



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116769048 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 19

(21) 申请号 202211740778.7

(22) 申请日 2022.12.31

(66) 本国优先权数据

202111668011.3 2021.12.31 CN

202210114482.8 2022.01.30 CN

202210773393.4 2022.07.01 CN

202210968998.9 2022.08.12 CN

(71) 申请人 康码(上海)生物科技有限公司

地址 201321 上海市浦东新区芙蓉花路118
弄12号楼

(72) 发明人 郭敏 徐丽琼 刘章 张俊 伍志
于雪

(51) Int. Cl.

G07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/576 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 39/42 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

A61Q 17/00 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

A01N 37/46 (2006.01)

A01P 1/00 (2006.01)

C11D 3/32 (2006.01)

C11D 3/48 (2006.01)

A23L 33/10 (2016.01)

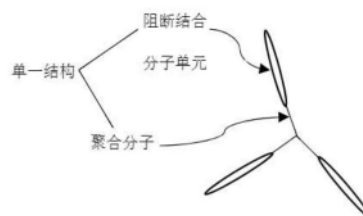
权利要求书4页 说明书41页 附图13页

(54) 发明名称

聚合分子、包括其的单一结构和多聚结构

(57) 摘要

本发明提供一种聚合分子、包括其的单一结构和多聚结构、以及相关的产品、制备方法和用途,通过聚合分子的聚合作用形成阻断与受体结合的多聚体,以能有效提高对病毒的结合能力,其中的聚合分子,其特征在于:用于将对病毒与细胞受体之间的结合进行阻断的多个阻断结合分子单元聚合为聚合结构。



1. 一种聚合分子,其特征在于:

用于将对病毒与细胞受体之间的结合进行阻断的多个阻断结合分子单元聚合为聚合结构。

2. 根据权利要求1所述的聚合分子,其特征在于:

其中,所述聚合分子具有单一结合部位和聚合部位,

所述单一结合部位用于与所述阻断结合分子单元结合而形成至少具有聚合分子与阻断结合分子单元的单一结构,多个所述单一结构通过所述聚合部位聚合为聚合结构,优选地,所述聚合分子为肽或蛋白时,所述单一结合部位在所述聚合分子的N端。

3. 根据权利要求1或2所述的聚合分子,其特征在于:

其中,所述聚合结构由数量为2-10中任意一种的所述单一结构聚合而成。

4. 根据权利要求1-3任意一项所述的聚合分子,其特征在于:

其中,所述聚合分子选自表1中的任意一项。

5. 根据权利要求4所述的聚合分子,其特征在于:

其中,所述聚合分子为链霉亲和素,

优选地,所述链霉亲和素包含与SEQ ID NO:1具有一致性或与其具有至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%一致性的氨基酸序列。

6. 根据权利要求6所述的聚合分子,其特征在于:

其中,所述聚合分子与所述阻断结合分子单元之间通过连接分子结合,

所述连接分子包含有荧光类蛋白、人免疫球蛋白G4、Fc以及HSA中的任意一种或多种,例如,所述连接分子是eGFP荧光蛋白或经其改造得到,优选地,通过对eGFP删除部分氨基酸得到;或:

所述连接分子包含与SEQ ID NO:2-6中任意一个具有一致性或SEQ ID NO:2-6中任意一个具有至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%一致性的氨基酸序列优选地,通过对eGFP删除其第1-228位的氨基酸得到;

优选地,所述连接分子的N端与所述阻断结合分子单元连接,所述连接分子的C端与所述聚合分子N端连接。

7. 根据权利要求1-6任意一项所述的聚合分子,其特征在于:

其中,所述阻断结合分子单元通过与所述病毒与所述细胞受体结合的部位结合而阻断所述病毒与所述受体之间的结合,和/或

所述阻断结合分子单元通过与所述细胞受体结合而阻断所述病毒与所述细胞受体之间的结合。

8. 根据权利要求1-7任意一项所述的聚合分子,其特征在于:

其中,所述阻断结合分子单元含有至少一个对病毒与细胞受体之间的结合进行阻断的阻断分子,

优选地,所述阻断分子含有与SEQ ID NO:7-9以及16-19中任意一个具有一致性或SEQ ID NO:7-9以及16-19中任意一个具有至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%一致性的氨基酸序列;进一步地,当含有多个阻断分子时,所述阻断分子之间从N端到C端顺序连接,更优选地,当所述阻断结合分子单元和所述聚合分子之间通过所述连接分子连接时,所述连接分子的N端与最末一个所述阻断分子的C端连接,所述连接分子的C端与所

述单一结合部位连接，

再一优选地，所述阻断分子为纳米抗体。

9. 根据权利要求1-8任意所述的聚合分子，其特征在于：

其中，所述细胞受体为ACE2。

10. 根据权利要求8或9所述的聚合分子，其特征在于：

其中，所述阻断结合分子单元含有至少一个第一阻断分子和/或至少一个第二阻断分子，所述第一阻断分子针包含与SEQ ID NO:7具有一致性或与其具有至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%一致性的氨基酸序列，所述第二阻断分子包含与SEQ ID NO:8以及16-19中任意一个具有一致性或与其具有至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%一致性的氨基酸序列，

优选地，所述阻断结合分子单元含有两个所述第一阻断分子或两个所述第二阻断分子更优选地，两个所述第一阻断分子之间或两个所述第二阻断分子之间通过一个的N端和另一个的C端连接；

再一优选地，所述阻断结合分子单元含有所述第一阻断分子和所述第二阻断分子所述第一阻断分子与所述第二阻断肽段之间通过一个的N端和另一个的C端连接，更优选地，所述第二阻断分子的N端和所述第一阻断分子的C端连接。

11. 根据权利要求1-10任意一项所述的聚合分子，其特征在于：其中，所述单一结构还含有先导肽，

所述先导肽包含与SEQ ID NO:10具有一致性或与其具有至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%一致性的氨基酸序列，优选地，所述先导肽通过C端任意一个所述阻断肽段的N端连接。

12. 根据权利要求1-11任意一项所述的聚合分子，其特征在于：

其中，所述单一结构还含有所述酸性结构，所述酸性结构为带有负电的氨基酸短链聚合物，进一步地，所述酸性结构具有以下特征中的一个或多个的组合：

(1) 所述酸性结构设置在C末端；

(2) 所述的短链聚合物的氨基酸的个数为0-50、2-40、3-30、2-20或2-10；

(3) 所述的带有负电的氨基酸为天冬氨酸和/或谷氨酸，

优选地，所述酸性结构与所述聚合分子的C端连接。

13. 根据权利要求1-12任意一项所述的聚合分子，其特征在于：

其中，所述单一结构还含有标签蛋白，

所述标签蛋白包含与SEQ ID NO:15具有一致性或与其具有至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%一致性的氨基酸序列，

优选地，所述标签蛋白通过C端与所述阻断结合分子单元的N端之间连接，当所述阻断结合分子单元为阻断肽段时，所述标签蛋白的C端与任意一个所述阻断肽段的N端连接；

更优选地，当所述单一结构还含有所述先导肽时，所述先导肽通过所述标签蛋白与所述阻断结合分子单元之间连接。

14. 据权利要求1-13任意一项所述的聚合分子，其特征在于：

其中，所述病毒为乙肝病毒、狂犬病毒、HVP以及新冠病毒中的一种或多种。

15. 一种单一结构，其特征在于，含有：

- 权利要求1-14任意一项所述的聚合分子，
优选地，所述单一结构的大小为30-80KD，
再一优选地，所述单一结构为权利要求2-14中任意一项涉及到的单一结构。
16. 一种聚合结构，其特征在于：
由多个权利要求15所述的单一结构聚合而成。
17. 根据权利要求16所述的聚合结构，其特征在于：
其中，所述聚合结构由数量为2-10中任意一种的所述单一结构聚合而成，优选地，所述聚合结构为4个所述单一结构聚合而成。
18. 根据权利要求16或17所述的聚合结构，其特征在于：
其中，所述阻断结构单元的结合力为纳米抗体的1000-1M倍。
19. 根据权利要求16-18任意一项所述的聚合结构，其特征在于：
其中，所述聚合结构是可溶性地。
20. 一种核酸，其编码聚合分子、单一结构或聚合结构，其特征在于：
其中，所述聚合分子为权利要求1-15中任意一项所述的聚合分子；
所述单一结构为权利要求15所述的单一结构；
所述聚合结构为权利要求16-19中任意一项所述的聚合结构。
21. 一种载体，其含有权利要求20所述的核酸。
22. 一种真核宿主细胞，其包含根据权利要求20所述的核酸或21所述的载体，用于细胞内表达、细胞分泌性或体外无细胞合成表达单一结构或聚合结构，
其中，所述单一结构为权利要求15所述的单一结构；
所述聚合结构为权利要求16-19中任意一项所述的聚合结构。
23. 一种权利要求20所述的核酸或21载体在制备权利要求15所述的单一结构和/或权利要求16-19中任意一项所述多聚结构的方法中的应用。
24. 聚合分子、单一结构以及聚合结构中的任意一项在以下中的应用：
在治疗病毒的药品、病毒检测诊断、医学用途、用于针对病毒的消毒产品、化妆品、护肤品、护理品、食品、清洁产品，
其中，所述聚合分子为权利要求1-14中任意一项所述的聚合分子；
所述单一结构为权利要求15所述的单一结构；
所述聚合结构为权利要求16-19中任意一项所述的聚合结构，
优选地，直接采用经无细胞体外合成所述聚合结构得到的未纯化的产物进行所述应用。
25. 一种消毒产产品、化妆品、化妆品、护肤品、护理品、食品或清洁产品，其特征在于，
包括：
聚合分子、单一结构以及聚合结构中的任意一项的一种或多种，
其中，所述聚合分子为权利要求1-14中任意一项所述的聚合分子；
所述单一结构为权利要求15所述的单一结构；
所述聚合结构为权利要求16-19中任意一项所述的聚合结构。
26. 一种药品，其特征在于，包括：
聚合分子、单一结构以及聚合结构中的一种或多种和医药学上可接受的载剂、稀释剂

或赋形剂，

其中，所述聚合分子为权利要求1-14中任意一项所述的聚合分子；

所述单一结构为权利要求15所述的单一结构；

所述聚合结构为权利要求16-19中任意一项所述的聚合结构。

聚合分子、包括其的单一结构和多聚结构

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种聚合分子、包括其的单一结构和多聚结构、以及相关的产品、制备方法和用途。

背景技术

[0002] 病毒的细胞受体是病毒侵入靶细胞的门户,能与病毒特异性的结合,介导病毒入侵易感宿主细胞而启动其复制过程,而对宿主造成危害,例如:

[0003] 新冠病毒会利用人体的ACE2受体感染人类细胞,对于新冠病毒来说,人体细胞上的受体ACE2相当于一个“门把手”,通过病毒上的刺突蛋白会与之结合,从而打开感染人体细胞的大门。

[0004] 发表在《Nature》上的一项题为“Structural insights into hepatitis C virus receptor binding and entry”的研究中,来自美国国家卫生研究院下属的国家过敏与传染病研究所(NIAID)的研究人员从结构上揭示丙型肝炎病毒进入细胞的机制,清晰的描述了HCV包膜糖蛋白E2和CD81之间的相互作用过程既HCV进入并感染人类细胞的过程。科学家发现,在酸性条件下,HCV E2很容易与CD81受体结合,而一旦病毒和受体开始相互作用,HCV E2就会改变形状(在与CD81结合后,HCV E2中的残基418-422被移位,这使得由残基520-539组成的内环得以延伸),使病毒与细胞膜更紧密地接触,从而促进其进入细胞。

[0005] 乙型肝炎病毒(HBV)及其卫星病毒丁型肝炎病毒(HDV)必须通过结合细胞表面受体分子,才能实现对宿主细胞的感染。

[0006] 狂犬病病毒(Rabies Virus,RV)是弹状病毒科狂犬病毒属的成员,具有高度的嗜神经性并且能引起致命的脑炎。目前没有有效的治疗方法,病死率几乎100%。狂犬病病毒编码五种蛋白,其中G蛋白在决定病毒的宿主范围、嗜神经毒力、病毒的免疫原性及与宿主细胞表面受体分子的相互作用等方面起着重要的作用。RV在侵入神经肌肉接头时,位于突触后膜的nAChR和位于突触前膜的NCAM起到重要的介导作用。神经营养素受体P75同样作为狂犬病病毒的一个受体,当病毒进入神经元细胞后,P75可与狂犬病病毒G蛋白结合从而使病毒进入细胞浆内进行逆向传递。

[0007] 目前的针对这些病毒,一般是通过大分子抗体或纳米抗体等类型进行防治,例如:

[0008] 对于抗体类药物,目前治疗新冠病毒感染主要有以下几种策略:1、针对S蛋白的中和抗体,结合病毒颗粒表的S蛋白,阻断S蛋白与ACE2的结合,从而阻断病毒进入细胞。2、针对ACE2蛋白的中和抗体,通过结合病毒的受体ACE2,阻断病毒进入细胞。3、ACE2类似物,与肺细胞表面ACE2竞争结合病毒颗粒表面的S蛋白,阻断病毒与受体结合。4、针对细胞因子风暴的抗体,通过抑制细胞因子风暴,从而达到治疗新冠病毒感染的目的。

[0009] 但抗体药物的生产成本比小分子药物要高很多,需要依赖生物制药方法生成,耗时耗材,所以还难以与小分子药物进行竞争。

[0010] 另外,目前一般是单价或二价的抗体,相对来说,对病毒的捕获能力还不够。

发明内容

[0011] 本发明提供一种聚合分子、包括其的单一结构和多聚结构、以及相关的产品、制备方法和用途,通过聚合分子的聚合作用形成阻断与受体结合的多聚体,以能有效提高对病毒的结合能力。

[0012] 为此,本发明提供了以下的技术方案。

[0013] 本发明提高一种聚合分子,其特征在于:用于将对病毒与细胞受体之间的结合进行阻断的多个阻断结合分子单元聚合为聚合结构。

[0014] 本发明提高的聚合分子,还具有这样的特征:其中,聚合分子具有单一结合部位和聚合部位单一结合部位,所述单一结合部位用于与所述阻断结合分子单元结合而形成至少具有聚合分子与阻断结合分子单元的单一结构,多个单一结构通过聚合部位聚合为聚合结构,优选地,聚合分子为肽或蛋白时,单一结合部位设置在聚合分子的N端。

[0015] 本发明提高的聚合分子,还具有这样的特征:其中,所述聚合结构由数量为2-10中任意一种的所述单一结构聚合而成。

[0016] 本发明提高的聚合分子,还具有这样的特征:其中,聚合分子选自表1中的任意一项。

[0017] 本发明提高的聚合分子,还具有这样的特征:其中,聚合分子为链霉亲和素,优选地,所述链霉亲和素包含与SEQ ID NO:1具有一致性或与其具有至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%一致性的氨基酸序列。

[0018] 本发明提高的聚合分子,还具有这样的特征:其中,所述聚合分子与所述阻断结合分子单元之间通过连接分子结合,

[0019] 所述连接分子包含有荧光类蛋白、人免疫球蛋白G4、Fc以及HSA中的任意一种或多种,例如,所述连接分子是eGFP荧光蛋白或经其改造得到,优选地,通过对eGFP删除部分氨基酸得到;或:

[0020] 所述连接分子包含与SEQ ID NO:2-6中任意一个具有一致性或SEQ ID NO:2-6中任意一个具有至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%一致性的氨基酸序列,优选地,通过对eGFP删除其第1-228位的氨基酸得到;

[0021] 优选地,所述连接分子的N端与所述阻断结合分子单元连接,所述连接分子的C端与所述聚合分子N端连接。。

[0022] 本发明提高的聚合分子,还具有这样的特征:其中,阻断结合分子单元通过与病毒与细胞受体结合的部位结合而阻断病毒与受体之间的结合,和/或阻断结合分子单元通过与细胞受体结合而阻断病毒与细胞受体之间的结合。

[0023] 本发明提高的聚合分子,还具有这样的特征:其中,所述阻断结合分子单元含有至少一个对病毒与细胞受体之间的结合进行阻断的阻断分子,优选地,所述阻断分子含有与SEQ ID NO:7-9以及16-19中任意一个具有一致性或SEQ ID NO:7-9以及16-19中任意一个具有至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%一致性的氨基酸序列;进一步地,当含有多个阻断分子时,所述阻断分子之间从N端到C端顺序连接,更优选地,当所述阻断结合分子单元和所述聚合分子之间通过所述连接分子连接时,所述连接分子的N端与最末一个所述阻断分子的C端连接,所述连接分子的C端与所述单一结合部位连接,再一优选地,所述阻断分子为纳米抗体。

[0024] 本发明提高的聚合分子,还具有这样的特征:其中,细胞受体为ACE2,优选地,阻断肽为ACE2类似物。

[0025] 本发明提高的聚合分子,还具有这样的特征:其中,所述阻断结合分子单元含有至少一个第一阻断分子和/或至少一个第二阻断分子,所述第一阻断分子包含与SEQ ID NO:7具有一致性或与其具有至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%一致性的氨基酸序列,所述第二阻断分子包含与SEQ ID NO:8以及16-19中任意一个具有一致性或SEQ ID NO:8以及16-19中任意一个具有至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%一致性的氨基酸序列,优选地,所述阻断结合分子单元含有两个所述第一阻断分子或两个所述第二阻断分子更优选地,两个所述第一阻断分子之间或两个所述第二阻断分子之间通过一个的N端和另一个的C端连接;再一优选地,所述阻断结合分子单元含有所述第一阻断分子和所述第二阻断分子所述第一阻断分子与所述第二阻断肽段之间通过一个的N端和另一个的C端连接,更优选地,所述第二阻断分子的N端和所述第一阻断分子的C端连接。

[0026] 本发明提高的聚合分子,还具有这样的特征:其中,单一结构还含有用于促进聚合结构通过细胞进行表达得到、细胞进行分泌得到或体外无细胞进行表达得到的先导肽,所述先导肽包含与SEQ ID NO:10具有一致性或与其具有至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%一致性的氨基酸序,优选地,先导肽通过C端任意一个阻断肽段的N端连接。

[0027] 本发明提高的聚合分子,还具有这样的特征:其中,所述单一结构还含有所述酸性结构,所述酸性结构为带有负电的氨基酸短链聚合物,进一步地,所述酸性结构具有以下特征中的一个或多个的组合:

[0028] (1)所述酸性结构设置在C末端;

[0029] (2)所述的短链聚合物的氨基酸的个数为0-50、2-40、3-30、2-20或2-10;

[0030] (3)所述的带有负电的氨基酸为天冬氨酸和/或谷氨酸,

[0031] 优选地,所述酸性结构与所述聚合分子的C端连接。

[0032] 本发明提高的聚合分子,还具有这样的特征:其中,单一结构还含有标签蛋白,所述标签蛋白包含与SEQ ID NO:15具有一致性或与其具有至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%一致性的氨基酸序列,优选地,标签蛋白通过C端与阻断结合分子单元的N端之间连接,当阻断结合分子单元为阻断肽段时,标签蛋白的C端与任意一个阻断肽段的N端连接;更优选地,当单一结构还含有先导肽时,先导肽通过标签蛋白与阻断结合分子单元之间连接。

[0033] 本发明提高的聚合分子,还具有这样的特征:其中,病毒为乙肝病毒、狂犬病毒、HVP以及新冠病毒中的一种或多种。

[0034] 本发明还提供一种单一结构,其特征在于,含有:前述的聚合分子,优选地,单一结构的大小为30-80KD,单一结构为前述涉及的单一结构。

[0035] 本发明还提供一种聚合结构,其特征在于:由多个前述的单一结构聚合而成,聚合结构为前述涉及的聚合结构。

[0036] 本发明提供的聚合结构,还具有这样的特征:其中,聚合结构为至少四个单一结构聚合而成,优选地,聚合结构为四个单一结构聚合而成。

[0037] 本发明提供的聚合结构,还具有这样的特征:其中,阻断结构单元为阻断多肽的结

合力是为纳米抗体的1000-1M倍。

[0038] 本发明提供的聚合结构,还具有这样的特征:其中,聚合结构是可溶性地。

[0039] 本发明提供的聚合结构,还具有这样的特征:其中,聚合结构具有的热稳定温度大于等于45℃。

[0040] 本发明还提供一种核酸,其编码聚合分子、单一结构或聚合结构,其特征在于:其中,聚合分子为前述的聚合分子;单一结构为前述的单一结构;聚合结构为前述的聚合结构。

[0041] 本发明还提供一种载体,其含有前述的核酸。

[0042] 本发明还提供一种真核宿主细胞,其包含前述的核酸或前述的载体,用于细胞内表达、细胞分泌性或体外无细胞合成表达单一结构或聚合结构,其中,单一结构为前述的单一结构;聚合结构为前述的聚合结构。

[0043] 本发明还提供一种前述的核酸或前述的载体在制备单一结构和/或多聚结构的方法中的应用。

[0044] 本发明还提供一种聚合分子、单一结构以及聚合结构中的任意一项在以下中的应用:在治疗病毒的药品、病毒检测诊断、医学用途、用于针对病毒的消毒产品、化妆品、护肤品、护理品、食品、清洁产品,其中,聚合分子为前述的聚合分子;单一结构为前述的单一结构;

[0045] 聚合结构为前述的聚合结构;优选地,直接采用经无细胞体外合成聚合结构得到的未纯化的产物进行应用。

[0046] 本发明还提供一种消毒产产品、化妆品、化妆品、护肤品、护理品、食品或清洁产品,其特征在于,包括:聚合分子、单一结构以及聚合结构中的任意一项的一种或多种,其中,聚合分子为前述的聚合分子;单一结构为前述的单一结构;聚合结构为前述的的聚合结构。

[0047] 本发明还提供一种药品,其特征在于,包括:聚合分子、单一结构以及聚合结构中的一种或多种和医药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂,其中,聚合分子为前述的的聚合分子;单一结构为前述的单一结构;聚合结构为前述的聚合结构。

[0048] 本发明还提供一种聚合结构的制备方法,采用无细胞体外合成表达得到,其特征在于:对反应得到的包括聚合结构的产物进行蛋白纯化时,采用硫酸铵沉淀法,其中,聚合结构为前述的聚合结构。

[0049] 发明作用与效果

[0050] (1) 本发明提供的聚合分子,能有效将对病毒与细胞受体之间的结合进行阻断的多个阻断结合分子单元聚合为聚合结构,这样实现阻断病毒与细胞受体之间结合的阻断作用的方式,由于聚合分子的聚合作用,提高了每个聚合结构的阻断结合分子单元的个数,能从多点阻断病毒与细胞受体之间的结合,同时由于多个阻断结合分子单元,能同时结合多个病毒,多个聚合结构配合,会产生交联作用,更有效阻断病毒与细胞受体之间的结合,通过实验可以看出,聚合后相比聚合前,对病毒的阻断效果提高了,并且结合力是纳米抗体的1000-1M倍,由此,这种方式,相比单个位点结合来说,需要的结合分子的数量也更少,生产成本也更低;

[0051] (2) 进一步地,当至少四个含有前述聚合分子的单一结构通过各自的聚合分子相

互聚合为聚合结构时,由于每个聚合结构具有至少四个单一结构,形成至少四面体的结构,从而能更有效实现交联效果,进一步提高上述的阻断作用,而优选地,当为四个单一结构聚合的聚合结构时,相比大于四个的聚合结构,聚合结构的大小适宜,且保证足够的阻断作用能力,又不产生空间结合位点和空间浪费;

[0052] (3) 进一步地,本发明提供的链霉亲和素,能让单一结构通过聚合分子的聚合,90%以上为四个单一结构聚合形成的聚合结构;

[0053] (5) 进一步地,阻断结合分子是可以通过肽段的形式进行病毒和细胞受体之间的结合阻断,相比抗体类,整个单一结构或聚合结构的大小更小,而且结构更单一,更适宜通过细胞体内表达、细胞分泌或体外表达获得;

[0054] (6) 进一步地,阻断分子为多个,可以增加多点阻断病毒与细胞受体之间的结合的机会;进一步地,第一阻断分子和/或第二阻断分子,对病毒与细胞受体之间的结合的阻断效果更好;

[0055] (7) 进一步地,当单一结构还含有用于促进聚合结构通过

[0056] 细胞表达、细胞分泌或体外无细胞表达的先导肽时,更有利于通过细胞表达、细胞分泌或体外无细胞表达的方式生产前述的单一结构或前述的聚合结构;

[0057] (8) 进一步地,当所阻断结合分子单元与聚合分子之间通过荧光蛋白或其改造得到连接分子连接时,能提高病毒阻断效果;进一步地,单一结构还含有酸性结构,该酸性结构的存在,能提高对病毒的阻断效果,并且能提高聚合结构的热稳定性。

附图说明

[0058] 图1-图22为实施例2涉及的病毒阻断蛋白对假病毒的抑制实验结果图;

[0059] 图23为实施例2中,病毒阻断蛋白对假病毒作用前后的电镜图;

[0060] 图24为实施例1中一种聚合结构的三维示意图;

[0061] 图25为实施例1中的一种聚合结构对病毒的交联作用三维示意图。

具体实施方式

[0062] 以下结合附图来说明本发明的具体实施方式。对于实施例中所用到的具体方法或材料,本领域技术人员可以在本发明技术思路的基础上,根据已有的技术进行常规的替换选择,而不仅限于本发明实施例的具体记载。

[0063] 实施例中所使用的方法如无特殊说明,均为常规方法;所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径获得。

[0064] 本发明中的“冠状病毒”是指冠状病毒在系统分类上属套式病毒目(Nidovirales)冠状病毒科(Coronaviridae)冠状病毒属(Coronavirus),且以ACE2作为结合受体的冠状病毒,包括但不限于SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2等。

[0065] 刺突蛋白,也即S蛋白,为病毒表面的一类标志性跨膜蛋白,有两个亚基:S1和S2,受体结合位点(RBD)位于S1亚基上。它以三聚体的形式组成病毒粒子外膜表面的刺突,其主要功能是识别宿主细胞表面受体,介导与宿主细胞的融合。

[0066] 本发明的ACE2也称为ACEH,称为血管紧张素转化酶2。ACE2由805个氨基酸组成,是具有单一胞外催化结构域的I型跨膜糖蛋白。ACE2为SARS-CoV-2等冠状病毒感染人体细胞

的受体蛋白。

[0067] 在本发明中,体外无细胞表达,也即无细胞蛋白质合成系统,是一种基于原核或真核细胞的转录-翻译偶联的体系,是指在包含生物提取物和/或确定的试剂的反应混合物中多肽或其他大分子的合成。

[0068] 本发明中“D2P”体系包括但不限于IVTT反应(体外转录翻译反应)。本发明中,优选IVTT反应。IVTT反应,对应IVTT体系,是在体外将DNA转录翻译为蛋白质(Protein)的过程,因此,我们还将这类的体外蛋白合成体系称为、D-to-P体系、D_to_P体系、DNAto-Protein体系;相应的体外蛋白合成方法,还称为D2P方法、D-to-P方法、D_to_P方法、DNA-to-Protein方法,其与“体外无细胞蛋白合成体系”、“体外表达系统”、“体外蛋白合成体系”、“体外蛋白质合成反应体系”、“无细胞蛋白合成体系”等表述具有相同的含义。蛋白质体外合成系统、体外蛋白合成体系、无细胞系统、无细胞蛋白合成体系、无细胞体外蛋白合成体系、体外无细胞蛋白合成体系、体外无细胞合成体系、CFS体系(cell-free system)、CFPS体系(cell-free protein synthesis system)等描述方式。包括体外翻译体系、体外转录翻译体系(IVTT体系)等。我们还将体外蛋白合成系统称为“蛋白质合成工厂”(Protein Factory)。体外蛋白合成反应,是指在体外无细胞合成体系中合成蛋白的反应,至少包括翻译过程。

[0069] 本发明体外无细胞蛋白合成体系中需要的蛋白组分(举例如RNA聚合酶),可以通过内源方式提供,也可以通过外源方式添加。通过内源方式提供时,可以参考包括但不限于文献CN108690139A、CN109423496A、CN106978439A、CN110408635A、CN110551700A、CN110093284A、CN110845622A、CN110938649A、CN111378708A、CN111484998 A、“Molecular and Cellular Biology, 1990, 10(1): 353-360”等现有文献及其引用文献提供的基因改造方法,具体地,包括但不限于:将编码序列插入到细胞内游离型质粒,将编码基因整合入细胞基因组,及其组合方式。通过外源方式提供时,用量可以根据体系所需进行控制和调节。

[0070] 宿主细胞是本领域中众所周知的,包括但不限于大肠杆菌、CHO细胞、中国仓鼠卵巢、NS0、SP2细胞、海拉细胞(HeLa cell)、小仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(例如,Hep G2)、A549细胞、HEK-293细胞和许多其它细胞系。草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)或粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)、两栖动物细胞、细菌细胞、植物细胞和真菌细胞。真菌细胞包含酵母和丝状真菌细胞,丝状真菌细胞包含例如,毕赤酵母、芬兰毕赤酵母(*Pichia finlandica*)、喜海藻糖毕赤酵母(*Pichia trehalophila*)、科克拉马毕赤酵母(*Pichia koclamae*)、膜醭毕赤酵母(*Pichia membranaefaciens*)、微小毕赤酵母(*Pichia minuta*) (甲醇诱导型酵母(*Ogataea minuta*))、林氏毕赤酵母(*Pichia lindneri*)、仙人掌毕赤酵母(*Pichia opuntiae*)、耐热毕赤酵母(*Pichia thermotolerans*)、柳毕赤酵母(*Pichia salictaria*)、松栎毕赤酵母(*Pichia guercuum*)、皮杰普毕赤酵母(*Pichia pijperi*)、树干毕赤酵母(*Pichiastiptis*)、甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*)、毕赤酵母菌(*Pichia sp.*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、酵母菌(*Saccharomyces sp.*)、多形汉逊酵母(*Hansenulapolyomorpha*)、克鲁维酵母菌(*Kluyveromyces sp.*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、卢克诺文思金孢子菌(*Chrysosporium lucknowense*)、镰刀菌(*Fusarium sp.*)、禾谷镰刀菌(*Fusarium gramineum*)、镰孢霉(*Fusarium venenatum*)、小立

碗藓(*Physcomitrella patens*)以及粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)。

[0071] 进一步地,体外无细胞蛋白合成体系,包括但不限于大肠杆菌体外蛋白合成体系、细菌体外蛋白合成体系、哺乳动物细胞(如HF9、HeLa、CHO、HEK293)体外蛋白合成体系、植物细胞体外蛋白合成体系、酵母细胞体外蛋白合成体系、昆虫细胞体外蛋白合成体系。酵母细胞选自下组:酿酒酵母、毕氏酵母、克鲁维酵母中的任意一个或多个的组合。克鲁维酵母例如为乳酸克鲁维酵母。

[0072] 本发明的体外蛋白合成体系、模板、质粒、目标蛋白、体外蛋白合成反应(孵育反应)、各种制备方法、各种检测方法等技术要素,还可以各自独立地从下述文献中选择合适的实施方式或实施方法,包括但不限于CN111484998A、CN106978349A、CN108535489A、CN108690139A、CN108949801 A、CN108642076A、CN109022478A、CN109423496A、CN109423497A、CN109423509A、CN109837293A、CN109971783A、CN109988801A、CN109971775A、CN110093284A、CN110408635A、CN110408636A、CN110551745A、CN110551700A、CN110551785A、CN110819647A、CN110845622A、CN110938649A、CN110964736A等文献。除非和本发明目的相冲突,否则,这些文献及其引用文献以全部内容、全部目的被引用。

[0073] 本发明,提及的对病毒与细胞受体之间的结合进行阻断,指的是使得所述病毒失活,例如可以是以下方式:

[0074] 一种方式:减少病毒与细胞受体之间的结合,包括:

[0075] 第一种:属于竞争性阻断,也即用一种与受体的类似物,来与病毒结合,减少病毒结合受体细胞的机会;或者通过与受体结合的分子,减少能被病毒结合的细胞受体,也就减少了病毒结合受体细胞的机会;

[0076] 第二种:通过不同病毒之间以阻断结合分子单元为媒介形成的交联作用的阻挡,减少病毒与细胞受体之间的结合机会;

[0077] 另一种方式利用抗体对与细胞受体结合的功能区域进行破坏,达到阻断的目的。

[0078] 本文的“聚合分子”,指能通过例如分子间作用力,或者特定结构域等自缔合的作用,聚合到一起的分子。

[0079] 本文的“单一结构”指聚合分子聚合之前的单个结构,也即至少具有阻断结合分子单元和聚合分子的结构,也称为单体。

[0080] 本文的“聚合结构”指通过聚合分子之间的结合,将多个单一结构聚合到一起形成的结构,也称为多聚体。

[0081] 实施例1

[0082] 本实施例,对本发明的内容进行具体解释说明。

[0083] 本实施例提供一种聚合分子,其特征在于:用于将对病毒与细胞受体之间的结合进行前述的阻断的阻断结合分子单元聚合为聚合结构。这里的阻断结合分子单元具有与细胞受体或病毒结合的结合分子,从而能竞争性阻断病毒与细胞受体的结合。

[0084] 为了便于说明,本文的聚合分子,用A表示,本文的阻断结合分子单元用B表示。

[0085] 通过聚合分子的聚合作用,将多个阻断结构分子单元进行聚合,提高了每个聚合结构的阻断结合分子单元的个数,也即增加了竞争阻断的点,能从多点阻断病毒与细胞受体之间的结合,同时由于多个阻断结合分子单元,能同时结合多个病毒,产生交联作用,更

有效阻断病毒与细胞受体之间的结合。

[0086] 具体地,本实施例的聚合分子具有单一结合部位和聚合部位,

[0087] 单一结合部位用于与阻断结合分子单元结合而组成单一结构,多个单一结构通过聚合部位聚合为聚合结构,也即不同单一结构之间的聚合部位具有能结合到一起的作用,例如通过分子间作用力等,发生例如自缔合的结合。优选地,聚合分子为肽或蛋白时,单一结合部位设置在聚合分子的N端,也即通过阻断结合分子单元的C端与聚合分子的N端连接。具体地,该单一结构的基本结构如式一:

[0088] B-A(式一):优选地,单一结合部位设置在聚合分子的C端。

[0089] 优选地,聚合结构为至少四个单一结构聚合而成,当至少四个含有前述聚合分子的单一结构通过各自的聚合分子相互聚合为聚合结构时,由于每个聚合结构具有至少四个单一结构,形成至少四面体的结构,从而能更有效实现交联效果,进一步提高上述的阻断作用,而优选地,当为四个单一结构聚合的聚合结构时,相比大于四个的聚合结构,聚合结构的大小适宜,且保证足够的阻断作用能力,又不产生空间结合位点和空间浪费。

[0090] 图24为实施例1中一种聚合结构的三维示意图;

[0091] 图25为实施例1中聚合结构对病毒的交联作用三维示意图。

[0092] 如图24,图中的聚合结构,是三个单一结构聚合而成,中间部分是聚合部位聚合到一起,各个阻断结合分子单元分布在三个点,形成四面体的结构。

[0093] 如图25所示,图中聚合结构由单个单一结构聚合而成,每个聚合结构除了两个阻断结合分子分别结合同一病毒外,另外一个阻断结合分子去结合其他病毒,由此,两个病毒之间通过阻断结合分子形成交联,可以不断阻挡其他病毒对细胞受体的接触,从而提高阻断作用。

[0094] 本实施例中,聚合分子选自表1中的任意一项:

表 1		
序号	蛋白名称	基因名称
1	细胞肿瘤抗原 P53 (抗原 NY-CO-13)	TP53 P53
2	含有 BTB/POZ 域的蛋白质 KCTD1(含有钾通道聚合部位的蛋白质 1)	KCTD1 C18orf5
3	钾电压门控道亚族 KQT 成员 1	KCNQ1 KCNA8 KCNA9 KVLQT1
4	蛋白质 CBFA2T1(细胞周期调节蛋白-D-相关蛋白质)(821 蛋白质)(蛋白质 ETO)(蛋白质 MTG8)(含有锌指 MYND 域的蛋白质)	RUNX1T1 AML1T1CBFA2T1CDRETOMTG8 ZMYND2
5	用于 CUL3 介导的 RhoA 降解蛋白质 3 (hBACURD3) 的含有 BTB/POZ 域的适配体(含有 BTB/POZ 域的蛋白质 KCTD10)	KCTD 10 ULR061 MSTP028

[0095]

	(含有钾通道聚合部位的蛋白质 10)	
[0096]	钾电压门控道亚族 H 成员 2 (Eag 同源物)(醚-a-go-go 相关基因钾通道 1)(ERG-1)(Eag 相关蛋白质 1)(醚-a-go-go 相关蛋白质 1)(H-ERG)	KCNH2 EGR EGR1 HERG
	7 C-C 基序趋化因子 5 (EoCP)	CCL5 D17S136ESA5
	8 链霉亲和素	

[0097] 在一示例中,聚合分子为链霉亲和素,或含有与SEQ ID NO:1具有一致性或与其具有至少50%、60%、70、80%、85%、90%、95%或99%一致性的氨基酸序列。通过这样的聚合分子,使得聚合产生的四聚结构(四个单一结构聚合成)达到80%以上,甚至是90%以上。

[0098] 在一示例中,聚合分子与阻断结合分子单元之间可以另外通过连接分子结合,为便于说明,连接分子用D表示。

[0099] 在一示例中,连接分子包含有荧光类蛋白、人免疫球蛋白G4、Fc以及HSA中的任意一种或多种,例如,连接分子是eGFP荧光蛋白或经其改造得到,优选地,改造是通过对eGFP删除部分氨基酸得到,例如是EGFP荧光蛋白或经其改造得到,优选地,通过对eGFP删除其第1-228位的氨基酸得到。。

[0100] 一优选地,连接分子包含与SEQ ID NO:2具有一致性或与其具有至少50%、60%、70、80%、85%、90%、95%或99%一致性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:3具有一致性或与其具有至少50%、60%、70、80%、85%、90%、95%或99%一致性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:4具有一致性或与其具有至少50%、60%、70、80%、85%、90%、95%或99%一致性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:5具有一致性或与其具有至少50%、60%、70、80%、85%、90%、95%或99%一致性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:6具有一致性或与其具有至少50%、60%、70、80%、85%、90%、95%或99%一致性的氨基酸序列。

[0101] 在一示例中,连接分子的N端与阻断结合分子单元连接,连接分子的C端与聚合分子的设置在N端的单一结合部位连接,此时单一结构的结构如式二所示:

[0102] B-D-A(式二):优选地,B的C端与D的N端连接,D的N端与A的C端连接。

[0103] 在一示例中,阻断结合分子单元含有至少一个与病毒的受体结合区域进行结合的阻断分子。也即可能包括一个阻断分子,也可能是多个阻断分子,当包括多个时,这些阻断分子的氨基酸序列可能是相同的,也可能是不同的。

[0104] 当阻断分子为多个时,则可以增加多点阻断病毒与细胞受体之间的结合的机会,提高前述的阻断作用。

[0105] 在一示例中,当阻断分子为多个时,阻断分子之间从C端到N端顺序连接,也即前一个的C端和后一个的N端连接,具体为B1-B2-B3...Bn(n为大于1的正整数);更优选地,当阻断结合分子单元和聚合分子之间通过连接分子连接时,连接分子的N端与最末一个阻断分子的C端连接,连接分子D的C端与聚合分子连接,具体为B1-B2-B3...Bn-D-A。

[0106] 在一示例中,阻断分子含有与SEQ ID NO:7-9以及16-19中任意一个具有一致性或与其具有至少50%、60%、70、80%、85%、90%、95%或99%一致性的氨基酸序列。具体解释就是:

[0107] 阻断结合分子单元中含有的每个阻断分子,可能含有SEQ ID NO:7-9以及16-19中所示几种氨基酸序列中的任意一种,或是含有与SEQ ID NO:7-9以及16-19中的任意一种具

有至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%一致性的氨基酸序列：

[0108] 例如，阻断分子含有与SEQ ID NO:7具有一致性的氨基酸序列，又例如，阻断分子是与SEQ ID NO:7具有至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%一致性的氨基酸序列。

[0109] SEQ ID NO:16-19，具体显示如下：

[0110] SEQ ID NO:16(Pep170)：

[0111] STIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNMNAGDKWSAFLK EQSTLAQMYPLQEIQNLTVKLGGGGSGGGGSTSGGVTGGLPNMTQGFWENSMLTDPGN VQKAVCHPTAWDLGKGFRI LMCTKVTMDDFLTAHHEMGHIQYDMAYAAQPFLRN；

[0112] SEQ ID NO:17(Pep180)：

[0113] STIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNMNAGDKWSAFLKEQSTLAQMYPLQEIQNLTVKLQLQALGGGGSGGGGSTSGGVTGFFVSVGLPNMTQGFWENSMLTDPGNVQKAVCHPTAWDLGKGFRI LMCTKVTMDDFLTAHHEMGHIQYDMAYAAQPFLRN；

[0114] SEQ ID NO:18(Pep190)：

[0115] STIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNMNAGDKWSAFLKEQSTLAQMYPLQEIQNLTVKLQLQALQQGGGGSGGGGSTSGGVTGRIFKEAEKFFVSVGLPNMTQGFWENSMLTDPGNVQKAVCHPTAWDLGKGFRI LMCTKVTMDDFLTAHHEMGHIQYDMAYAAQPFLRN；

[0116] SEQ ID NO:19(Pep200)：

[0117] STIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNMNAGDKWSAFLKEQSTLAQMYPLQEIQNLTVKLQLQALQQGGGGSGGGGSTSGGVTGGHAGGTVDARIFKEAEKFFVSVGLPNMTQGFWENSMLTDPGNVQKAVCHPTAWDLGKGFRI LMCTKVTMDDFLTAHHEMGHIQYDMAYAAQPFLRN。

[0118] 在一示例中，阻断分子可以为肽段或抗体。当采用抗体时，优选为纳米抗体，可以降低整体单一结构的大小。

[0119] 当采用阻断肽进行阻断，相比抗体类，整个结构的大小更小，而且结构更单一，更适宜通过细胞体内表达、细胞分泌或体外表达获得。具体地，采用阻断肽段，整个单一结构的大小范围为30-80KD。

[0120] 当阻断肽段为多个时，则可以增加多点阻断病毒与细胞受体之间的结合的机会，提高前述的阻断作用。

[0121] 在一示例中，细胞受体为ACE2。

[0122] 在一示例中，阻断结合分子单元含有至少一个第一阻断分子(第一阻断肽段，为了便于说明，用B1表示)和/或至少一个第二阻断分子(第二阻断肽段，为了便于说明，用B2表示)。所述第一阻断分子包含与SEQ ID NO:7具有一致性或与其具有至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%一致性的氨基酸序列，所述第二阻断分子包含与SEQ ID NO:8以及16-19中任意一个具有一致性或与其具有至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%一致性的氨基酸序列。第一阻断分子和/或第二阻断分子，分别为肽段，相比纳米抗体，对病毒与细胞受体之间的结合阻断效果尤其好。

[0123] 在一示例中，阻断结合分子单元含有两个第一阻断分子或两个第二阻断分子，更优选地，两个第一阻断分子之间或两个第二阻断分子之间通过一个的N端和另一个的C端连接，也即例如B1-B1或B2-B2；

[0124] 在一示例中,当阻断结合分子含有第一阻断分子和第二阻断分子时,第一阻断分子与第二阻断分子之间通过一个的N端和另一个的C端连接,也即要么第一阻断分子的N端与第二阻断分子的C端连接,要么,第二阻断分子的N端与第一阻断分子的N端连接。

[0125] 优选地,第二阻断分子的N端和第二阻断分子的C端连接,此时,单一结构的结构例如为式三或式四所示:

[0126] B1-B2-A(式三):优选地,该结构的连接方式为,B1的C端与B2的N端连接,B2的C端与A的N端连接,也即前一个的C端和后一个的N端连接(下同);

[0127] B1-B2-D-A(式四):优选地,该结构的连接方式为,B1的C端与B2的N端连接,B2的C端与D的N端连接,D的C端与A的N端连接。

[0128] 在一示例中,单一结构还含有用于促进聚合结构通过细胞进行表达得到、细胞分泌得到或体外无细胞进行表达得到的先导肽(为便于说明,用C表示),先导肽包含与SEQ ID NO:10具有一致性或与其具有至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%一致性的氨基酸序列,此时,单一结构的结构在阻断结合分子单元和聚合分子的基础上,增加了先导肽,单一结构的一个结构例举如式五所示:

[0129] C-B-A(式五):优选地,C的C端与B的N端连接,B的C端和A的N端连接。

[0130] 有两个阻断分子时,优选地,先导肽与任意一个阻断分子的N端连接,此时,单一结构的结构例如式六所示:

[0131] C-B1-B2-A(式六):该结构式的连接,优选地,C的C端与B1的N端连接,B1的C端与B2的N端连接,B2的C端与A的N端连接。

[0132] 当有连接分子时,单一结构的结构例如式七所示:

[0133] C-B1-B2-D-A(式七):该结构式的连接,优选地,也是前一个的C端与后一个的N端连接,也即,C的C端与B1的N端连接,B1的C端与B2的N短链连接,B2的C端与D的N端连接,D的C端与A的N端连接。

[0134] 在一示例中,酸性结构含有至少两个连续的天冬氨酸氨基酸(为便于说明,用d表示),和/或至少两个连续的谷氨酸氨基酸(为便于说明,用e表示),和/或至少一组天冬氨酸氨基酸和氨基酸的组合。例如,酸性结构含有10个连续的天冬氨酸(用10d表示)、10个连续的谷氨酸(用10e表示),8个连续的天冬氨酸和8个连续的谷氨酸(用8d8e表示),5个d-e(5de,一个d和一个e是一组,总共5组)。

[0135] 在一示例中,稳定分子与聚合分子的C端连接,此时,单一结构的基本结构如式八所示:

[0136] B-A-E(式七):式中,优选地,前一个的C端与后一个的N端连接;

[0137] 在此基础上,再组合前述的C、D中的任意一个或多个,得到不同的结构式,例如式九-式十一所示:

[0138] C-B-A-E(式九):式中,优选地,前一个的C端与后一个的NC端连接;

[0139] B-D-A-E(式十):式中,优选地,前一个的C端与后一个的N端连接;

[0140] C-B-D-A-E(式十一):式中,优选地,前一个的C端与后一个的N端连接;

[0141] 当B包括B1和B2时,例如式十二所示:

[0142] C-B1-B2-D-A-E(式十二):式中,优选地,前一个的C端与后一个的N端连接。

[0143] 在一示例中,单一结构还含有标签蛋白(为便于说明,用F表示),标签蛋白为了前

述的纯化单一结构或前述的聚合结构用,在一示例中,标签蛋白包含与SEQ ID NO:15具有一致性或与其具有至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%一致性的氨基酸序列。

[0144] 优选地,标签蛋白通过C端与阻断结合分子单元的N端之间连接,也即标签蛋白的C端在阻断结合分子单元N端一侧,此时,单一结构的基本结构如式十三所示:

[0145] F-B-A(式十三):式中,优选地,前一个的C端与后一个的N端连接。

[0146] 在此基础上,再组合前述的C、D以及E中的任意一个或多个,得到不同的结构式,例如式十四-式十六所示:

[0147] F-B-D-A(式十四):式中,优选地,前一个的C端与后一个的N端连接。

[0148] C-F-B-A(式十五):式中,优选地,前一个的C端与后一个的N端连接。

[0149] F-C-B-D(式十六):式中,优选地,前一个的C端与后一个的N端连接,此时,F的C端虽然没有直接与B的N端连接,但通过C进行了连接,也即F的C端位于B的N端的一侧(其他类似解释)。

[0150] 在一示例中,当单一结构还含有先导肽时,先导肽通过标签蛋白与阻断结合分子单元之间连接,如式十七所示:

[0151] C-F-B-D-A(式十七):优选地,前一个的C端与后一个的N端连接,同样地,此时是先导肽没有直接与阻断结合分子之间连接,而是通过标签蛋白进行连接。

[0152] 以上不同的结构式中,当阻断肽段为B1和/或B2时,B1和B2同时出现,此时前面的结构式中,B1和B2的位置可以为B1-B2,也可以为B2-B1;也可以只出现这两个中的任意一个,此时B用B1或B2表示。

[0153] 在一示例中,前述的病毒为乙型肝炎病毒、狂犬病毒、HVP以及新冠病毒中的任意一种或多种。

[0154] 在一示例中,本实施例涉及的单一结构的大小为30-80KD。

[0155] 在一示例中,阻断结构单元为阻断多肽的结合力是为纳米抗体或抗体的1000-1M倍。

[0156] 在一示例中,聚合结构是可溶性地,例如溶于水溶液。

[0157] 在一示例中,前述的聚合分子聚合单一结构后,能使得聚合结构具有的热稳定温度接近70℃,优选地,大于等于80℃。

[0158] 本实施例还提供一种核酸,其编码前述的单一结构或编码前述的聚合结构。

[0159] 本实施例还提供一种载体,其含有前述的核酸。

[0160] 本实施例还提供一种真核宿主细胞,其包含前述的核酸或载体,用于细胞内表达、细胞分泌性或体外无细胞合成表达前述的单一结构或前述的聚合结构。

[0161] 本实施例还提供一种前述的核酸或前述的载体在制备单一结构和/或多聚结构的方法中的应用。

[0162] 由于前述的聚合分子聚合单一结构形成聚合结构带来的阻断优势,本实施例在以下应用或产品中,能更好地发挥阻断作用,从而更好地实现对特定病毒的预防、或治疗或检测等作用:

[0163] (1) 本实施例还提供前述的聚合分子、前述的单一结构以及前述的聚合结构中的任意一项在以下中的应用:在治疗病毒的药品、病毒检测诊断、医学用途、用于针对病毒的消毒产品、化妆品、护肤品、护理品、食品、清洁产品。

[0164] (2) 本实施例还提供一种消毒产产品、化妆品、护肤品、护理品、食品或清洁产品，其特征在于，包括：前述的聚合分子、前述的单一结构以及前述的聚合结构中的任意一项的一种或多种；

[0165] (3) 本实施例还提供一种药品，包括：前述的聚合分子、前述的单一结构以及前述的聚合结构中的一种或多种和医药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂。

[0166] 上述的消毒产品例如空气清洁消毒、水的清洁消毒、食品消毒、衣服消毒、家庭用具以及各种工具或设施等一切可能需要消毒的地方、实务或场所，工具比如交通工具，设施比如公共汽车站；

[0167] 上述的护肤品例如涂面霜、喷雾水、爽肤水、眼霜等涂覆皮肤表面的产品；

[0168] 上述的化妆品例如粉底液、腮红等；

[0169] 上述的护理品例如容易感染病毒的表面或辅助用品的护理液、护理膏、喷雾等，例如滴眼液、辅助用品例如隐形眼镜护理液等；

[0170] 上述的清洁产品，例如洗洁剂、洗发水、沐浴露、洗衣液等。

[0171] 本文的聚合结构，本文也称为病毒阻断蛋白、阻断蛋白。

[0172] 优选地，阻断蛋白通过康码(上海)生物科技有限公司D2P技术进行生产，如D2P系统，D2P技术进行生产，如包括如下步骤：该基因经过编码优化并克隆到pD2P载体中。质粒是使用Ampⁱ系统扩增，然后添加到蛋白质工厂快速反应中系统(康码(上海)生物科技有限公司)，体积比为1:30。这将反应混合物在30℃下孵育4小时，然后通过离心收集纯化。将无细胞混合物的上清液与磁性His Monster Beads(Kangma Healthcode(Shanghai)Biotech)在4℃下旋转1小时。用洗涤缓冲液(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 500mM NaCl, 10mM咪唑)并用洗脱缓冲液(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 500mM NaCl, 250mM咪唑)。

[0173] Ampⁱ系统为：终浓度为20-30μM的随机引物，0.05-0.15μg/mL的质粒模板，0.5-1mM的dNTP，2×BSA，0.05-0.1mg/mL的phi29DNA聚合酶，1×phi29反应缓冲液(成分为50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 10mM(NH₄)₂SO₄, 4mM DTT, pH7.5)。

[0174] 实施例2

[0175] 本实施例以病毒为新冠病毒、细胞受体为ACE2为例的具体实验，说明各种结构的聚合结构的阻断优势。

[0176] 1. 实验例涉及的病毒阻断蛋白的制备IVTT反应：

[0177] 将优化后的目标蛋白的基因序列(包括编码前述各种病毒阻断蛋白结构的基因序列)插入到质粒中，然后加入到自制的乳酸克鲁维酵母体外无细胞蛋白合成体系中，以乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyceslactis* NRRL Y-1140)制备体外。本实施例所用体外无细胞蛋白合成体系(总体积30μL)：包括乳酸克鲁维酵母细胞提取物50% (v/v)，22mM三羟甲基氨基甲烷(pH8)，90mM醋酸钾，4.0mM醋酸镁，3.0mM核苷三磷酸混合物，0.16mM氨基酸混合物，22mM磷酸钾，0.003mg/mL淀粉酶，3% (w/v) 聚乙二醇(PEG-8000)，340mM麦芽糊精(以葡萄糖单元计量，对应约55mg/mL)，0.04mg/mL外源添加的RNA聚合酶，以及15ng/μL目标蛋白DNA等。当荧光蛋白DNA的种类大于1时，这里的15ng/μL为各荧光蛋白DNA的总浓度。将上述反应体系置于22-30℃的环境中，静置孵育约20h。

[0178] IVTT反应后，纯化使用His磁珠(康码生物产品)纯化，蛋白洗脱后，超滤离心置换至PBS缓冲液中。用0.22μm的针筒过滤器过滤后，得到纯化蛋白，4度保存待用。

[0179] 1.以下对本实施例各种实验涉及的制备的病毒阻断蛋白结构式进行说明：

表 2		
序号	构建的 结构名称	结构说明 (N 端到 C 端)
[0180] 1	Kmds00 1	C-F-B1-B2-D1-A: Leading-Histag-Pep56-Pep160-Tram-OctaTag
2	Kmds00 2	C-F-B1-B2-D1-A-E (Kmds001+酸性结构 E10d): Leading-Histag-Pep56-Pep160-Tram-OctaTag-MrTail (酸性结构的序 列, 10d)

[0181]

3	Kmds00 3	C-F-B1-B2-D1-A-E (Kmds001+酸性结构 E10e): Leading-Histag-Pep56-Pep160-Tram-OctaTag-MrTail (酸性结构的序列, 10e)
4	Kmds00 6	C-F-B1-B2-D1-A-E (Kmds001+酸性结构的序列 E8d8e): Leading-Histag-Pep56-Pep160-Tram-OctaTag-MrTail (酸性结构的序列, E8d8e)
5	Kmds00 8	C-F-B1-D1-A (Kmds001- B2): Leading-Histag-Pep56-Tram-OctaTag
6	Kmds00 7	F-B2-D1-A (Kmds001- B1): Leading-Histag-Pep160-Tram-OctaTag
7	Kmds01 1	C-F-B2-D1-A-E (Kmds007+酸性结构 E10d): Leading-Histag-Pep160-Tram-OctaTag-MrTail (酸性结构的序列, E10d)
8	Kmds01 2	C-F-B2-D1-A-E (Kmds007+酸性结构 E10e): Leading-Histag-Pep160-Tram-OctaTag-MrTail
9	Kmds01 3	F-B2-D1-A-E (Kmds007+酸性结构 E5de): Leading-Histag-Pep160-Tram-OctaTag-MrTail (酸性结构的序列, E5de)
10	Kmds00 14	C-F-B2-D1-A-E (Kmds007+酸性结构 E8d8e): Leading-Histag-Pep160-Tram-OctaTag-MrTail (酸性结构的序列, E8d8e)
11	Kmds00 9-2	C-F-B3-D1-A(Kmds007 中用 Pep130 替换 Pep160) Leading-Histag-Pep130-Tram-OctaTag
12	Kmds00 9	F-B3-D1 Leading-Histag-Pep130-Tram
13	Kmds04 4	C-F-B2-B2-D1-A-E (Kmds012 基础上增加一个 B2): Leading-Histag-Pep160-Pep160-Tram-OctaTag-MrTail
14	KMds0 30	F-B1-B2-D1-A-E (KMds003-先导肽 C) Histag-Pep56-Pep160-Tram-OctaTag-MrTail

[0182]

15	KMds0 31	F-B1-B2-D1-A-E (KMds006-先导肽 C) Histag-Pep56-Pep160-Tram-OctaTag-MrTail
16	KMds0 32	F-B2-D-A-E (Kmds0012-先导肽 C) Leading-Histag-Pep56-Pep160-Tram-OctaTag-MrTail
17	KMds0 33	F-B2-D1-A-E (Kmds014-先导肽 C) Histag-Pep160-Tram-OctaTag-MrTail
18	KMds1 04	F-B2-B2-D1-A-E (Kmds044-先导肽 C) Histag-Pep160-Pep160-Tram-OctaTag-MrTail
19	KMds0 36	C-F-B1-B2-A-E (KMds003-连接分子 D): Leading-Histag-Pep56-Pep160-OctaTag-MrTail
20	KMds0 38	C-F-B2-A-E (Kmds012-连接分子 D): Leading-Histag-Pep160-OctaTag-MrTail
21	KMds1 08	C-F-B2-A-E (Kmds007-D): Leading-Histag-Pep160-Pep160-OctaTag-MrTail
22	KMds0 45	C-F-B1-B2-D2-A-E, KMds003 的 Tram 的部分被删除, 保留 Tram 的 C 末端 10 个氨基酸残基得到: Leading-Histag-Pep56-Pep160-Tram 删除部分-OctaTag-MrTail (酸性结构的序列, 10e)
23	KMds0 46	C-F-B2-D2-A-E, KMds012 的 Tram 的部分被删除, 保留 Tram 的 C 末端 10 个氨基酸残基得到: Leading-Histag-Pep160-Tram 删除部分-OctaTag-MrTail
24	KMds1 09	B2-B2-D2-A-E: KMds104 的 Tram 的部分被删除, 保留 Tram 的 C 末端 10 个氨基酸残基得到: Leading-Histag-Pep160-Pep160-Tram 删除部分-OctaTag-MrTail
25	KMds0 42	C-F-B1-B2-D1-E (Kmds003-聚合分子 A): Kmds003 中的 OctaTag 删除后得到, Leading-Histag-Pep56-Pep160-Tram-MrTail
26	KMds0 43	C-F-B2-D1-E (KMds012-聚合分子 A): Leading-Histag-Pep160-Tram-MrTail

[0183]	27	KMds1 05	F-B2-B2-D3-A-E, KMds104 的 Tram 换成 Fc 得到: Leading-Histag-Pep160-Pep160-Fc-OctaTag-MrTail
	28	KMds1 21	F-B2-B2-D4-A-E, KMds104 的 Tram 换成 HSA 上的一段形成 α 螺旋的残基序列得到: Leading-Histag-Pep160-Pep160-HSA-OctaTag-MrTail
	29	KMds1 12	F-B2-D5-A-E: KMds032 的 Tram 换成 HSA 上的一段形成 α 螺旋的残基序列, 同时该残基序列中的 Cys 替换为 Gly: Leading-Histag-Pep56-Pep160-HSA-OctaTag-MrTail
	30	Kmds05 2	C-F-B1-B2-E (Kmds003-A-D) Leading-Histag-Pep56-Pep160-MrTail (酸性结构的序列, 10e)
表中, “+” 表示增加, “-” 表示去掉			

[0184] 表2中涉及的序列说明, 如表3:

表 3		
名称代码	序列号	氨基酸序列
A:聚合分子 OctaTag	SEQIDNO:1	SDVQSSLTGTWYNELNSKMELTANKDGTLTGKY LSKVGDVYVPYPLSGRYNLQPPAGQGVALGWAV SWENSKIHSATTWSGQFFSESSPVILTQWLLSSST ARGDVWESTLVGNDSFTKTAPTEQQIAHAQLHC RAPRLK
D1 连接分子: EGFP	SEQIDNO:2	VSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGE GDATNGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYG QCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTISFK DDGTYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGN ILGHKLEYNFNSHNVIYITADKQKNGIKANFKIRH NVEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYS TQSKLSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDE LYK

[0186]

D2 连接分子: 删除 D1 一部分, 保留 10 个 C 端氨基酸得到	SEQIDNO:3	GITLGMDELYK
D3 连接分子: IgG4 的 Fc	SEQIDNO:4	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGK
D4 连接分子: HSA 的一部分: HSA 上的一段形成 α 螺旋的残基序列	SEQIDNO:5	ADDKETCFAEEGKKLVAASQAA
D5 连接分子: HSA 的一部分: HSA 上的一段形成 α 螺旋的残基序列, 同时该残基序列中的 Cys 替换为 Gly	SEQIDNO:6	ADDKETGFAEEGKKLVAASQAA
B1: 阻断分子 Pep56	SEQIDNO:7	DKEWILQKIYEIMRLLELGHAEASMRVSDLIYE FMKKGDERLLEEAEERLLEEVER
B2: 阻断分子 Pep160	SEQIDNO:8	STIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNT NITEENVQNMNAGDKWSAFLKEQSTLAQMYP LQEIQNGGGGSGGGGSTGGVTGTQGFWENSML TDPGNVQKAVCHPTAWDLGKGDFRILMCTKVT MDDFLTAHHEMGHIQYDMAYAAQPFLLRN
B3: 阻断分子 Pep130	SEQIDNO:9	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK

[0187]

		AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSLGK
C: 先导肽	SEQIDNO:10	ITETSSPFRSIFSHSGK
E: 酸性结构 (氨基酸尾巴) 10d	SEQIDNO:11	DDDDDDDDDD
E: 酸性结构 (氨基酸尾巴) 10e	SEQIDNO:12	EEEEEEEEEE
E: 酸性结构 (氨基酸尾巴) 5de	SEQIDNO:13	DEDEDEDEDE
E: 酸性结构 (氨基酸尾巴) 8d8e	SEQIDNO:14	DDDDDDDDDEEEEEEEE
F: 标签蛋白	SEQIDNO:15	HHHHHHHH

[0188] 2. 预实验测试假病毒与细胞

[0189] 我们所使用的新冠假病毒表面表达了S蛋白,内部包装了荧光素酶基因。在感染细胞后,可在细胞内表达荧光素酶蛋白,通过加入其底物,检测荧光素酶底物的发光值,可以得到假病毒感染细胞的效率。

[0190] 首先对假病毒的细胞感染进行预实验测试,确定假病毒的稀释度。将假病毒以30倍的梯度,逐级稀释(具体见表4),并分别感染HEK293T或HEK293T-ACE2(过表达ACE2的HEK293T细胞),每种感染做两个平行实验,最后发现病毒感染细胞时,荧光素酶检测的线性窗口在S3-S7范围内(稀释270-21870倍)。假病毒供应商建议的以540倍的稀释度感染细胞,所以后续我们在实验中采用的假病毒稀释度为540倍。

[0191] 通过使用野生型新冠毒株对野生型和过表达ACE2的HEK293T细胞的感染实验发现,在过表达ACE2的细胞中,病毒感染的效率明显高于野生型的细胞株,因此,后续实验中,选用了过表达ACE2的HEK293T作为测试细胞株。

[0192]

浓度 (mg/ml)	eGFP	KmDs001
C1	1.298767	1.169667
C2	0.432922	0.389889
C3	0.144307	0.129963

[0193]	C4	0.048102	0.043321
	C5	0.016034	0.014440
	C6	0.005345	0.004813
	C7	0.001782	0.001604
	C8	0.000594	0.000535
	C9	0.000198	0.000178
	C10	0.000066	0.000059
	C11	0.000022	0.000020
	C12	0.000007	0.000007

[0194] 3.Kd评估

[0195] 表面等离子共振 (SPR) 实验 SPR 研究使用 Biacore T200 生物传感器 (GE

[0196] Healthcare, 美国) 进行。将病毒阻断蛋白通过胺偶联固定在 S 系列传感器芯片 CM5 (GE Healthcare, 美国) 上。His-tagged RBD 的参考菌株和 Omicron 变体 (Sino Biological Inc, 北京, 中国) 被稀释至六种浓度 (0.25、0.5、1、2、4 和 8nM), Delta 变体的 RBD (Sino Biological Inc, 北京, 中国) 稀释至 (0.5, 1, 2, 4, 8 和 16nM)。在 25°C 下进行单循环动力学分析。在 10mM HEPES、pH 7.4、150mM NaCl、3mM EDTA 和 0.05% Tween 下, 结合相设置为 120s 和 30μL/min, 解离相分别设置为 300s 和 30μL/min-20 作为运行缓冲区。重复 9 次分析循环, 分析物浓度按升序排列。使用 Biacore T200 评估软件 (2.0 版, GE Healthcare, 美国) 计算解离常数 (Kd) 值。

[0197] 结果显示, 测试本发明表 2 中提供的结构, 与所有三种病毒株的 RBD 结构域有强烈的相互作用, 即原始、Delta 和 Omicron 变体具有牢固的结合亲和力。对原始、Delta 和 Omicron 变体的解离常数 (Kd) 值分别能达到 1.25nM、0.837nM 和 0.656nM。

[0198] 总而言之, 尽管 Omicron 变体具有更高的健康风险和惊人的免疫逃避, 但本发明的病毒阻断蛋白仍然有资格与这些变体的 RBD 结构域结合。

[0199] 4. 对表 2 提供的不同结构进行的针对假病毒的病毒阻断实验, 实验步骤如下:

[0200] (1) 将待感染 HEK293T-ACE2 细胞接种于 48 孔细胞培养板中。接种量为 1.5×10^4 个细胞每孔; 次日进行假病毒感染实验时, 细胞密度约在 30% 左右。

[0201] (2) 次日, 从 -80°C 取出 SARS-CoV-2 (2019-nCoV) S 蛋白假病毒, 置于冰上融化或 4°C 条件下自然融化。待完全融化后, 用完全培养基 (DMEM, 10% 胎牛血清, 1% 双抗, 0.75μg/mL 嘌呤霉素) 进行 270 倍稀释成假病毒稀释液。

[0202] (3) KMds 阻断剂原始浓度为 1μM, 将其按 10 倍梯度用完全培养基连续稀释。将梯度稀释的 KMds 阻断剂与假病毒稀释液 1:1 体积混合成假病毒感染液, 并将假病毒感染液在室温孵育 1 小时。

[0203] (4) 1 小时后, 从培养箱取出提前铺好 HEK293T-ACE2 细胞的 48 孔板, 确认细胞密度及状态后, 吸去上层培养基。沿孔壁将 200μL 假病毒感染液加入每个孔中, 避免冲起细胞。将 48 孔板放入培养箱中培养 6 小时。

[0204] (5) 6 小时后, 小心吸出假病毒感染液, 并更换 300μL 新鲜的完全培养基。继续在培养箱中培养 48 小时。

[0205] (6) 48 小时后, 吸出培养基, 并在每孔中小心加入 200μL 1×PBS 润洗细胞, 避免冲起细胞。小心吸出 PBS, 并于每孔中加入 65μL 1×细胞裂解液并在室温孵育 15-20 分钟。15-

20分钟后,立即检测荧光素酶的活性,或置于-20℃保存。

[0206] (7)将5μL细胞溶解液与5μL荧光素酶底物(Promega E1501荧光素酶检测系统)混合,将混合液加入384孔板中,立即用Perkin Elmer EnVision 2102多功能酶标仪上检测荧光素酶的活性,并判定KMds阻断剂的抑制效率。

[0207] 实验结果如图1-图23显示:

[0208] 其中,图中的横坐标表示用的病毒阻断蛋白的浓度;图中的纵坐标则表示阻断实验后抑制效果(抑制率),抑制率计算如下:

$$[0209] \quad \text{病毒阻断蛋白的抑制率} = \frac{V0}{V1}$$

[0210] 其中,V0为仅加了病毒的对照的RLU读数;V1为加有病毒阻断蛋白和病毒的样品RLU读数。

[0211] 纵坐标数值越高,表示效果越好。

[0212] Delta表示针对Delta株假病毒进行抑制测试,Original表示针对新冠野生型假病毒进行抑制测试,Omicron针对奥密克戎株假病毒进行抑制测试);

[0213] 图中每组柱形图分别按从左到右的顺序对应图例或标题中显示的结构名称的结果图:例如图4中,图例从左到右分别是Kmds008、Kmds007、Kmds001以及Kmds009-2,则每组柱形图的顺序也分别按这个顺序对应相应结构的结果。

[0214] 结果显示:

[0215] I. 聚合前后效果:

[0216] 如图1-3显示,聚合前(Kmds009)比聚合后(Kmds009-2)效果差;聚合前Kmds042比聚合后(Kmds003)效果差;聚合前Kmds043比聚合后(Kmds012)效果差;

[0217] II. 不同阻断分子的阻断效果,实验表面,本发明的阻断分子与新冠病毒的S蛋白具有特异性结合能力:

[0218] (1)如图4所示,不同阻断分子均能在较低浓度抑制新冠和德塔;

[0219] (2)如图5所示,0052去除聚合分子和连接分子,仍能在较低浓度有抑制效果。

[0220] III. 加酸性结构:

[0221] (1)加酸性结构效果比不加好:如图6,Kmds003、Kmds002和Kmds006分别加了酸性结构的,效果比未加酸性结构的Kmds001好;酸性结构酸性结构;

[0222] (2)加8d8e、10e效果好:如图6显示,Kmds006比Kmds003和Kmds002对病毒的阻断效果好;如图7显示,Kmds012和Kmds014比Kmds011和Kmds013效果好;

[0223] IV. 连接分子:

[0224] (1)如图8用不同的连接分子,效果接近:KMds104,KMds105,KMds121,KMds 112;

[0225] (2)对eGFP进行部分改造,与未改造前对比:KMds003,KMds012,KMds104

[0226] 改造后分别得到KMds045,KMds046,KMds109,结果分别如图9-11所示,改造前后效果接近;

[0227] (3)对连接分子进行删除,删除后,依然能对病毒起到抑制作用,结果如图12-14:KMds003,KMds012,KMds104的Tram被删除后,分别得到KMds036,KMds038,KMds108。

[0228] V. 先导肽:

[0229] 将KMds003,KMds006,KMds012,KMds014,KMds044基础上删去leading peptide序

列,分别得到KMds030,KMds031,KMds032,KMds033,KMds104,结果分别如图15-22所示,根据结果,先导肽对病毒阻断蛋白对病毒的抑制性没有影响;

[0230] VI. 交联作用:

[0231] 对病毒阻断实验中的具有聚合分子的结构处理病毒前后做了电镜观察,如图23中,图23中A是未经病毒阻断蛋白处理的,其他是经病毒阻断蛋白处理后不同放大倍数的图,从图中可见,电镜下,经具有聚合分子处理病毒后,图片中显示出现大的斑块,也就是,我们的结构能实现对病毒的交联集聚,从而能提高对病毒的交联阻断抑制作用。

[0232] VII. 假病毒 IC_{50} 结果:

[0233] 测试结果显示,在所有测试中,针对同样的阻断分子:

[0234] 具有酸性结构、聚合分子以及连接分子的, IC_{50} 值最低的能达到为42.4pM,达到皮摩尔的级别;不存在酸性结构, IC_{50} 值能达到为0.222nM左右;

[0235] 没有连接分子、没有聚合分子、连接分子和聚合分子都没有的,对假病毒的抑制作用相比来说,有降低,其中 IC_{50} 值分别能达到1.054、2.404和1.032nM。

[0236] 5. 活病毒测试

[0237] 我们研究了表2中的病毒阻断蛋白对不同SARS-CoV-2毒株的抑制能力,包括原始毒株、Alpha、Beta、Delta和Omicron变体。结果显示:

[0238] 原始菌株被病毒阻断蛋白强烈抑制(IC_{50} 为108.6pM);

[0239] 并且另一方面,病毒阻断蛋白可以在极低浓度(IC_{50} 分别为92.8、121.9、61.0和121.9pM)下显示出对Alpha、Beta、Delta和Omicron变体的有效抑制能力;

[0240] 与中和原始SARS-CoV-2的能力相比,病毒阻断蛋白抑制Delta变体的能力增加了约1.8倍,抑制其他菌株的能力几乎相同。

[0241] 对活病毒的测试表明,尽管刺突蛋白存在大量突变,但本发明的病毒阻断蛋白在不同的SARS-CoV-2变体中仍保持皮摩尔水平的强大抑制能力。

[0242] 6. 动物实验

[0243] SARS-CoV-2野生型(WT)毒株(IVCAS 6.7512)由中国科学院武汉病毒研究所国家病毒资源中心提供。杂合B6/JGpt-H11em1Cin(K18-ACE2)/Gpt小鼠(K18-hACE2 KI小鼠)购自南京GemPharmatech。

[0244] 在特定的无病原体(SPF)环境中,在单独通风的笼子(IVC)中饲养和繁殖小鼠。动物实验由武汉大学动物实验中心的认证人员执行,经机构动物护理和使用委员会(AUP#WP2021-0602)批准。动物生物安全三级实验室设施下传染性SARS-CoV-2病毒的方案和程序已获得机构生物安全委员会(IBC,协议#S01322010A)的批准。

[0245] 所有样品的灭活均按照IBC批准的标准程序进行,用于将样品从高密封中取出。每只小鼠都感染了 2.5×10^2 PFU SARS-CoV-2。对于阴性对照组,将SARS-CoV-2与对照缓冲液预混合30分钟。

[0246] 对于0.25nM病毒阻断蛋白预混治疗组,将SARS-CoV-2与0.25nM病毒阻断蛋白预混30分钟;

[0247] 对于25nM病毒阻断蛋白预混治疗组,将SARS-CoV-2与25nM病毒阻断蛋白预混30分钟;

[0248] 然后用预混物通过鼻内途径接种K18-hACE2小鼠。

[0249] 将组织称重并在Tissue Cell-destroyer 1000仪器(NZK LTD)中在1000 μ L PBS中匀浆。通过在5,000rpm下离心40秒来澄清组织匀浆,将100 μ L上清液与400 μ L Trizol LS混合以提取病毒RNA。

[0250] 使用pCMV-N质粒和SARS-CoV-2N基因引物(F引物:ATGCTGCAATCGTGCTACAA;R引物:GACTGCCGCCTCTGCTC)构建SARS-CoV-2N基因标准曲线,计算病毒拷贝数。使用Prism版本7(GraphPad软件)通过学生测试分析数据。P值<0.05被认为具有统计学意义。

[0251] 为了测试病毒阻断蛋白在小鼠模型中的作用,我们用SARS-CoV-2和病毒阻断的预混物感染了K18-hACE2小鼠。在感染后第2天和第5天(dpi)处死小鼠。在5天的时间过程中,每天326监测小鼠的体重变化和死亡率。

[0252] 鼻内接种SARS-CoV-2的K18-hACE2小鼠在感染后3至4天开始体重减轻,并在4dpi时死亡;

[0253] 与对照小鼠相比,接种病毒阻断蛋白和SARS-CoV-2预混物的小鼠显着减轻体重减轻并显着提高存活率,尤其是使用高剂量病毒阻断蛋白时。

[0254] 在感染SARS-CoV-2的K18-hACE2的肺组织中检测到高水平的SARS-CoV-2RNA,而在感染SARS-CoV-2和低剂量病毒阻断蛋白混物病毒RNA的小鼠中病毒RNA水平较低,在感染高剂量病毒阻断蛋白和SARS-CoV-2预混物的小鼠的肺组织中甚至检测不到水平。总之,这些数据表明高剂量病毒阻断蛋白可以显着减轻体重减轻,提高小鼠存活率,并抑制小鼠的病毒拷贝数。

[0255] 7. 毒性实验

[0256] 毒理学试验按《消毒技术标准》进行(2002年版)第二部分《消毒产品检验技术标准》2.3.1急性经口毒性试验。异常毒性试验按《中华人民共和国药典2020年版(第四部分)》《通则》《生物制品原则、检验方法》,异常毒性试验。

[0257] ICR小鼠由南京医科大学动物中心提供。

[0258] Sprague Dawley(SD)大鼠购自邳州东方繁育有限公司。

[0259] 新西兰大白兔由益正安里茂生物科技有限公司提供。动物饲养于20 $^{\circ}$ C-26 $^{\circ}$ C,局部屏障系统内相对湿度为40%-70%。

[0260] 针对表2中涉及的结构,进行以下毒性实验:

[0261] (1)急性经口毒性

[0262] 20只SPF ICR小鼠(18.0~22.0g)和20只SPF SD大鼠(180~220g)用于急性经口毒性试验。雄性和雌性的数量是相等的。对过夜禁食的小鼠和大鼠施用表3中的结构式对应制备的病毒阻断蛋白,剂量5000mg/kg·bw,使用胃插管以单次。接下来每周监测动物的毒性和死亡率的临床症状14天(第0天、第7天和第14天)。行为、死亡人数和体重分别为评估,并在观察期结束时对它们进行解剖。

[0263] 根据试验结果,给予5000mg/kg·bw剂量的病毒阻断蛋白不会导致过夜禁食的小鼠和大鼠发病,并且体重正常。病毒阻断蛋白对小鼠和大鼠的LD50值均在5000mg/kg·bw以上。观察期间未发现中毒和死亡迹象。

[0264] (2)急性吸入毒性试验

[0265] 20只SPF ICR小鼠(18.0~22.0g)用于急性吸入毒性试验。雄性和雌性的数量是相等的。将2.2g表3中对应制备的病毒阻断蛋白置于220L毒物暴露柜,浓度假定为10,000mg/

m³。这吸入的暴露时间设定为2小时。老鼠的症状和死亡是在14天观察期间(0天、7天和14天)记录。

[0266] 根据试验记过,在雌性和雄性小鼠中,在2h暴露下的病毒阻断蛋白LC₅₀值均高于10,000mg/m³。小鼠没有表现出异常迹象,现体重稳定增加是正常的。因此,在目前的实验条件下,病毒阻断蛋白符合法规,被认为是无毒的。

[0267] (3)急性眼刺激试验

[0268] 三只雄性新西兰兔(2.5~3.5kg)用于急性眼刺激试验。将0.1mL表3中对应制备的病毒阻断蛋白原液滴入兔右眼结膜囊,左眼滴入生理盐水作为对照。闭眼4s,30s后用生理盐水冲洗。观察家兔结膜、虹膜和角膜的损伤和恢复情况,为期21天(1小时、24小时、48小时、72小时、7天、14天和28天)。对角膜损伤、虹膜损伤、结膜充血和结膜水肿的严重程度进行评分。

[0269] 根据试验结果,测试的病毒阻断蛋白在兔子身上没有表现出眼刺激的迹象。三只兔子在24h、48h和72h的评分均小于1,如表1所示。因此,本发明病毒阻断蛋白的刺激性归类为无刺激性。

[0270] (4)小鼠骨髓多染红细胞(PCE)微核试验

[0271] 将50只ICR小鼠用于小鼠骨髓多染红细胞微核试验。男性的数量等于女性的数量。将动物分成五组,每组五只雌性小鼠和五只雄性小鼠。试验组分别以5000、2500和1250mg/kg·bw的剂量分别给予一次表3中对应制备的病毒阻断蛋白。一组作为阴性对照并用溶剂纯化水处理。另一组作为阳性对照,腹腔注射40mg/kg·bw的环磷酰胺(CP)。测试组在0小时和24小时通过口服给药暴露于病毒阻断蛋白。第二次暴露于病毒阻断蛋白后6小时处死小鼠,制备骨髓涂片。计算每只动物1000个多染红细胞(PCE)中微核的出现。一旦计数了200个PCE,就确定了PCE与正色素红细胞(NCE)的比率。通过U检验进行统计分析。当与阴性对照相比,实验组微核形成的发生率显著增加时,判断试验剂对体内染色体有害,这应以剂量-反应相关性发生。

[0272] 对于微核试验,雌性和雄性小鼠的微核形成率在三个实验组中与阴性组相比无显著差异($P < 0.05$),与阳性对照组相比差异显著($P < 0.05$),如如表2所示。此外,任何实验组与阴性对照之间的PCE/NCE比率差异均在20%以内。

[0273] (5)异常毒性实验

[0274] 10只雌性SPF ICR小鼠(18.0~22.0g)和4只标准级雌性豚鼠(250~350g)进行异常毒性试验。

[0275] 10只小鼠随机分为试验组和对照组,每组5只。试验组腹腔注射0.5mL样品,对照组腹腔注射0.5mL氯化钠。观察两组体质情况7d。将4只雌性豚鼠随机分为试验组和对照组,每组2只豚鼠。试验组腹腔注射0.5mL样品,对照组腹腔注射0.5mL氯化钠。观察两组体质情况7d。

[0276] 在所有测试中,本发明提供的病毒阻断蛋白均没有引起可观察到的毒性作用。

[0277] 8. 测试病毒蛋白的热稳定性

[0278] 使用Unchained公司的Uncle设备,测试了几种蛋白的热稳定性。Tmagg表征蛋白在加热过程中发生高聚的温度,结果见表5。

Sample	Average T _{magg} 266 (°C)
0.5 mg/ml KM001	48.4
0.5 mg/ml KM003	53.2
0.5 mg/ml KM007	82.6
0.5 mg/ml KM011	83.5
0.5 mg/ml KM012	84.3
0.5 mg/ml KM013	84.2
0.5 mg/ml KM006	88.9
0.5 mg/ml KM008	86.3
0.5 mg/ml KM010	45.0
0.5 mg/ml KM009	42.2

[0279] [0280] 同时含有B1+B2的Kmds001 T_{magg}值低于50度,但上加8D8E(Kmds006)酸性结构后, T_{magg}值比不加尾(Kmds001)高很多,增加了近1倍。也就是说这个酸性结构能够增加蛋白的稳定性。

[0281] 另外,经测试,表2中各个结构的病毒阻断蛋白的平均T_m接近80°C,表明本发明提供的病毒阻断蛋白可免受极端温度的影响。

[0282] 9. 加速稳定性试验

[0283] 稳定性研究在两个不同的温度下同时进行,4°C和37°C(三个重复,100uL的10nM病毒阻断蛋白)。

[0284] 另一组没有加病毒阻断蛋白作为阴性对照(NC)。在90天内(0天、15天、30天、45天、60天、75天和90天),每15天对它们进行3次取样。通过假病毒中和试验评估抑制百分比,并通过以下公式计算:抑制百分比=(NC-样品)/NC(RFU)。

[0285] 试验结果显示:在4°C或37°C下储存超过90天后,病毒阻断蛋白的抑制效率几乎没有受损(>99.9%),表明本发明的病毒阻断蛋白是一种超稳定的SARS-CoV-2阻断剂。

[0286] 以下实施例为膜剂实施例,其中涉及到的病毒阻断蛋白,为实施例1中的方法制备参照涉及到的各个结构制备得到的病毒阻断蛋白,其中,各个配方中采用的病毒阻断蛋白的原液浓度为2mg/ml左右。

[0287] 以下实施例中的吸湿实验方法如下:

[0288] 设备:加湿器,型号:KW-AD01;功率5W,容量100ml。

[0289] 加湿器中加满水,将制备得到的膜剂置于加湿器的雾化喷孔上方5-10cm,观察膜剂吸湿变化情况,实验温度为室温。

[0290] 10. 测试表3提供的一个结构的IVTT反应液经过硫酸铵沉淀处理后,与假病毒的结合能力。

[0291] IVTT反应后的溶液经硫酸铵沉淀处理:4000rpm 4度离心10min。上清液加入5%(w/v)的硫酸铵粉末,充分搅拌溶解,4000rpm 4度离心10min。上清液中继续加入25%(w/v)的硫酸铵粉末,缓慢加入,边加入边搅拌使其溶解。12000rpm 4度离心10min。弃上清,沉淀用30%(w/v)的硫酸铵溶液漂洗1次。12000rpm 4度离心10min。沉淀用PBS重悬,充分溶解。12000rpm,4度离心10min,用0.22μm的针筒滤器过滤后,4度保存待用。

[0292] Kmds012的IVTT反应液经硫酸铵沉淀后的样品活性略低于Kmd012纯蛋白(磁珠纯

化蛋白)。

[0293] 可见,我们再对本发明提供的聚合结构进行纯化,可以采用简单方便的硫酸铵沉淀法进行。

序列表

[0294] <110> 康码(上海)生物科技有限公司

<120> 聚合分子、包括其的单一结构和多聚结构

<130> 2022

<160> 19

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 140

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

Ser Asp Val Gln Ser Ser Leu Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Glu Leu Asn
1 5 10 15

Ser Lys Met Glu Leu Thr Ala Asn Lys Asp Gly Thr Leu Thr Gly Lys
 20 25 30

Tyr Leu Ser Lys Val Gly Asp Val Tyr Val Pro Tyr Pro Leu Ser Gly
 35 40 45

[0295]

Arg Tyr Asn Leu Gln Pro Pro Ala Gly Gln Gly Val Ala Leu Gly Trp
 50 55 60

Ala Val Ser Trp Glu Asn Ser Lys Ile His Ser Ala Thr Thr Trp Ser
65 70 75 80

Gly Gln Phe Phe Ser Glu Ser Ser Pro Val Ile Leu Thr Gln Trp Leu
 85 90 95

Leu Ser Ser Ser Thr Ala Arg Gly Asp Val Trp Glu Ser Thr Leu Val
 100 105 110

Gly Asn Asp Ser Phe Thr Lys Thr Ala Pro Thr Glu Gln Gln Ile Ala
 115 120 125

His Ala Gln Leu His Cys Arg Ala Pro Arg Leu Lys

130

135

140

<210> 2

<211> 238

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

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

Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Arg Gly Glu
 20 25 30

Gly Glu Gly Asp Ala Thr Asn Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
 35 40 45

[0296]

Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu
 50 55 60

Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln
 65 70 75 80

His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
 85 90 95

Thr Ile Ser Phe Lys Asp Asp Gly Thr Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
 100 105 110

Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile
 115 120 125

Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn
 130 135 140

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
1 5 10 15

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
20 25 30

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
35 40 45

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
50 55 60

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
65 70 75 80

[0298] Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
85 90 95

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
100 105 110

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
115 120 125

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
130 135 140

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
145 150 155 160

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
165 170 175

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 180 185 190

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 195 200 205

Gly Lys
 210

<210> 5
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 5

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 1 5 10 15

[0299]

Ala Ala Ser Gln Ala Ala
 20

<210> 6
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 6

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Gly Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 1 5 10 15

Ala Ala Ser Gln Ala Ala
 20

<210> 7
 <211> 56

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 7

Asp Lys Glu Trp Ile Leu Gln Lys Ile Tyr Glu Ile Met Arg Leu Leu
1 5 10 15

Asp Glu Leu Gly His Ala Glu Ala Ser Met Arg Val Ser Asp Leu Ile
 20 25 30

Tyr Glu Phe Met Lys Lys Gly Asp Glu Arg Leu Leu Glu Glu Ala Glu
 35 40 45

Arg Leu Leu Glu Glu Val Glu Arg
 50 55

[0300]

<210> 8

<211> 160

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 8

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

Glu Ala Glu Asp Leu Phe Tyr Gln Ser Ser Leu Ala Ser Trp Asn Tyr
 20 25 30

Asn Thr Asn Ile Thr Glu Glu Asn Val Gln Asn Met Asn Asn Ala Gly
 35 40 45

Asp Lys Trp Ser Ala Phe Leu Lys Glu Gln Ser Thr Leu Ala Gln Met
 50 55 60

50 55 60

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
65 70 75 80

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
85 90 95

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
100 105 110

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
115 120 125

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
130 135 140

[0302]

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
145 150 155 160

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
165 170 175

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
180 185 190

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
195 200 205

Gly Lys
210

<210> 10

<211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 10

Ile Thr Glu Thr Ser Ser Pro Phe Arg Ser Ile Phe Ser His Ser Gly
 1 5 10 15

Lys

<210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 11

[0303]

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp
 1 5 10

<210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 12

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
 1 5 10

<210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 13

Asp Glu Asp Glu Asp Glu Asp Glu Asp Glu

1 5 10

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 14

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
1 5 10 15

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 15

[0304]

His His His His His His His His
1 5

<210> 16

<211> 170

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 16

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

Glu Ala Glu Asp Leu Phe Tyr Gln Ser Ser Leu Ala Ser Trp Asn Tyr
20 25 30

Asn Thr Asn Ile Thr Glu Glu Asn Val Gln Asn Met Asn Asn Ala Gly
35 40 45

Asp Lys Trp Ser Ala Phe Leu Lys Glu Gln Ser Thr Leu Ala Gln Met
 50 55 60

Tyr Pro Leu Gln Glu Ile Gln Asn Leu Thr Val Lys Leu Gly Gly Gly
 65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Ser Gly Gly Val Thr Gly Gly Leu
 85 90 95

Pro Asn Met Thr Gln Gly Phe Trp Glu Asn Ser Met Leu Thr Asp Pro
 100 105 110

Gly Asn Val Gln Lys Ala Val Cys His Pro Thr Ala Trp Asp Leu Gly
 115 120 125

Lys Gly Asp Phe Arg Ile Leu Met Cys Thr Lys Val Thr Met Asp Asp
 130 135 140

[0305]

Phe Leu Thr Ala His His Glu Met Gly His Ile Gln Tyr Asp Met Ala
 145 150 155 160

Tyr Ala Ala Gln Pro Phe Leu Leu Arg Asn
 165 170

<210> 17

<211> 180

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 17

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

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

20

25

30

Asn Thr Asn Ile Thr Glu Glu Asn Val Gln Asn Met Asn Asn Ala Gly
 35 40 45

Asp Lys Trp Ser Ala Phe Leu Lys Glu Gln Ser Thr Leu Ala Gln Met
 50 55 60

Tyr Pro Leu Gln Glu Ile Gln Asn Leu Thr Val Lys Leu Gln Leu Gln
 65 70 75 80

Ala Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Ser Gly Gly
 85 90 95

Val Thr Gly Phe Phe Val Ser Val Gly Leu Pro Asn Met Thr Gln Gly
 100 105 110

[0306]

Phe Trp Glu Asn Ser Met Leu Thr Asp Pro Gly Asn Val Gln Lys Ala
 115 120 125

Val Cys His Pro Thr Ala Trp Asp Leu Gly Lys Gly Asp Phe Arg Ile
 130 135 140

Leu Met Cys Thr Lys Val Thr Met Asp Asp Phe Leu Thr Ala His His
 145 150 155 160

Glu Met Gly His Ile Gln Tyr Asp Met Ala Tyr Ala Ala Gln Pro Phe
 165 170 175

Leu Leu Arg Asn
 180

<210> 18

<211> 190

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 18

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

Glu Ala Glu Asp Leu Phe Tyr Gln Ser Ser Leu Ala Ser Trp Asn Tyr
 20 25 30

Asn Thr Asn Ile Thr Glu Glu Asn Val Gln Asn Met Asn Asn Ala Gly
 35 40 45

Asp Lys Trp Ser Ala Phe Leu Lys Glu Gln Ser Thr Leu Ala Gln Met
 50 55 60

[0307]

Tyr Pro Leu Gln Glu Ile Gln Asn Leu Thr Val Lys Leu Gln Leu Gln
65 70 75 80

Ala Leu Gln Gln Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Ser
 85 90 95

Gly Gly Val Thr Gly Arg Ile Phe Lys Glu Ala Glu Lys Phe Phe Val
 100 105 110

Ser Val Gly Leu Pro Asn Met Thr Gln Gly Phe Trp Glu Asn Ser Met
 115 120 125

Leu Thr Asp Pro Gly Asn Val Gln Lys Ala Val Cys His Pro Thr Ala
 130 135 140

Trp Asp Leu Gly Lys Gly Asp Phe Arg Ile Leu Met Cys Thr Lys Val
145 150 155 160

Thr Met Asp Asp Phe Leu Thr Ala His His Glu Met Gly His Ile Gln
 165 170 175

Tyr Asp Met Ala Tyr Ala Ala Gln Pro Phe Leu Leu Arg Asn
 180 185 190

<210> 19

<211> 200

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 19

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

[0308] Glu Ala Glu Asp Leu Phe Tyr Gln Ser Ser Leu Ala Ser Trp Asn Tyr
 20 25 30

Asn Thr Asn Ile Thr Glu Glu Asn Val Gln Asn Met Asn Asn Ala Gly
 35 40 45

Asp Lys Trp Ser Ala Phe Leu Lys Glu Gln Ser Thr Leu Ala Gln Met
 50 55 60

Tyr Pro Leu Gln Glu Ile Gln Asn Leu Thr Val Lys Leu Gln Leu Gln
 65 70 75 80

Ala Leu Gln Gln Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Ser
 85 90 95

Gly Gly Val Thr Gly Gly His Ala Gly Gly Thr Val Asp Ala Gln Arg
 100 105 110

Ile Phe Lys Glu Ala Glu Lys Phe Phe Val Ser Val Gly Leu Pro Asn
115 120 125

Met Thr Gln Gly Phe Trp Glu Asn Ser Met Leu Thr Asp Pro Gly Asn
130 135 140

Val Gln Lys Ala Val Cys His Pro Thr Ala Trp Asp Leu Gly Lys Gly
145 150 155 160

[0309]

Asp Phe Arg Ile Leu Met Cys Thr Lys Val Thr Met Asp Asp Phe Leu
165 170 175

Thr Ala His His Glu Met Gly His Ile Gln Tyr Asp Met Ala Tyr Ala
180 185 190

Ala Gln Pro Phe Leu Leu Arg Asn
195 200

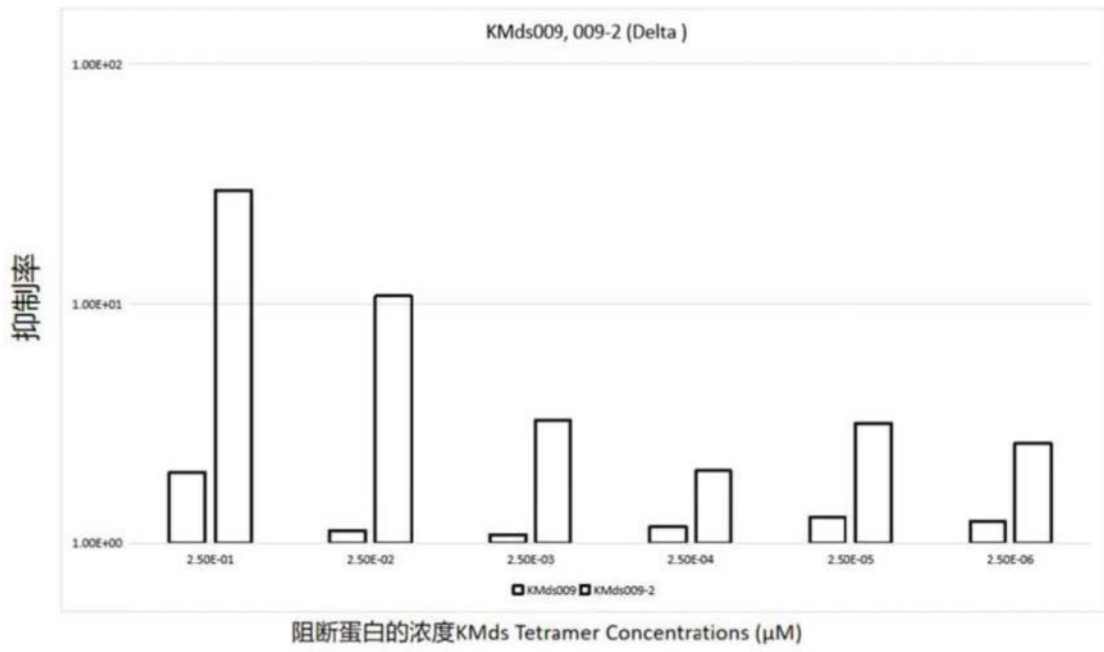


图1

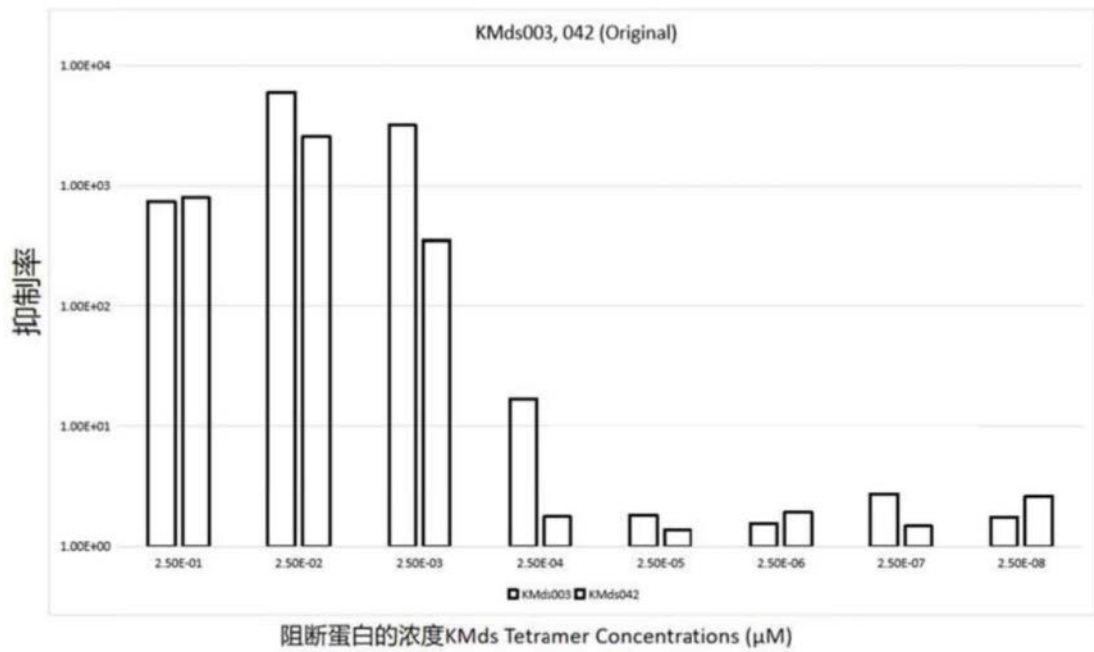


图2

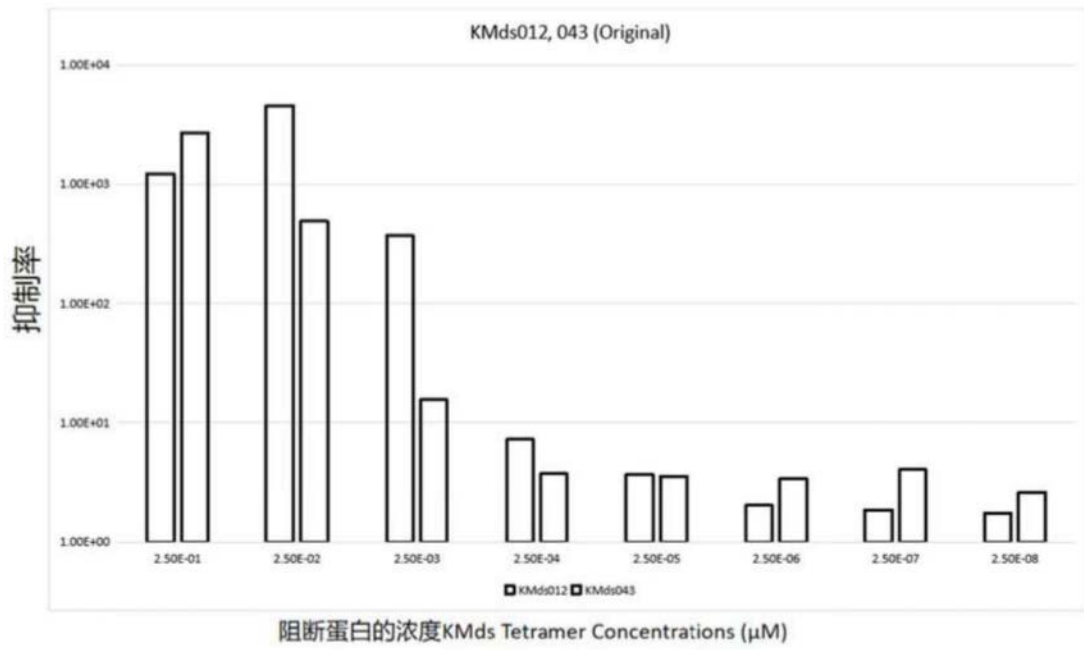


图3

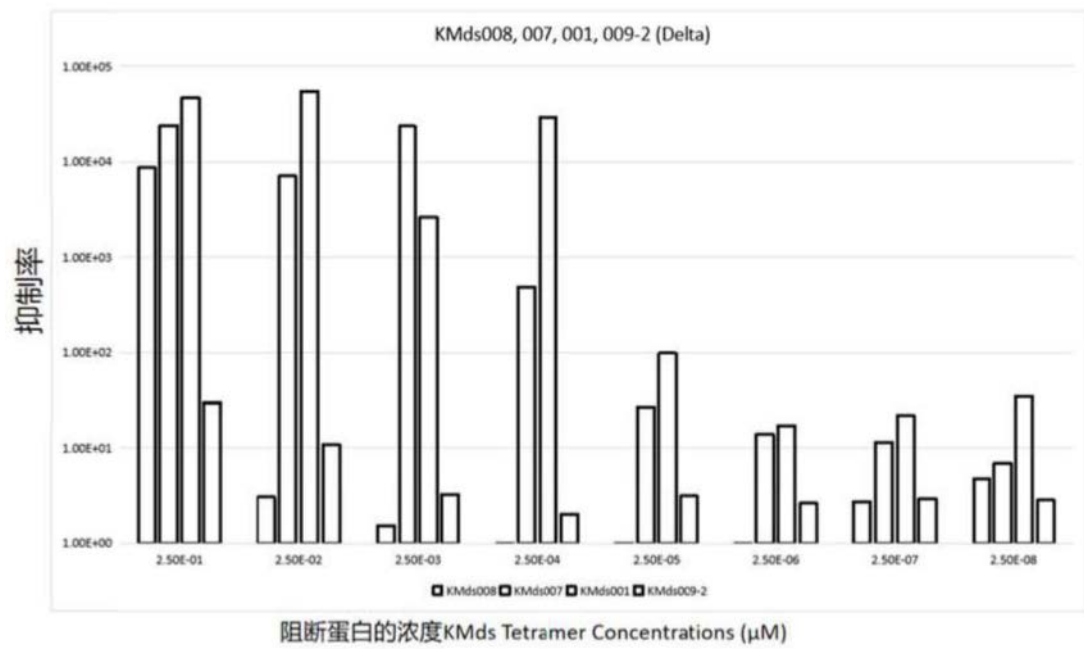


图4

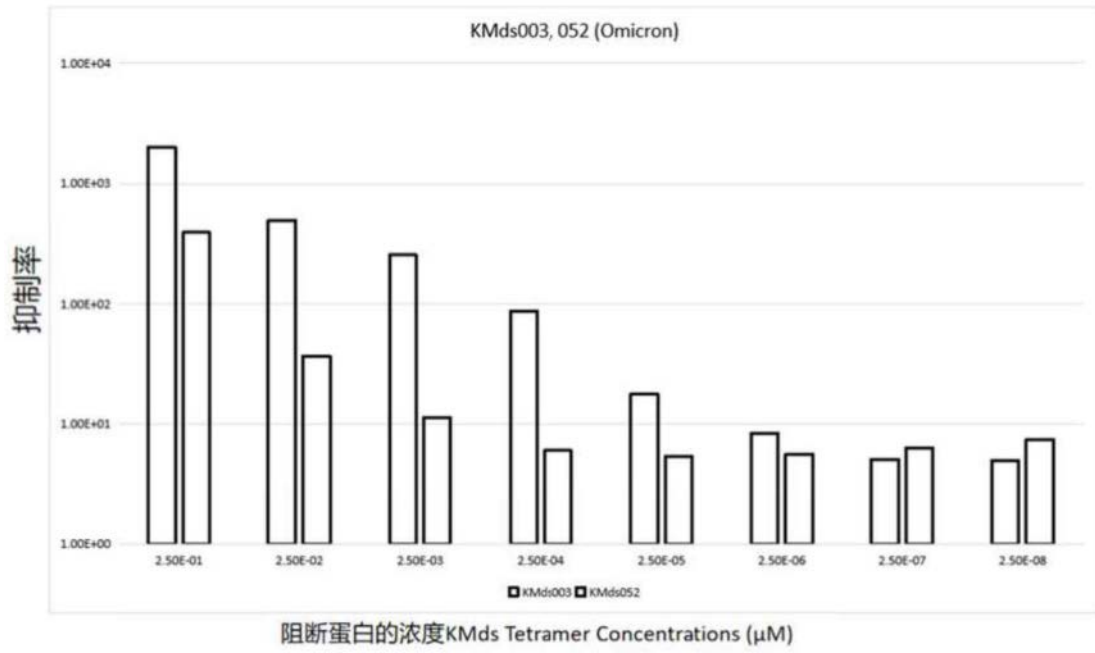


图5

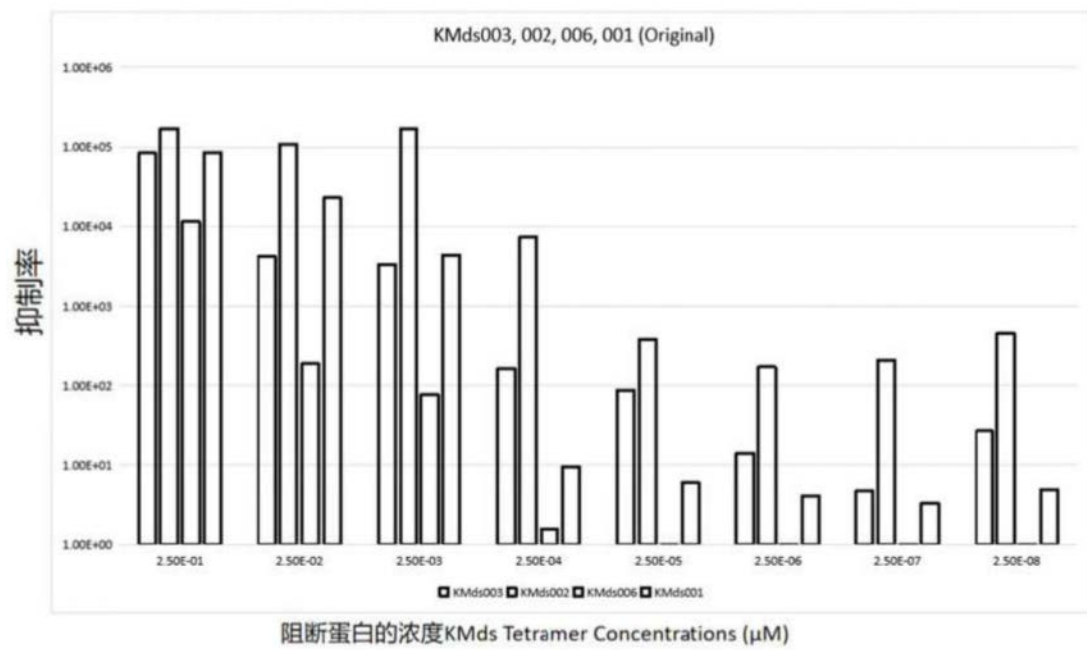


图6

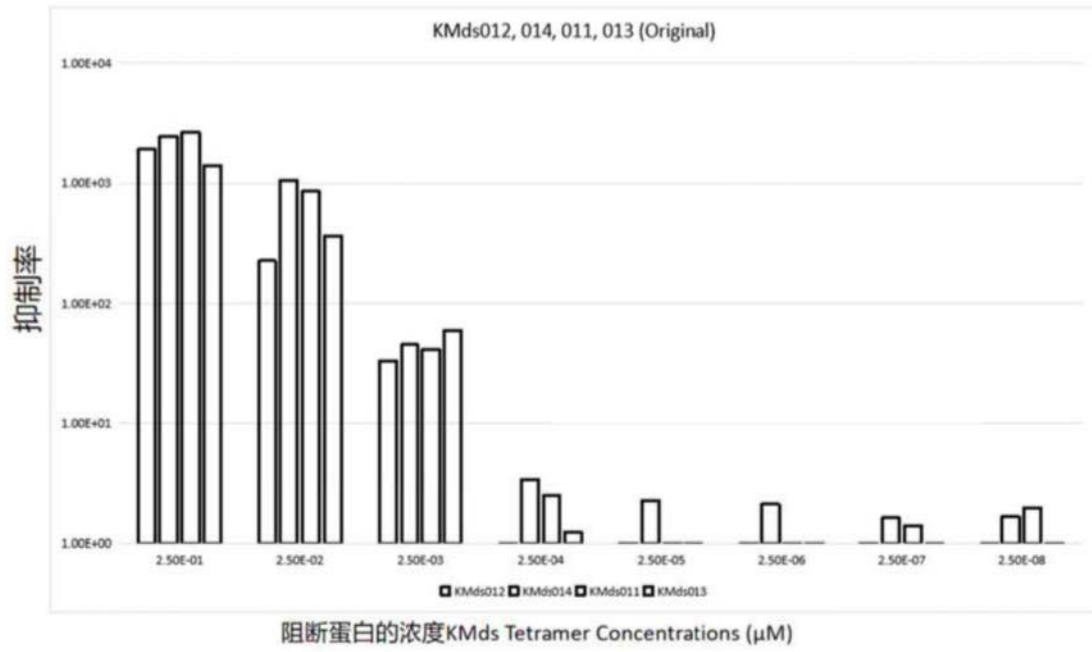


图7

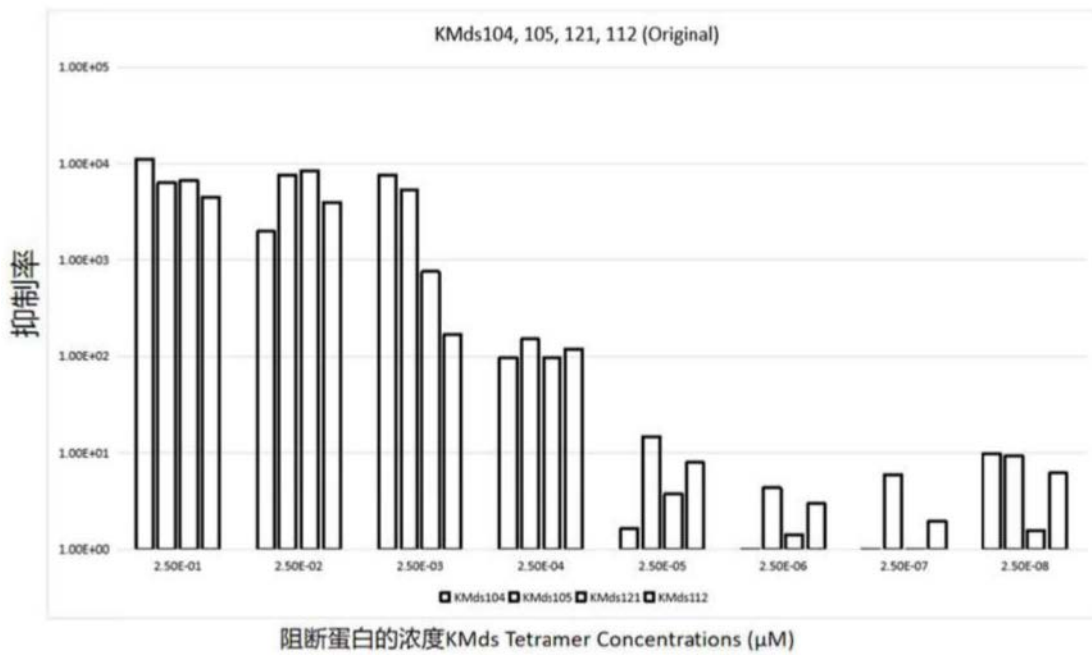


图8

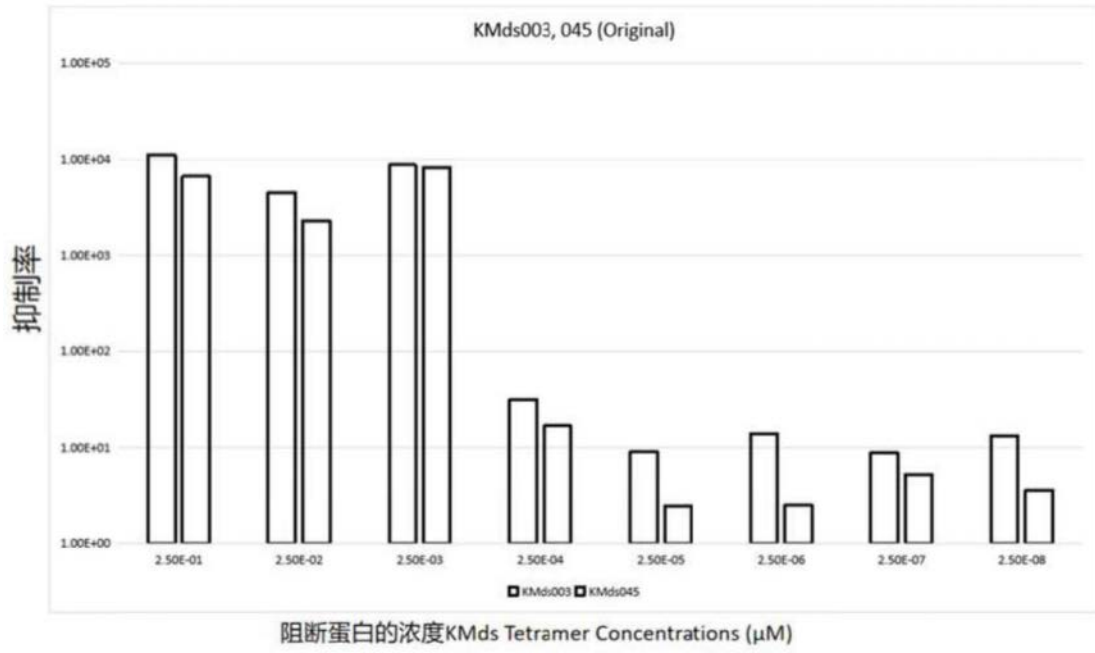


图9

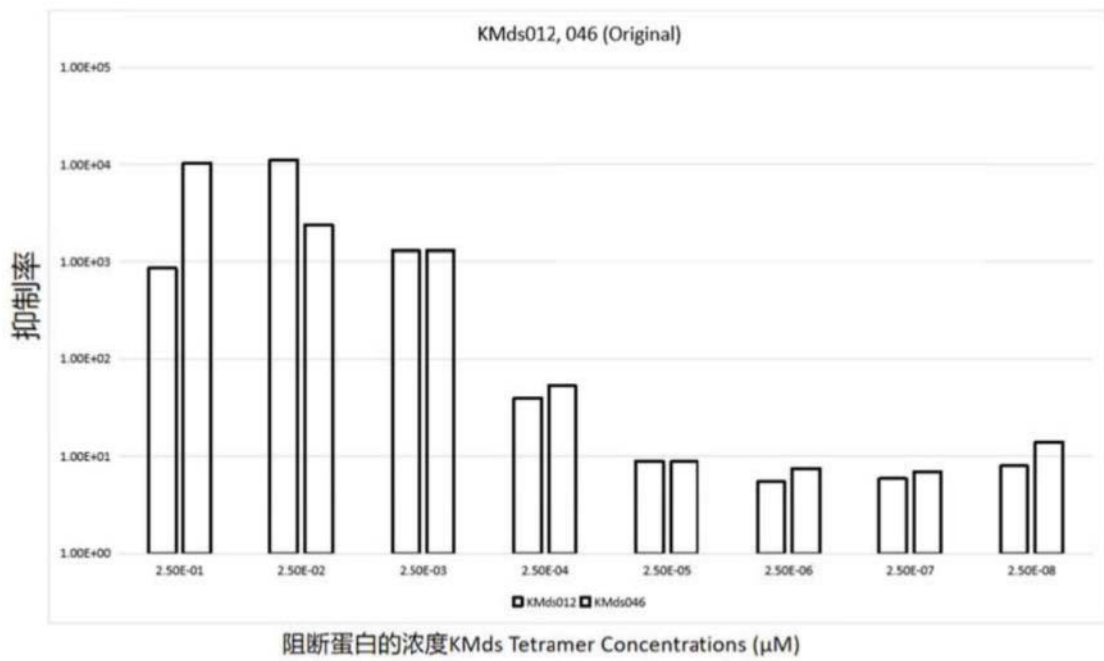


图10

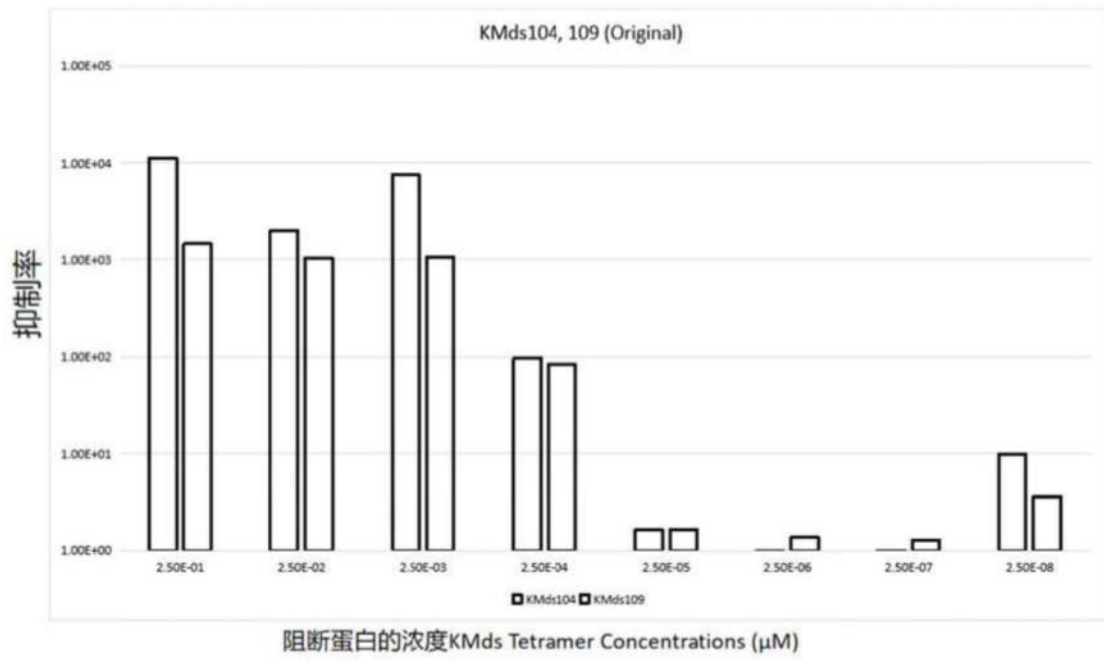


图11

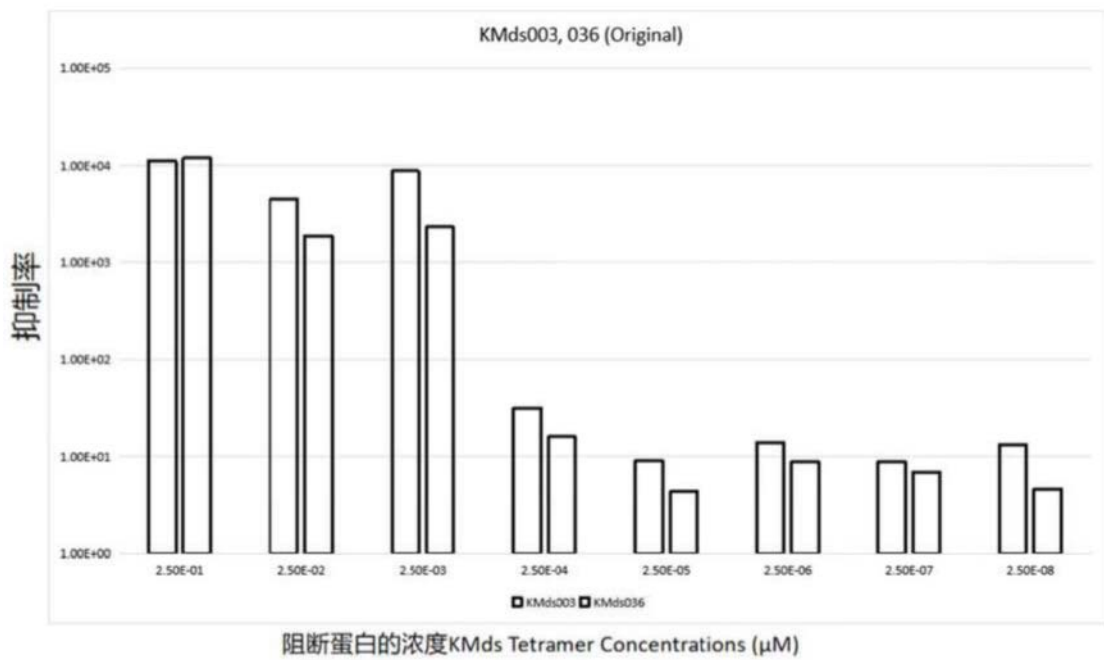


图12

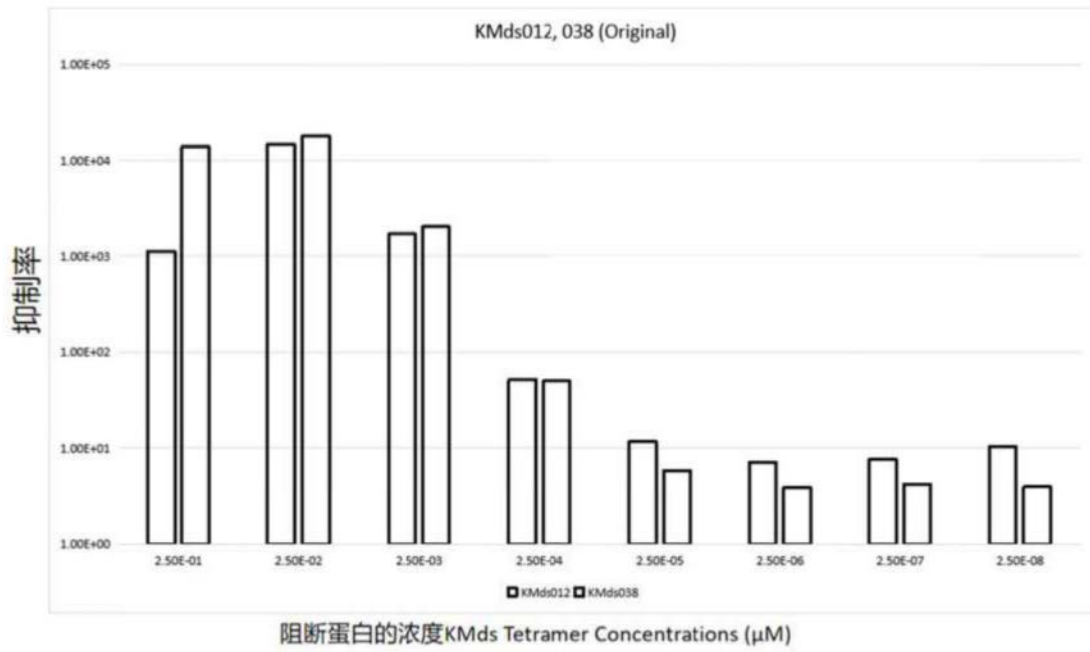


图13

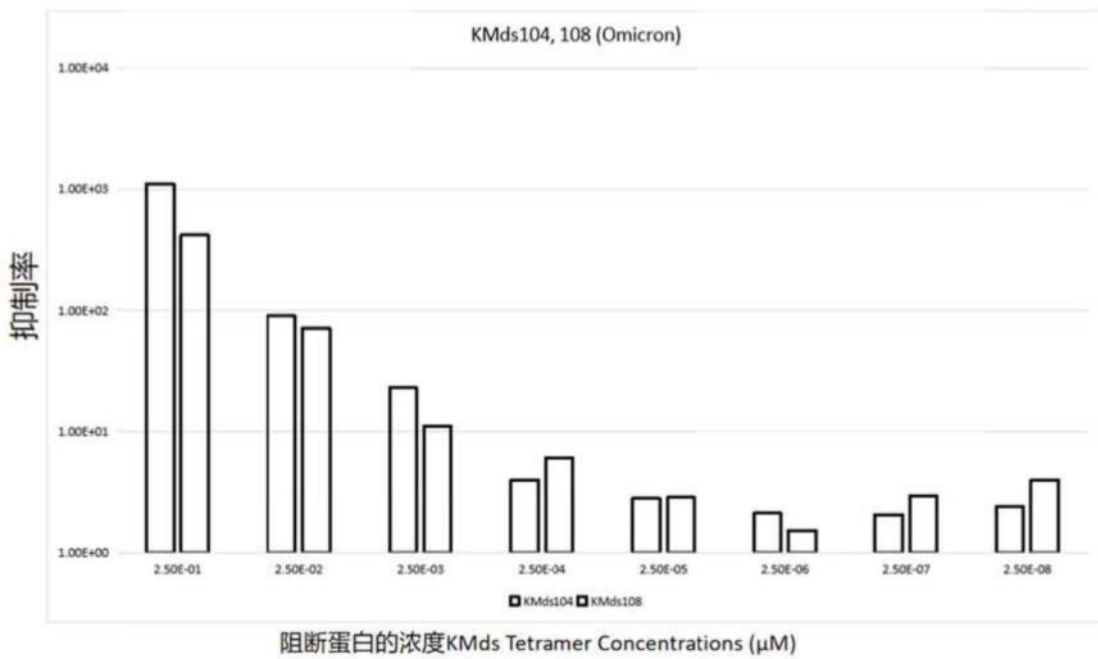


图14

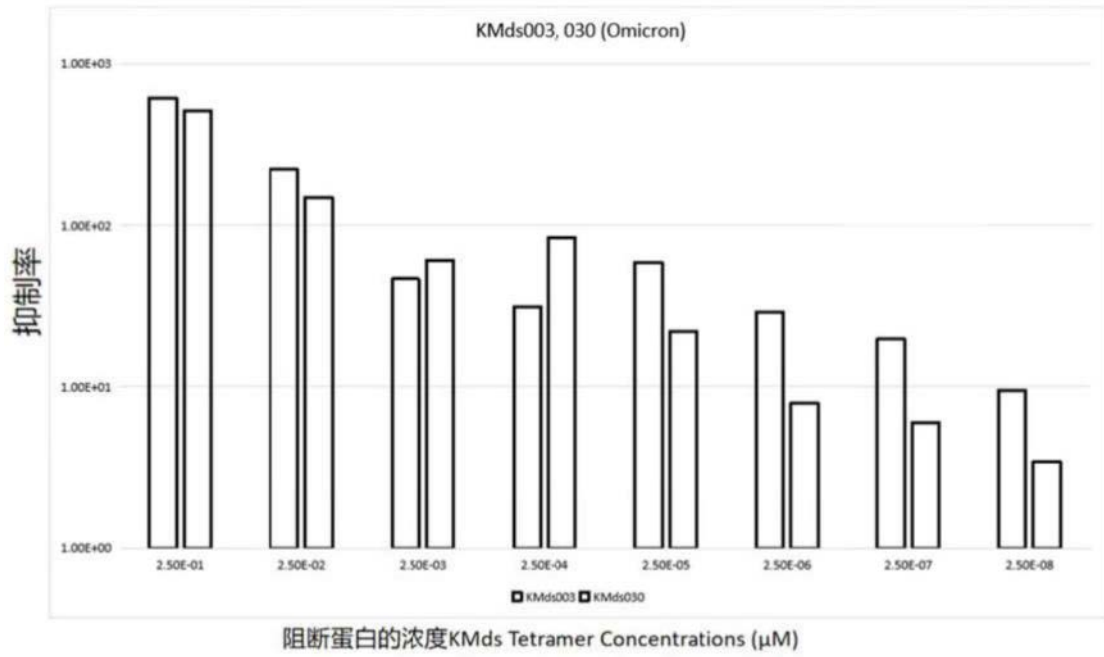


图15

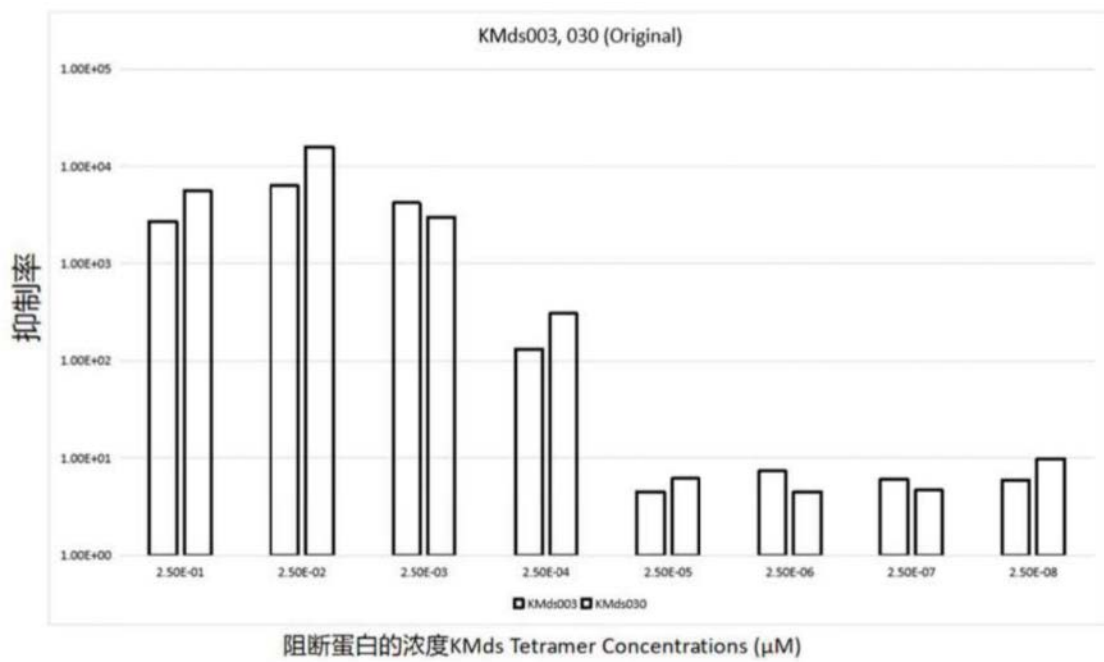


图16

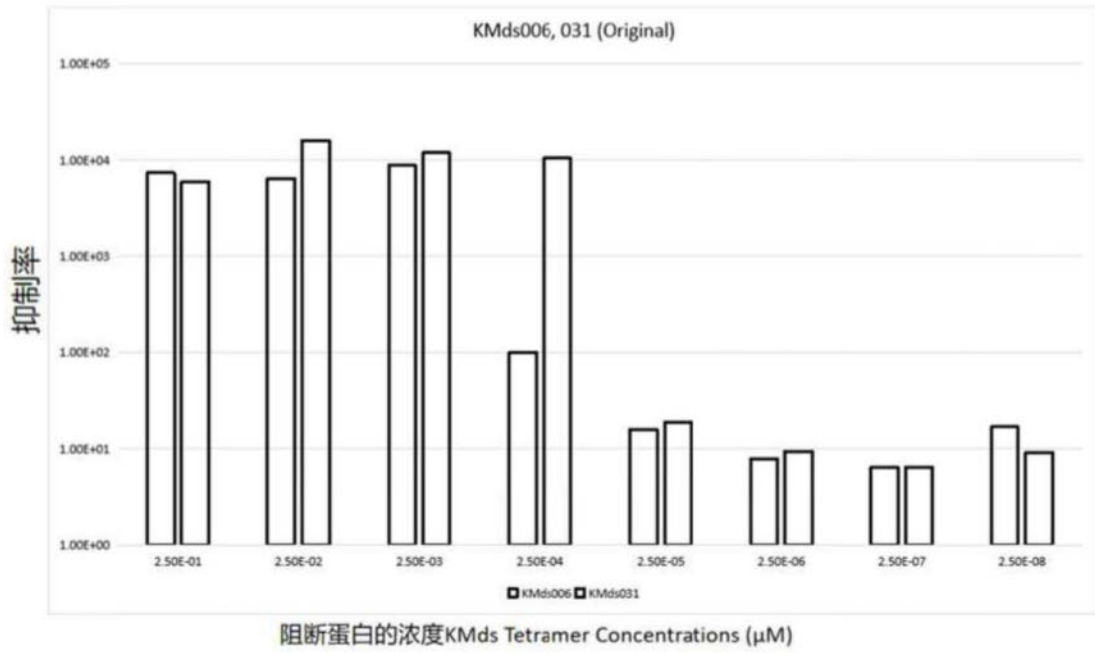


图17

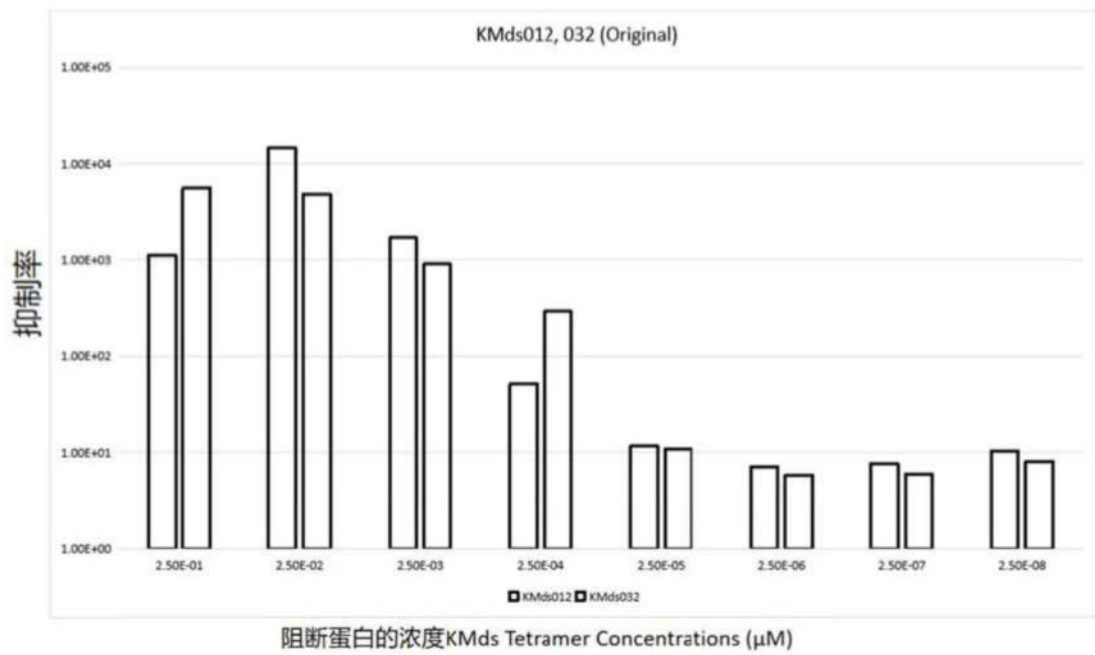


图18

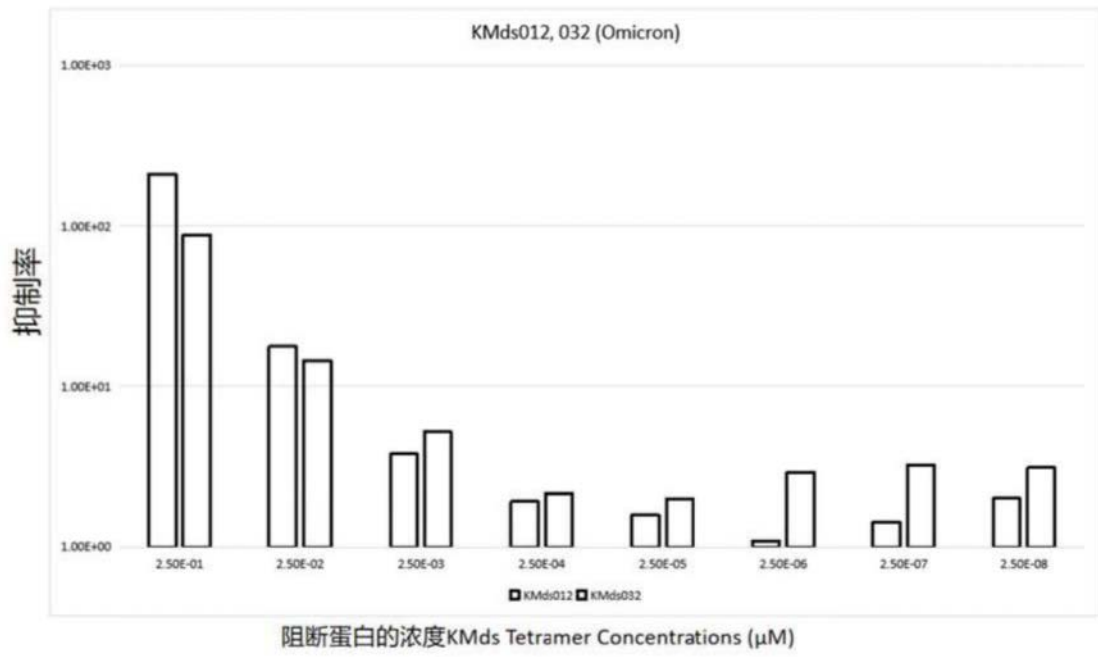


图19

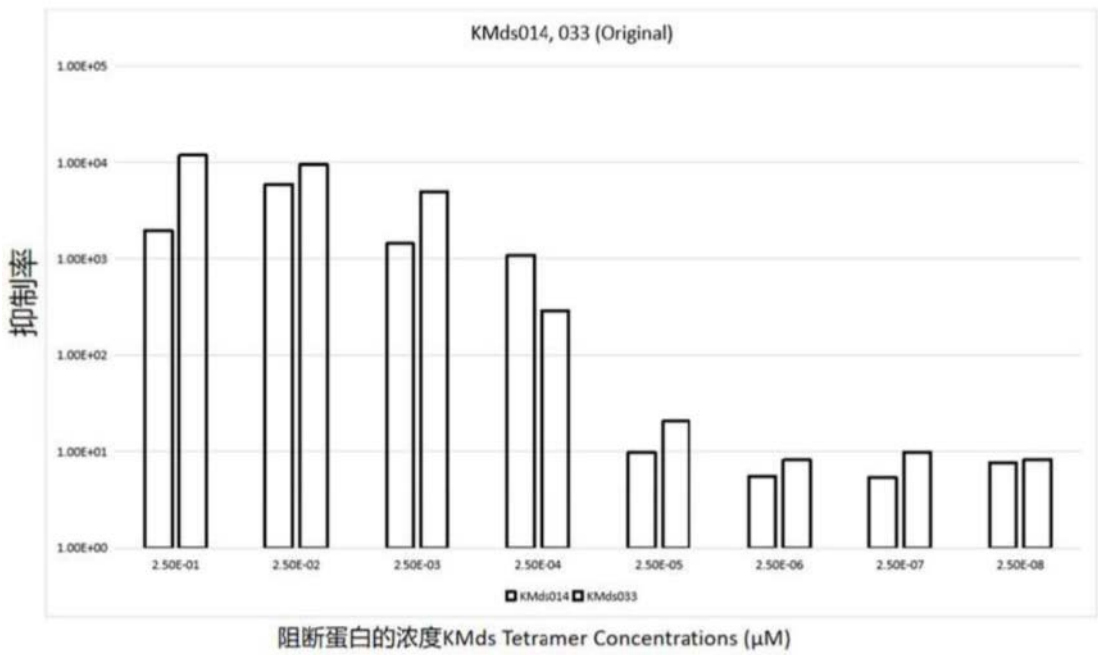


图20

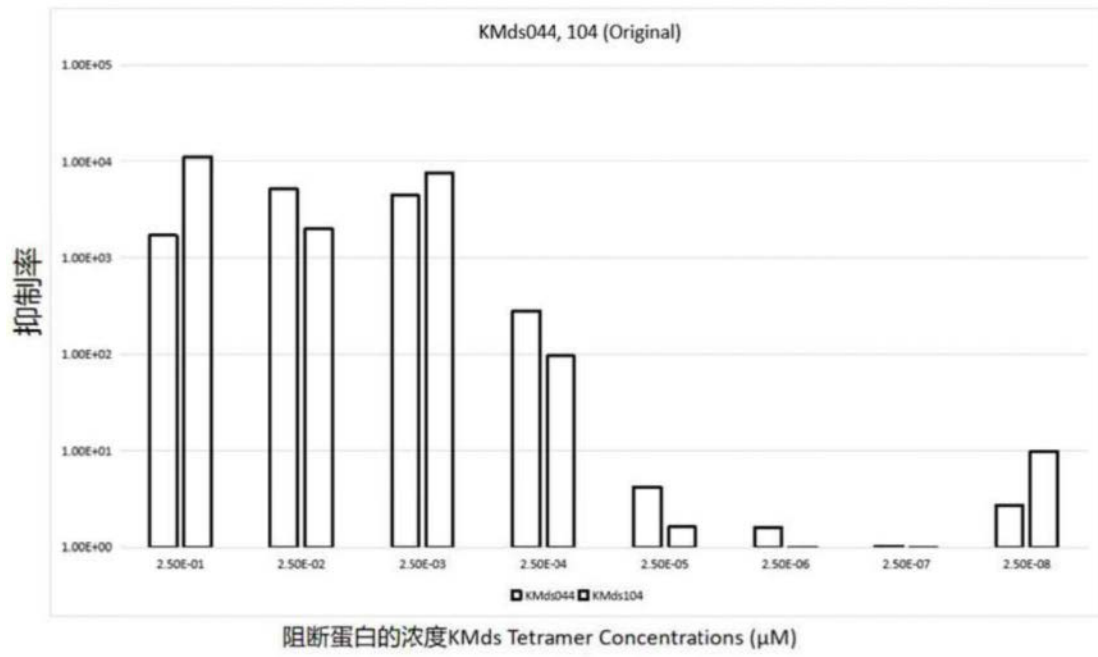


图21

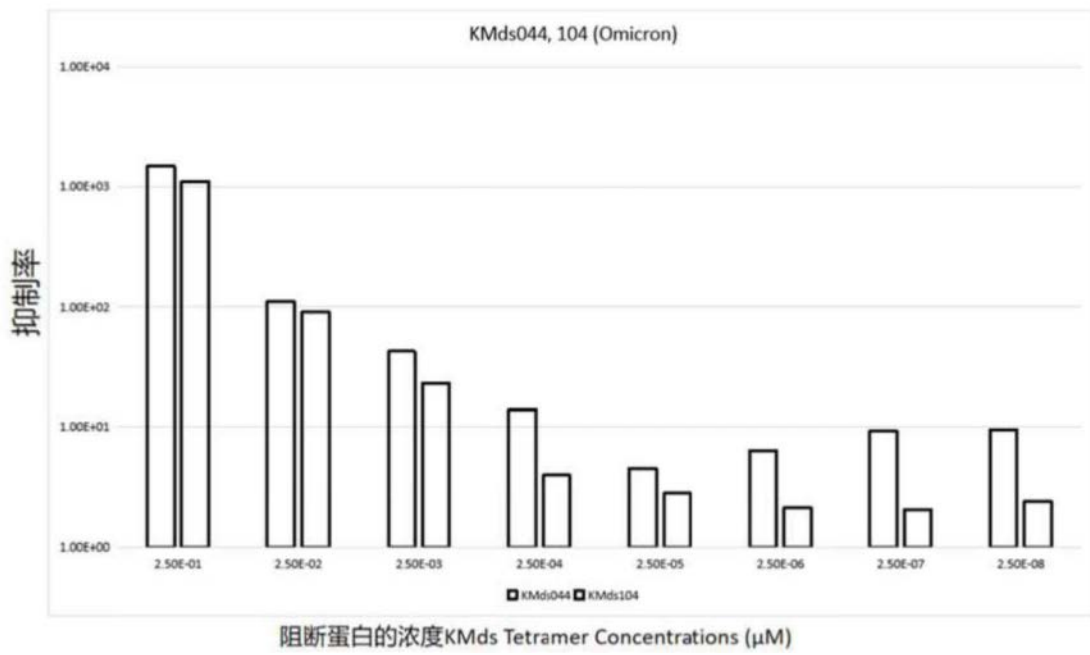


图22

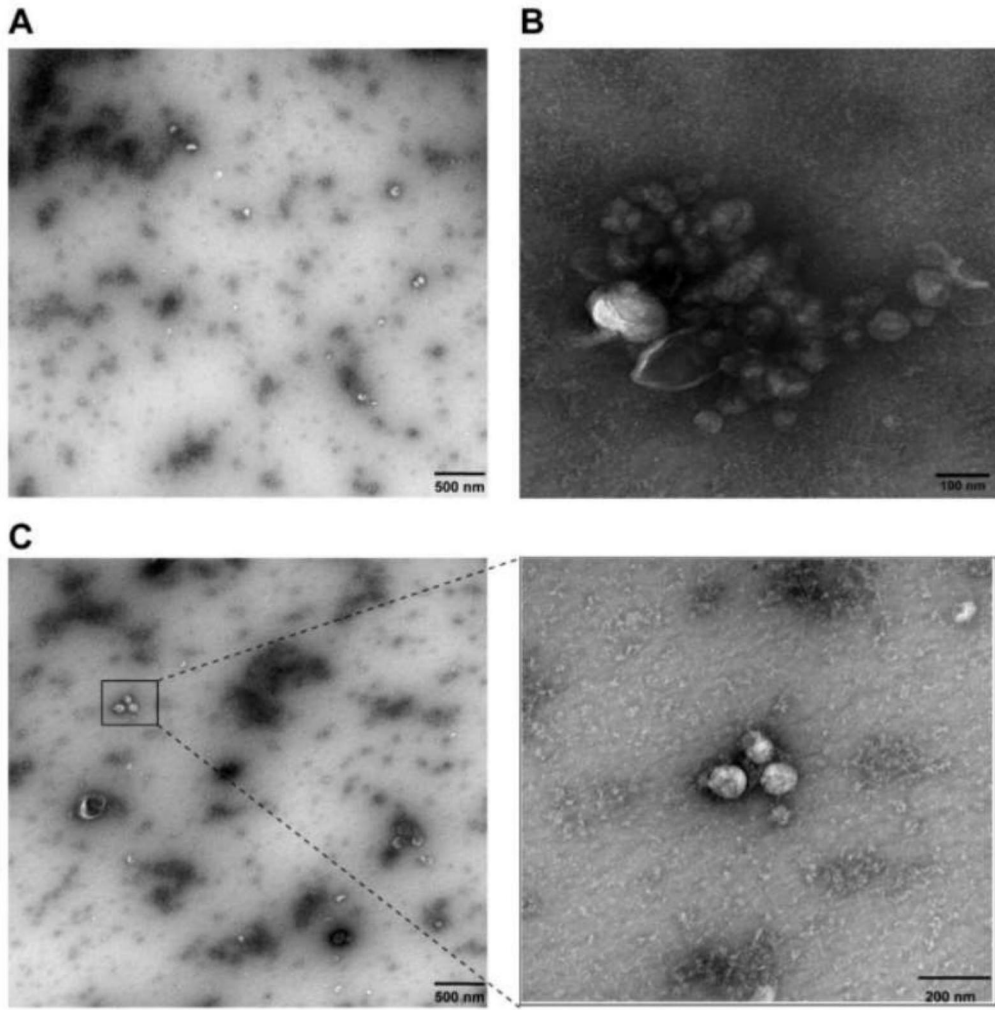


图23

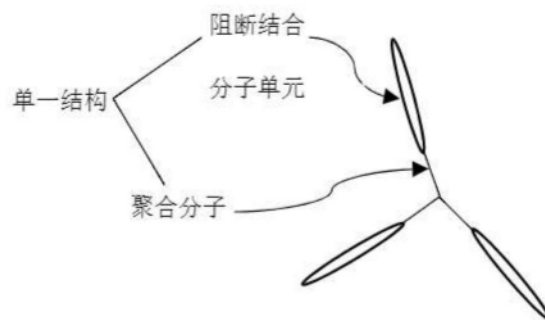


图24

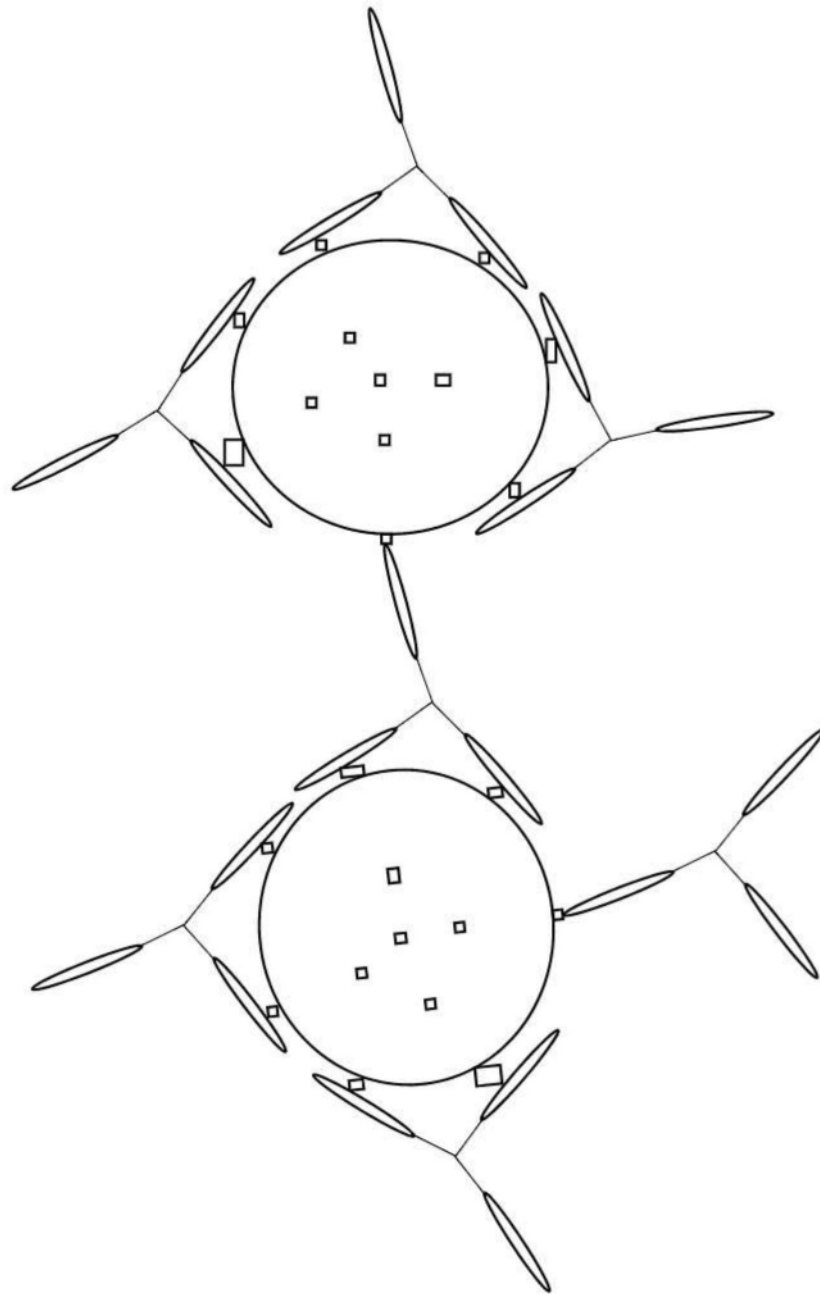


图25