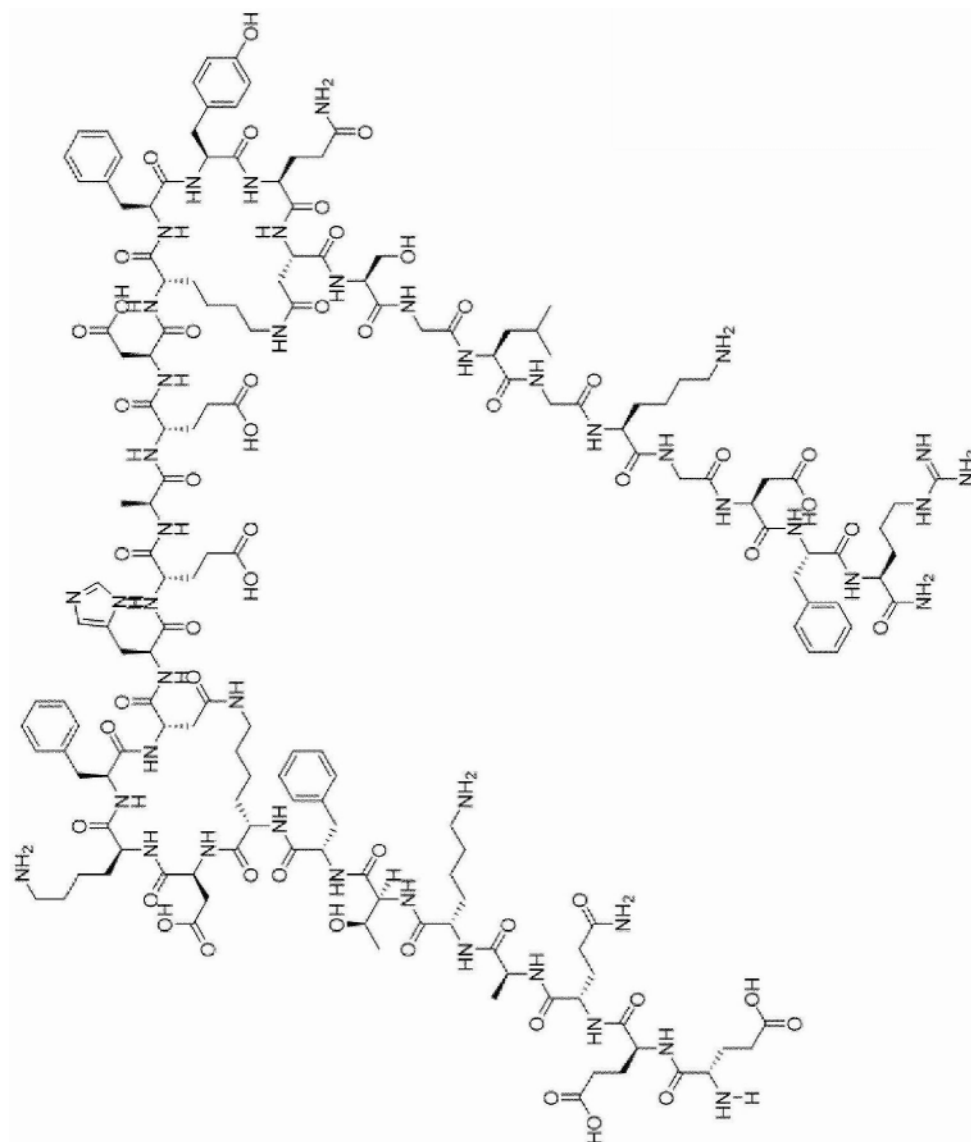


图9

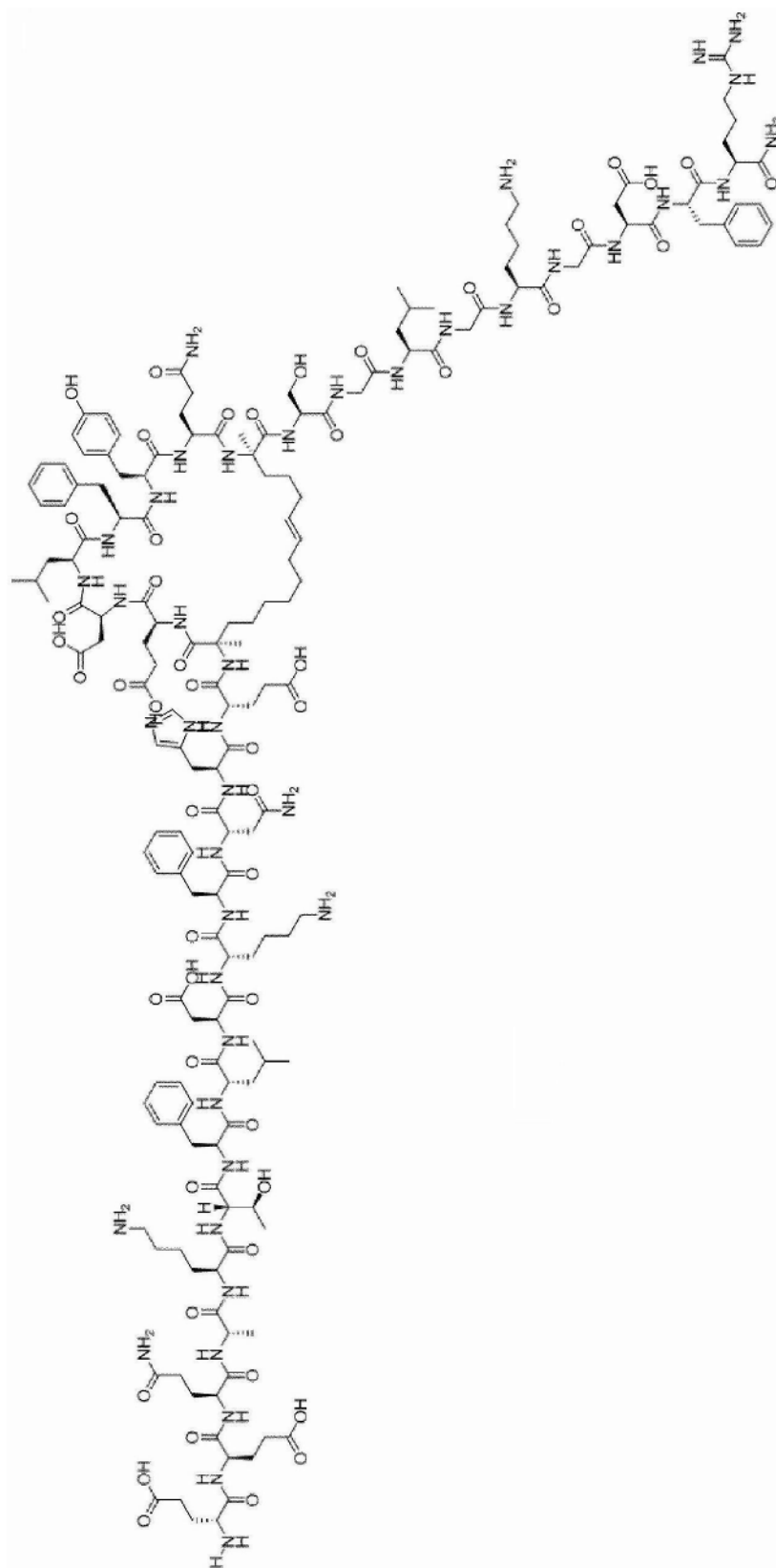


图10

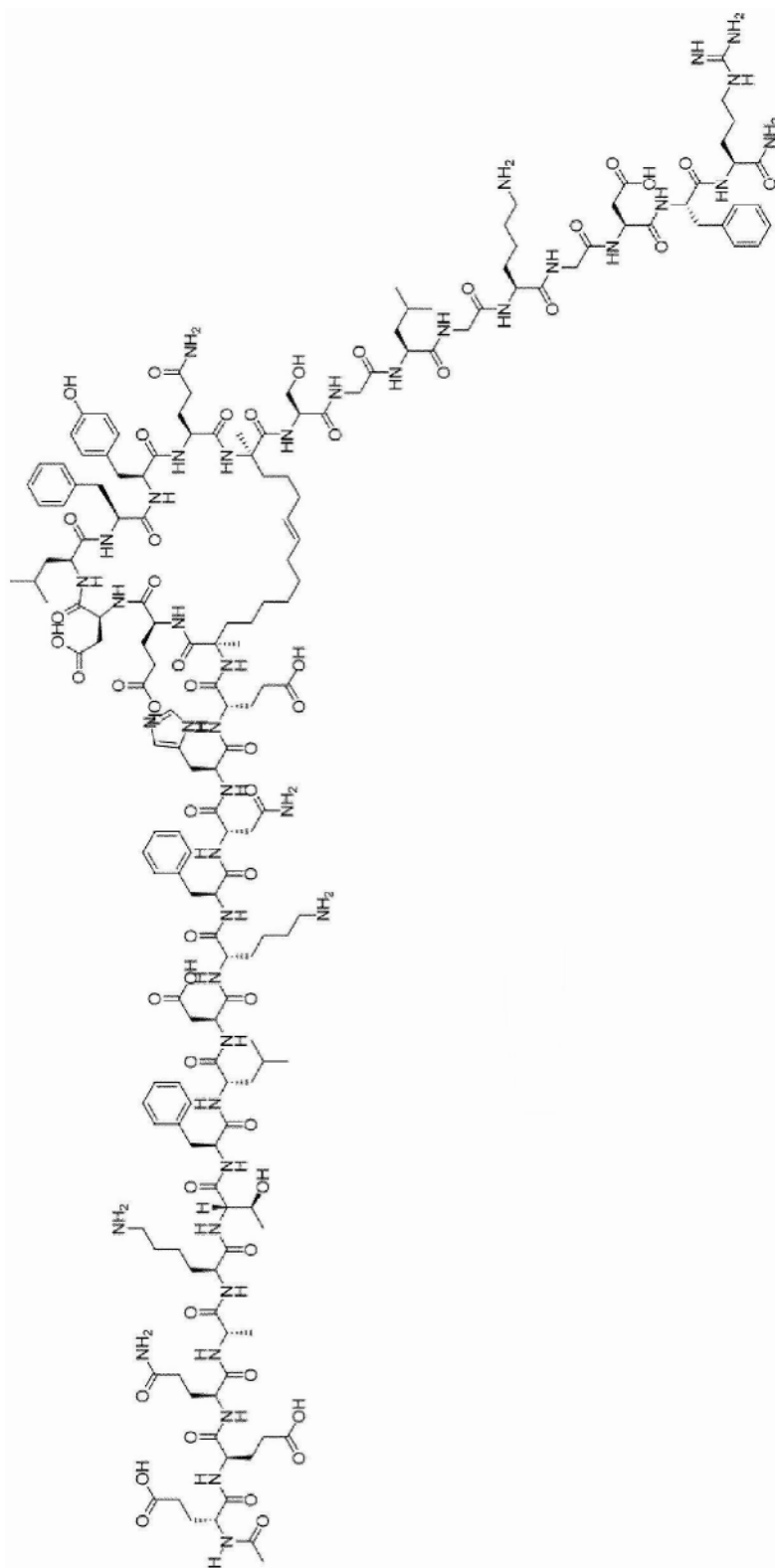


图11

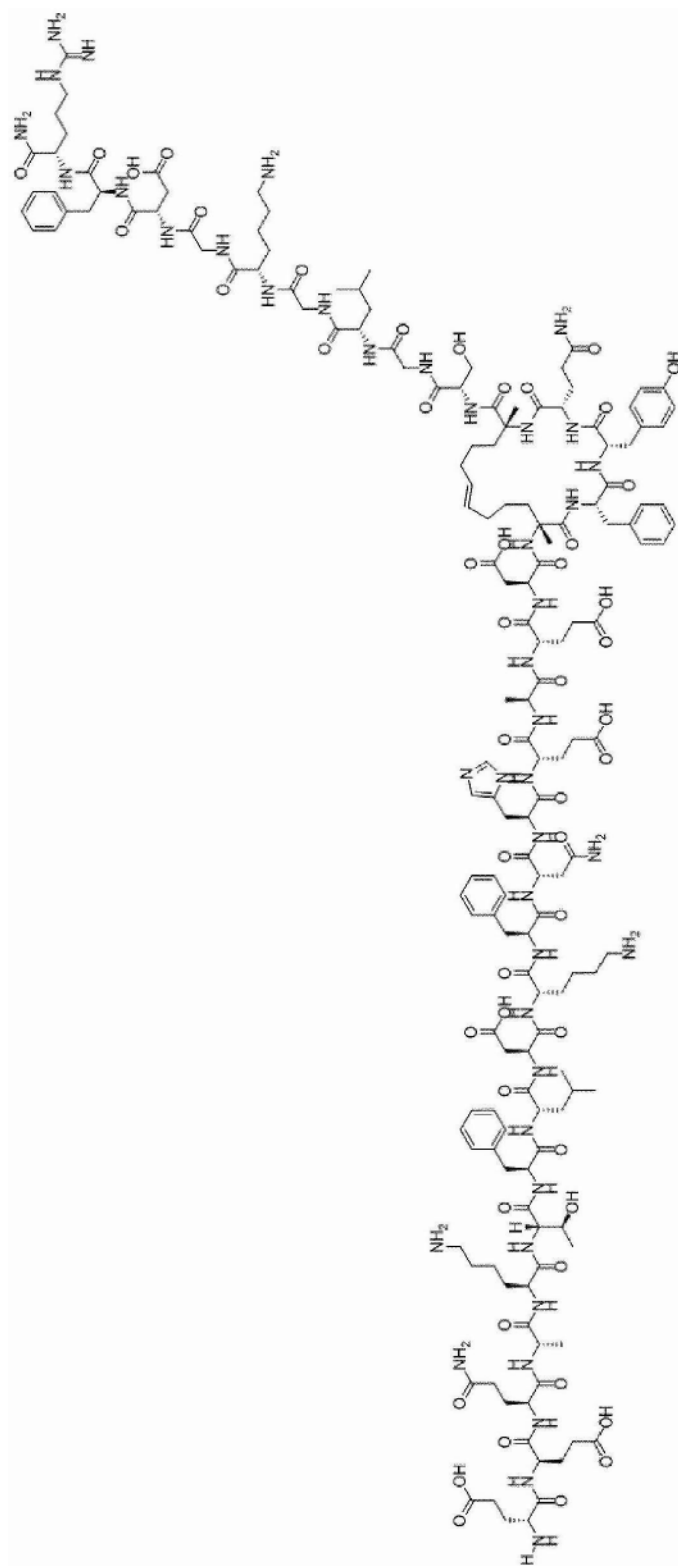


图12

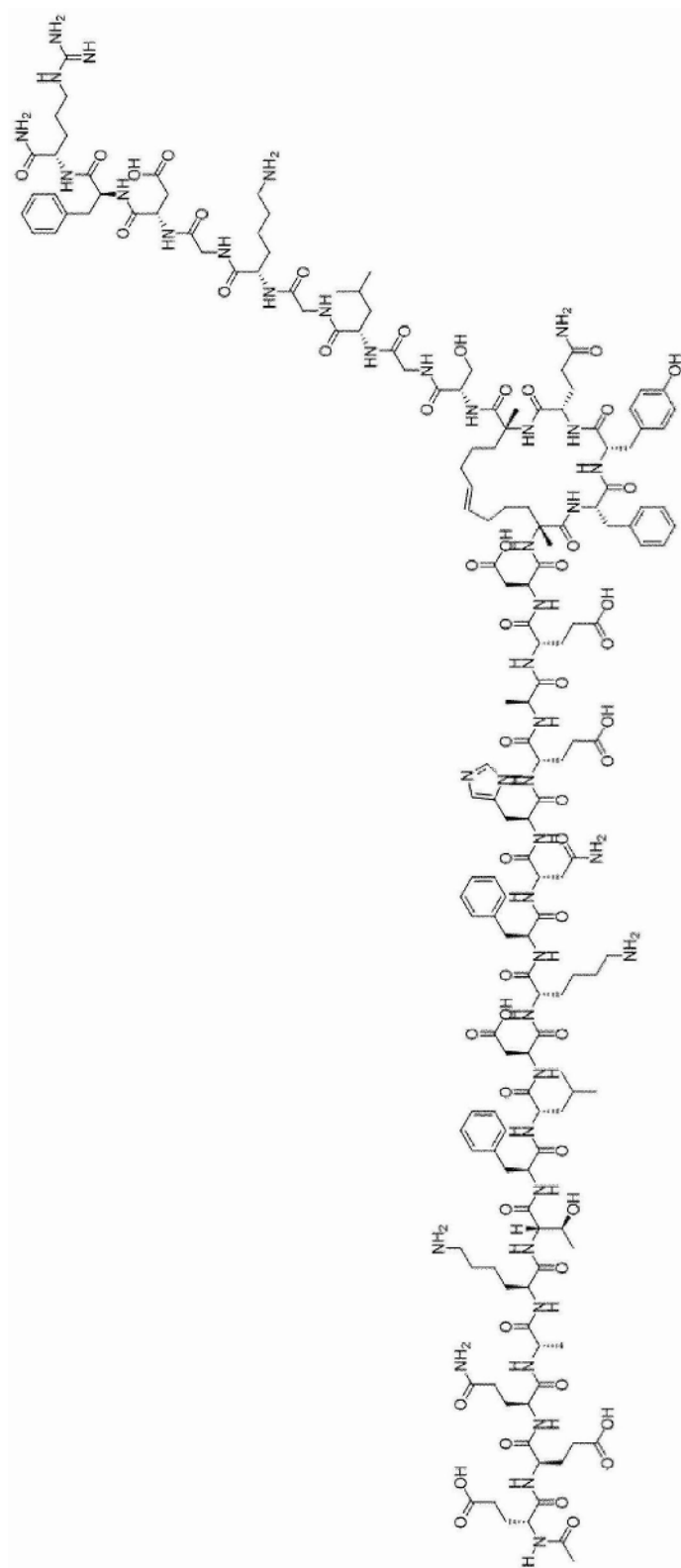


图13

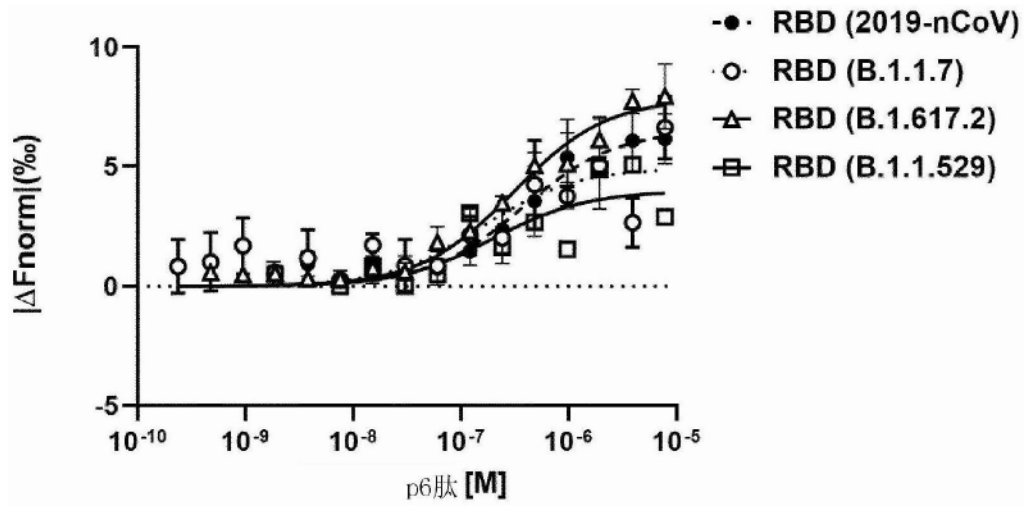


图14

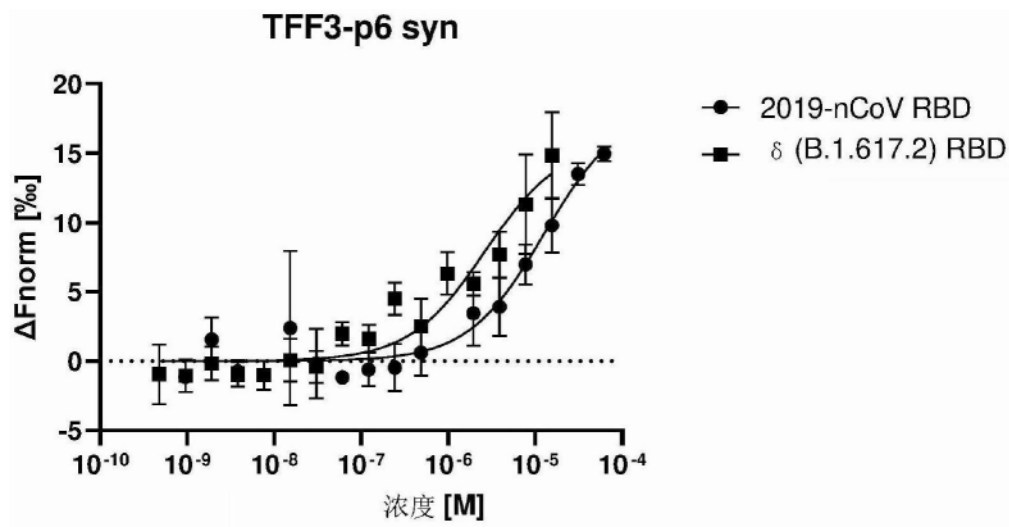


图15

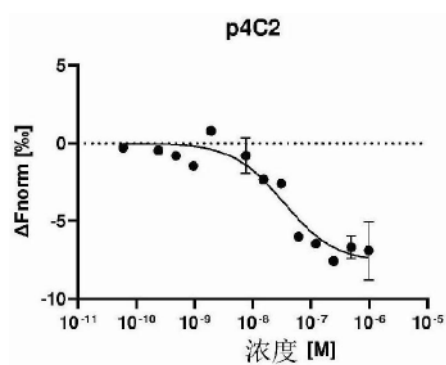


图16

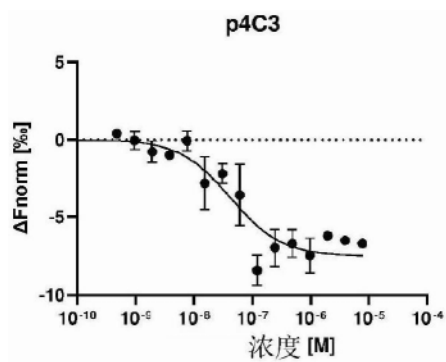


图17

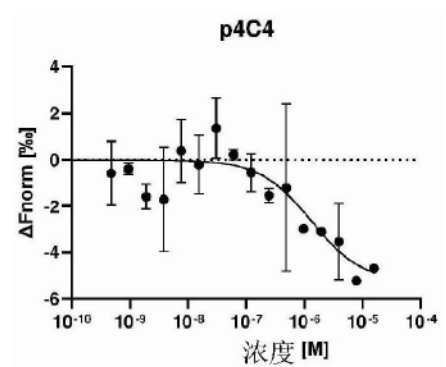


图18

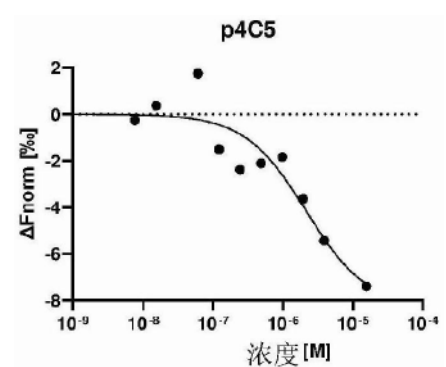


图19

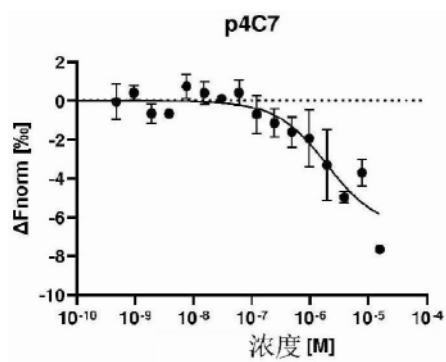


图20

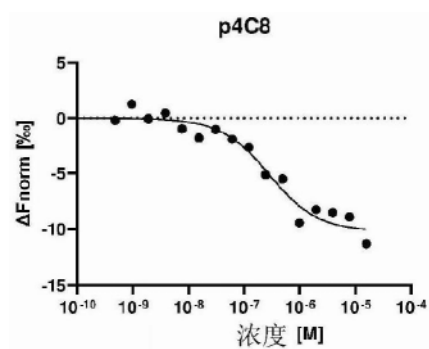


图21

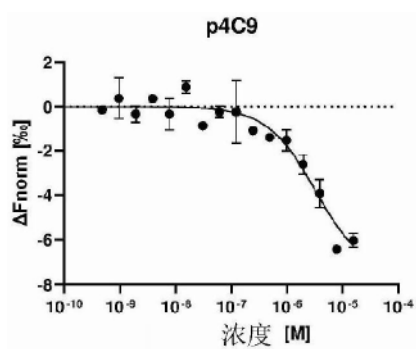


图22

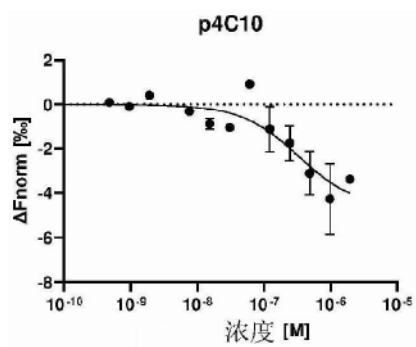


图23

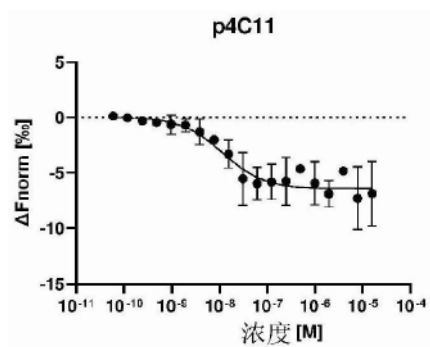


图24

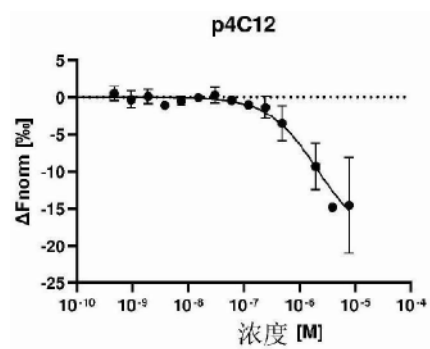


图25

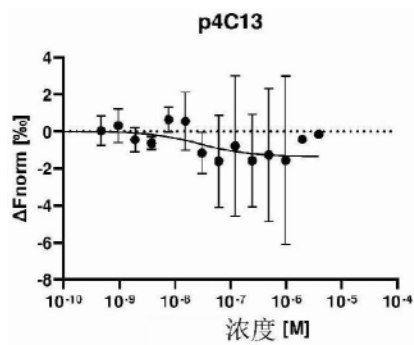


图26

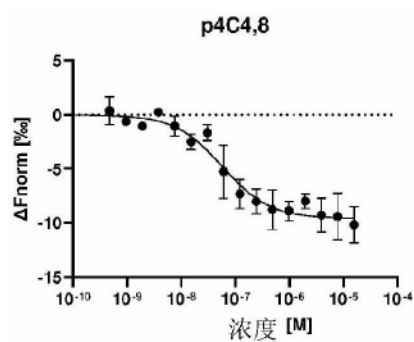


图27

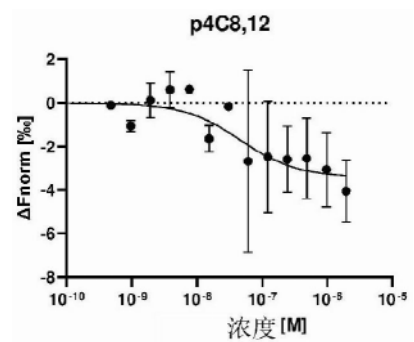


图28

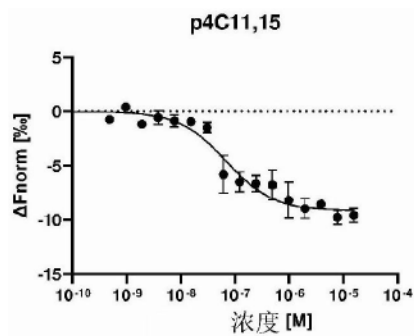


图29

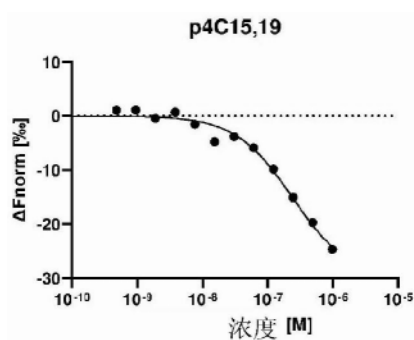


图30

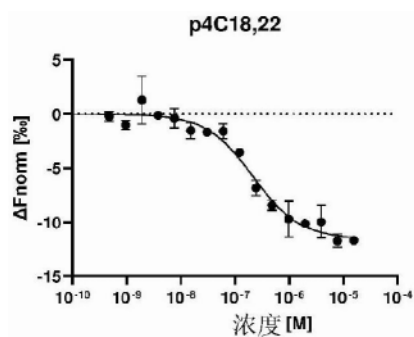


图31

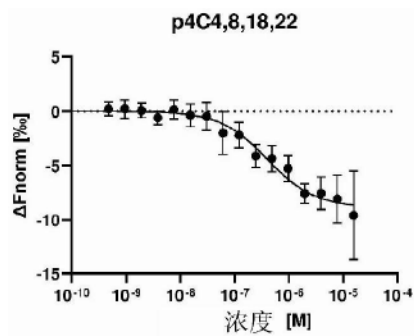


图32

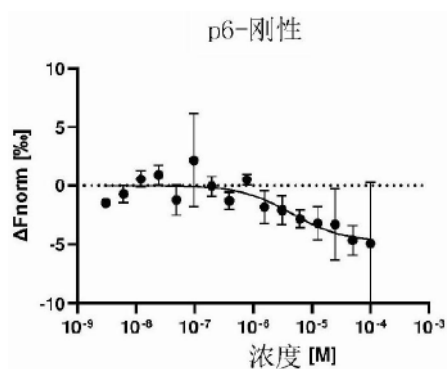


图33

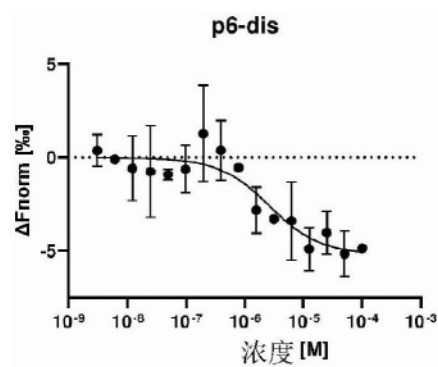


图34

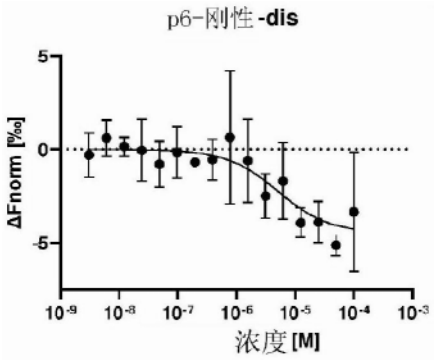


图35

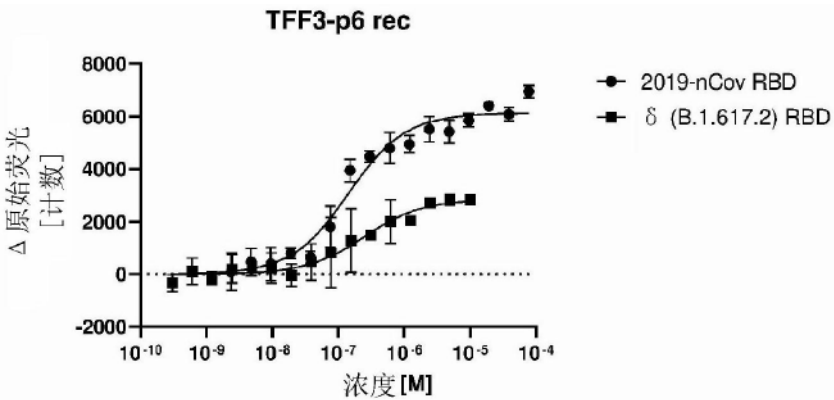


图36