

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-546561

(P2023-546561A)

(43)公表日 令和5年11月6日(2023.11.6)

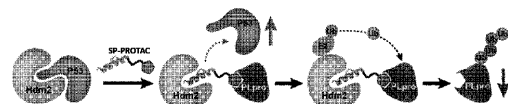
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	9/00 (2006.01)	C 1 2 N	9/00		4 C 0 7 6
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	Z N A	4 C 0 8 4
C 0 7 K	7/08 (2006.01)	C 0 7 K	7/08		4 C 0 8 6
C 0 7 K	14/00 (2006.01)	C 0 7 K	14/00		4 H 0 4 5
C 1 2 N	9/99 (2006.01)	C 1 2 N	9/99		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全90頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-521735(P2023-521735)		(71)出願人	399052796	
(86)(22)出願日	令和3年10月14日(2021.10.14)			デyna ファーバー キャンサー インス	
(85)翻訳文提出日	令和5年6月8日(2023.6.8)			ティチュート, インコーポレイテッド	
(86)国際出願番号	PCT/US2021/054954			アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2	
(87)国際公開番号	WO2022/081827			2 1 5, ボストン, ブルックライン ア	
(87)国際公開日	令和4年4月21日(2022.4.21)			ベニュー 4 5 0	
(31)優先権主張番号	63/091,769		(74)代理人	100078282	
(32)優先日	令和2年10月14日(2020.10.14)			弁理士 山本 秀策	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		(74)代理人	100113413	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA			弁理士 森下 夏樹	
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(		(74)代理人	100181674	
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A			弁理士 飯田 貴敏	
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR		(74)代理人	100181641	
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,			弁理士 石川 大輔	
	最終頁に続く		(74)代理人	230113332	
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 ウイルスタンパク質および宿主タンパク質の分解のためのキメラコンジュゲートならびに使用方法

(57)【要約】

本出願は、必須ウイルスタンパク質またはウイルス病原性に関与する宿主タンパク質を標的とし、それを分解するキメラについて記載する。具体的には、本出願のキメラは、標的タンパク質（例えば、コロナウイルスパイン様プロテアーゼ（P L p r o）、メインプロテアーゼ（M p r o）、もしくは他の非構造タンパク質（例えば、N S P 9もしくはN S P 1 2）、または宿主タンパク質、例えば、プロモドメイン2、プロモドメイン3、もしくはプロモドメイン4））に結合する部分を、タンパク質分解薬を動員する部分と組み合わせ、それによって、標的タンパク質を分解させる。一部の 경우에는、キメラは、タンパク質分解薬としてH D M 2に係合することによって、それ自体が抗ウイルス活性を有するp 5 3を同時に誘導する。

Figure 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第 2 の部分に結合している第 1 の部分を含むキメラであって、前記第 1 の部分および第 2 の部分が、互いに直接的に結合しているか、またはリンカーを介して互いに結合しており、
前記第 1 の部分が、分解について標的化される第 1 のタンパク質に結合し、前記第 1 のタンパク質が、コロナウイルスプロテアーゼ、コロナウイルス非構造タンパク質（NSP）、またはプロモドメインおよびエクストラ末端ドメイン（BET）タンパク質から選択され、
前記第 2 の部分が、第 2 のタンパク質に結合し、前記第 2 のタンパク質が、タンパク質分解薬であるか、またはそれを動員する、
キメラ。

10

【請求項 2】

前記第 2 のタンパク質が、E3 ユビキチンリガーゼである、請求項 1 に記載のキメラ。

【請求項 3】

前記第 1 の部分および前記第 2 の部分が、リンカーを介して互いに結合しており、必要に応じて、前記リンカーが、ペプチドリンカー、化学リンカー、グリシン-セリンリンカー、（G4S）₃（配列番号 26）、（G4S）₅（配列番号 27）、ベーターアラニン（Z）リンカー、ベーターアラニンおよびアラニン（ZA）リンカー、またはポリエチレングリコールリンカーである、請求項 1 に記載のキメラ。

20

【請求項 4】

前記第 1 の部分が、小分子、ウォーヘッドで誘導体化された小分子、ペプチド、ステープルペプチド、ウォーヘッドで誘導体化されたペプチド、ウォーヘッドで誘導体化されたステープルペプチド、またはヌクレオチドアナログを含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のキメラ。

【請求項 5】

前記コロナウイルスプロテアーゼが、パパイン様プロテアーゼ（PLpro）、またはメインプロテアーゼ（Mpro）であり、前記コロナウイルス NSP が、NSP9 または NSP12 であり、前記 BET タンパク質が、プロモドメイン 2（BRD2）、プロモドメイン 3（BRD3）、またはプロモドメイン 4（BRD4）である、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載のキメラ。

30

【請求項 6】

前記コロナウイルスプロテアーゼが、PLpro であり、前記第 1 の部分が、PLpro に結合する、請求項 5 に記載のキメラ。

【請求項 7】

PLpro に結合する前記第 1 の部分が、PLpro 阻害剤である、請求項 6 に記載のキメラ。

【請求項 8】

前記 PLpro 阻害剤が、GRL-0617 もしくはその PLpro 結合性アナログ、ジスルフィラム、または PLpro 結合性チオプリンアナログである、請求項 7 に記載のキメラ。

40

【請求項 9】

前記コロナウイルスプロテアーゼが、Mpro であり、前記第 1 の部分が、Mpro に結合する、請求項 5 に記載のキメラ。

【請求項 10】

Mpro に結合する前記第 1 の部分が、Mpro 阻害剤である、請求項 9 に記載のキメラ。

【請求項 11】

前記 Mpro 阻害剤が、ロピナビル、リトナビル、ダルナビル、ASC09、GC376、GC813、エブセレンカルボン酸、または配列番号 2 もしくは配列番号 3 に記載の

50

配列に対して少なくとも30%の同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチドであり、前記ペプチドが、Mpr oに結合する、請求項10に記載のキメラ。

【請求項12】

前記BETタンパク質が、BRD4であり、前記第1の部分が、前記BETタンパク質に結合する、請求項5に記載のキメラ。

【請求項13】

前記BETタンパク質に結合する前記第1の部分が、BETタンパク質阻害剤である、請求項12に記載のキメラ。

【請求項14】

前記BETタンパク質阻害剤が、JQ1、ABBV-075、I-BET151、I-BET726、OTX015、もしくはPFI-1、またはBRD4、BRD3、および／もしくはBRD2に結合するそれらのアナログである、請求項13に記載のキメラ。

【請求項15】

前記コロナウイルスNSPが、NSP9であり、前記第1の部分が、NSP9に結合する、請求項5に記載のキメラ。

【請求項16】

NSP9に結合する前記第1の部分が、NSP9阻害剤である、請求項15に記載のキメラ。

【請求項17】

前記第1の部分が、配列番号4または配列番号5に記載の配列に対して少なくとも30%の同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチドであり、前記ペプチドが、NSP9に結合する、請求項16に記載のキメラ。

【請求項18】

前記コロナウイルスNSPが、NSP12であり、前記第1の部分が、NSP12に結合する、請求項5に記載のキメラ。

【請求項19】

NSP12に結合する前記第1の部分が、NSP12阻害剤である、請求項18に記載のキメラ。

【請求項20】

前記第1の部分が、レムデシビル酸もしくはNSP12に結合するそのアナログ、またはソホスブビル酸もしくはNSP12に結合するそのアナログである、請求項19に記載のキメラ。

【請求項21】

前記第2のタンパク質が、ヒト二重微小染色体2（HDM2）、フォンヒッペルリンダウ（VHL）、セレブロン、X連鎖アポトーシス阻害タンパク質（XIAP）、細胞アポトーシス阻害タンパク質（cIAP）、または構成的光形態形成1（COP1）である、請求項1から20のいずれか一項に記載のキメラ。

【請求項22】

前記第2の部分が、前記タンパク質分解薬に結合するか、またはそれを動員する、ペプチド、ステーブルペプチド、または小分子を含む、請求項1から21のいずれか一項に記載のキメラ。

【請求項23】

前記第2の部分が、必要に応じてサリドマイド、ポマリドマイド、レナリドマイド、アバドマイド、およびセレブロンに結合するそれらのアナログからなる群より選択される、小分子であるセレブロン結合性部分を含む、請求項1から22のいずれか一項に記載のキメラ。

【請求項24】

前記第2の部分が、サリドマイド部分を含む、請求項23に記載のキメラ。

【請求項25】

前記サリドマイド部分が、以下に提供される構造：

10

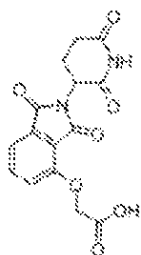
20

30

40

50

【化 2 7】



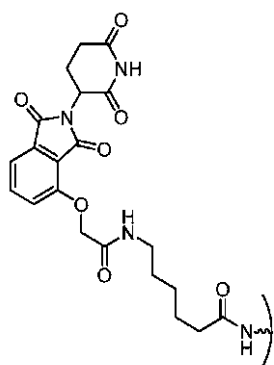
またはそのセレブロン結合性アナログ
を含む、請求項 2 4 に記載のキメラ。

10

【請求項 2 6】

前記サリドマイド部分が、以下に提供される構造：

【化 2 8】



20

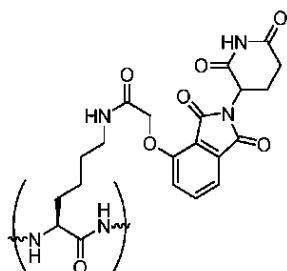
またはそのセレブロン結合性アナログ
を含む、請求項 2 4 に記載のキメラ。

【請求項 2 7】

前記サリドマイド部分が、以下に提供される構造：

【化 2 9】

30



またはそのセレブロン結合性アナログ
を含む、請求項 2 4 に記載のキメラ。

40

【請求項 2 8】

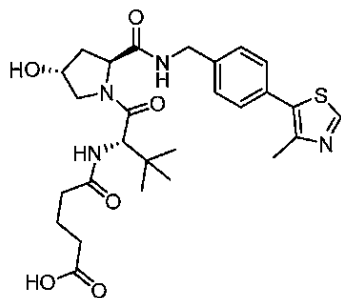
前記第 2 の部分が、必要に応じて V H 0 3 2 およびその V H L 結合性アナログからなる群より選択される、V H L 結合性部分を含む、請求項 1 から 2 2 のいずれか一項に記載のキメラ。

【請求項 2 9】

前記 V H L 結合性部分が、以下の構造：

50

【化 3 0】



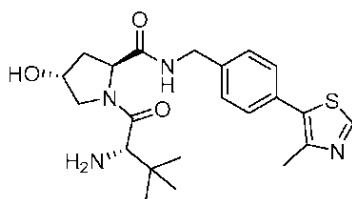
10

またはその V H L 結合性アナログ
を含む、請求項 2 8 に記載のキメラ。

【請求項 3 0】

前記 V H L 結合性部分が、以下の構造：

【化 3 1】



20

またはその V H L 結合性アナログ
を含む、請求項 2 8 に記載のキメラ。

【請求項 3 1】

前記第 2 の部分が、H D M 2 結合性部分を含む、請求項 1 から 2 2 のいずれか一項に記載のキメラ。

【請求項 3 2】

前記 H D M 2 結合性部分が、H D M 2 および／または H D M X に結合する、p 5 3 のトランス活性化ドメインのペプチド、またはステーブルペプチド、または他の方法で化学的に安定化されたペプチドを含む、請求項 3 1 に記載のキメラ。

30

【請求項 3 3】

前記 H D M 2 結合性部分が、A T S P - 7 0 4 1、S P 6 4 5、またはその H D M 2 結合性バリエーションであるステーブルペプチドである、請求項 3 2 に記載のキメラ。

【請求項 3 4】

前記ステーブルペプチドが、配列 L T F (R 8) E Y W A Q # (S 5) S A A (配列番号 7)、またはペプチドであって、以下：

(a) 配列番号 7 に記載の配列に対して少なくとも 3 0 % の同一性を有するアミノ酸配列、もしくは

(b) 前記ペプチドの相互作用面のアミノ酸が、置換されていない、配列番号 7 に記載の配列に対して少なくとも 3 0 % の同一性を有するアミノ酸配列、もしくは

40

(c) 前記ペプチドの相互作用面のアミノ酸のうちの 1 つもしくは複数、保存的アミノ酸で置換されており、(R 8) が、(R) - 2 - (7 ' - オクテニル) アラニンであり、# が、シクロブチルアラニンであり、(S 5) が、(S) - 2 - (4 ' - ペンテニル) アラニンもしくはその H D M 2 結合性バリエーションである、配列番号 7 に記載の配列に対して少なくとも 3 0 % の同一性を有するアミノ酸配列

を含む、ペプチドを含み、
前記ペプチドが、H D M 2 に結合する、
請求項 3 3 に記載のキメラ。

【請求項 3 5】

前記ステーブルペプチドが、配列 L T F (R 8) E Y W A Q L (S 5) S A A (配列番号 7) である、請求項 3 4 に記載のキメラ。

50

号 1)、またはその H D M 2 結合性バリエーション、またはペプチドであって、以下：

(a) 配列番号 1 に記載の配列に対して少なくとも 30% の同一性を有するアミノ酸配列、もしくは

(b) 前記ペプチドの相互作用面のアミノ酸が、置換されていない、配列番号 1 に記載の配列に対して少なくとも 30% の同一性を有するアミノ酸配列、もしくは

(c) 前記ペプチドの相互作用面のアミノ酸のうちの 1 つもしくは複数、保存的アミノ酸で置換されている、配列番号 1 に記載の配列に対して少なくとも 30% の同一性を有するアミノ酸配列

を含み、

(R 8) が、(R) - 2 - (7' - オクテニル) アラニンであり、(S 5) が、(S) - 2 - (4' - ペンテニル) アラニンである、ペプチドを含み、

前記ペプチドが、H D M 2 に結合する、

請求項 33 に記載のキメラ。

10

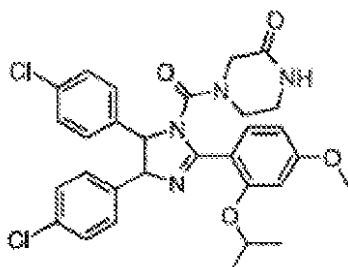
【請求項 36】

前記 H D M 2 結合性部分が、ヌトリン - 3 a またはその H D M 2 結合性アナログである、請求項 31 に記載のキメラ。

【請求項 37】

前記 H D M 2 結合性部分が、以下の構造：

【化 32】



20

を含む、請求項 36 に記載のキメラ。

【請求項 38】

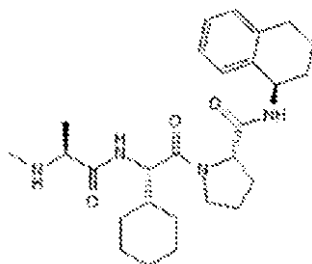
前記第 2 の部分が、A 410099.1 またはその X I A P 結合性アナログである X I A P 結合性部分を含む、請求項 1 から 21 のいずれか一項に記載のキメラ。

30

【請求項 39】

前記 X I A P 結合性部分が、以下の構造：

【化 33】



40

を含む、請求項 38 に記載のキメラ。

【請求項 40】

前記第 2 の部分が、S M - 1295、S M - 1280、またはその c I A P 結合性アナログである c I A P 結合性部分を含む、請求項 1 から 21 のいずれか一項に記載のキメラ。

【請求項 41】

前記第 2 の部分が、E 3 ユビキチンリガーゼに対する基質アダプターである W D 40 リピートタンパク質に結合するペプチドを含み、前記 W D 40 リピートタンパク質に結合す

50

るアミノ酸配列の天然結合配列または天然結合コンセンサス配列の改変型を含み、前記改変型が、前記天然結合コンセンサス配列内に少なくとも1個のアミノ酸置換、少なくとも1個のアミノ酸欠失、少なくとも1個のアミノ酸挿入、またはこれらの任意の組合せを含む、請求項1から40のいずれか一項に記載のキメラ。

【請求項42】

前記WD40リピートタンパク質が、E3ユビキチンリガーゼHDM2またはVHLの基質アダプターである、請求項41に記載のキメラ。

【請求項43】

前記天然結合コンセンサス配列、配列番号14もしくは15、またはそのバリエーション、前記バリエーションが、1～6個のアミノ酸の位置において前記コンセンサス配列とは異なる、請求項41に記載のキメラ。

10

【請求項44】

前記第2の部分が、COP1結合性部分を含む、請求項1から21のいずれか一項に記載のキメラ。

【請求項45】

前記COP1結合性部分が、トリブルズシュードキナーゼ1(Trib1)ペプチドまたはそのCOP1結合性バリエーションであるペプチドである、請求項44に記載のキメラ。

【請求項46】

前記ペプチドが、配列DQIVPEY(配列番号6)、または配列番号6に記載の配列に対して少なくとも30%の同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチドを含む、請求項45に記載のキメラ。

20

【請求項47】

前記タンパク質分解薬が、前記第1のタンパク質を分解する、請求項1から46のいずれか一項に記載のキメラ。

【請求項48】

請求項1から47のいずれか一項に記載のキメラと、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

【請求項49】

前記医薬組成物が、経口、静脈内、局所、頬内、直腸、非経口、腹腔内、皮内、皮下、筋肉内、経皮、鼻内、肺、または気管内投与のために製剤化される、請求項48に記載の医薬組成物。

30

【請求項50】

コロナウイルスによって引き起こされるウイルス感染症の処置または予防を、それを必要とする対象において行う方法であって、前記対象に、治療有効量の、請求項1から45のいずれか一項に記載のキメラまたは請求項47もしくは48に記載の医薬組成物を投与するステップを含む、方法。

【請求項51】

コロナウイルスのウイルス複製の遮断およびウイルス感染性の低減の両方を、それを必要とする対象において行うための方法であって、前記対象に、治療有効量の、請求項1から47のいずれか一項に記載のキメラまたは請求項48もしくは49に記載の医薬組成物を投与するステップを含む、方法。

40

【請求項52】

前記コロナウイルスが、中東呼吸器症候群コロナウイルス(MERS-CoV)、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス(SARS-CoV)、またはSARS-CoV-2である、請求項50または51に記載の方法。

【請求項53】

SARS-CoVまたはSARS-CoV-2の複製の遮断を、それを必要とする対象において行うための方法であって、前記対象に、治療有効量の、請求項1から47のいずれか一項に記載のキメラまたは請求項48もしくは49に記載の医薬組成物を投与するステップを含む、方法。

50

【請求項 54】

RNAウイルス感染症の処置または予防を、それを必要とする対象において行うための方法であって、前記対象に、治療有効量の、請求項1から45のいずれか一項に記載のキメラまたは請求項48もしくは49に記載の医薬組成物を投与するステップを含む、方法。

【請求項 55】

前記対象に、コルチコステロイド、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、デキサメタゾン、レムデシビル、IL-6阻害剤、IL-1阻害剤、キナーゼ阻害剤、補体阻害剤、イベルメクチン、ヒドロキシクロロキン、ファビピラビル、インターフェロナーベータ、およびイカチバントからなる群より選択される1つまたは複数の薬剤を投与するステップをさらに含む、請求項50から54のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 56】

前記対象が、ヒト、霊長類、コウモリ、トリ、マウス、シチメンチョウ、ウシ、ブタ、ネコ、およびイヌからなる群より選択される、請求項50から55のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 57】

配列番号2もしくは3に記載のアミノ酸配列またはそのバリエーションを含むペプチドであって、前記ペプチドが、Mprに結合し、それを阻害する、ペプチド。

【請求項 58】

配列番号2または3に記載のアミノ酸配列を含み、1個、2個、3個、4個、5個、または6個のアミノ酸置換を有するペプチドを含む安定化ペプチドであって、少なくとも2個のアミノ酸置換により、3個または6個のアミノ酸で隔てられたアミノ酸が、非天然アミノ酸と置き換えられ、前記ペプチドが、Mprに結合し、それを阻害する、安定化ペプチド。

20

【請求項 59】

50個を下回る、40個を下回る、35個を下回る、30個を下回る、または25個を下回るアミノ酸の長さである、請求項57または58に記載のペプチドまたは安定化ペプチド。

【請求項 60】

配列番号4もしくは5に記載のアミノ酸配列またはそのバリエーションを含むペプチドであって、前記ペプチドが、NSP9に結合する、ペプチド。

30

【請求項 61】

配列番号4または5に記載のアミノ酸配列を含み、1個、2個、3個、4個、5個、または6個のアミノ酸置換を有するペプチドを含む安定化ペプチドであって、少なくとも2個のアミノ酸置換により、3個または6個のアミノ酸で隔てられたアミノ酸が、非天然アミノ酸と置き換えられ、前記ペプチドが、NSP9に結合する、安定化ペプチド。

【請求項 62】

50個を下回る、40個を下回る、35個を下回る、30個を下回る、または25個を下回るアミノ酸の長さである、請求項60または61に記載のペプチドまたは安定化ペプチド。

40

【請求項 63】

請求項58から62のいずれか一項に記載のペプチドまたは安定化ペプチドと、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

【請求項 64】

コロナウイルス感染症の処置または予防を、それを必要とする対象において行う方法であって、前記対象に、治療有効量の、請求項58から62のいずれか一項に記載のペプチドもしくは安定化ペプチド、または請求項63に記載の医薬組成物を投与するステップを含む、方法。

【請求項 65】

図7または図14Aに示される分子のうちのいずれか1つの構造を有する化合物を含む

50

キメラ。

【請求項 6 6】

請求項 6 5 に記載のキメラと、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

【請求項 6 7】

コロナウイルスによって引き起こされるウイルス感染症の処置または予防を、それを必要とする対象において行う方法であって、前記対象に、治療有効量の、請求項 6 5 に記載のキメラまたは請求項 6 6 に記載の医薬組成物を投与するステップを含む、方法。

【請求項 6 8】

コロナウイルスのウイルス複製の遮断およびウイルス感染性の低減の両方を、それを必要とする対象において行うための方法であって、前記対象に、治療有効量の、請求項 6 5 に記載のキメラまたは請求項 6 6 に記載の医薬組成物を投与するステップを含む、方法。

【請求項 6 9】

SARS-CoV または SARS-CoV-2 の複製の遮断を、それを必要とする対象において行うための方法であって、前記対象に、治療有効量の、請求項 6 5 に記載のキメラまたは請求項 6 6 に記載の医薬組成物を投与するステップを含む、方法。

【請求項 7 0】

RNA ウイルス感染症の処置または予防を、それを必要とする対象において行うための方法であって、前記対象に、治療有効量の、請求項 6 5 に記載のキメラまたは請求項 6 6 に記載の医薬組成物を投与するステップを含む、方法。

【請求項 7 1】

前記対象が、ヒトである、請求項 6 7 から 7 0 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2020 年 10 月 14 日に提出された米国仮出願第 63 / 091, 769 号に基づく優先権の利益を主張し、この仮出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表

本明細書は、コンピュータ可読形式 (CRF) の配列表のコピーとともに提出されている。CRF は、00530-0409WO1__SL.txt という名称であり、2021 年 10 月 14 日に作成され、サイズが 25, 132 バイトであり、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

技術分野

本開示は、ウイルスタンパク質、例えば、必須ウイルスタンパク質、例えば、コロナウイルスパイン様プロテアーゼ (PLpro)、メインプロテアーゼ (Mpro)、他の非構造タンパク質 (例えば、NSP9 もしくは NSP12)、またはウイルス病原性に関与する宿主タンパク質、例えば、プロモドメインおよびエクストラ末端ドメイン (BET) タンパク質 (例えば、プロモドメイン 2、プロモドメイン 3、もしくはプロモドメイン 4) の分解を標的とするキメラコンジュゲート、すなわち、タンパク質分解標的化キメラ (PROTAC) に関する。本開示はまた、ウイルス感染症、特に、コロナウイルスによって引き起こされるウイルス感染症の処置および予防において、そのようなキメラコンジュゲートを使用する方法にも関する。また、ウイルスの成熟および複製を阻害するために、ウイルスタンパク質、例えば、コロナウイルスパイン様プロテアーゼ (PLpro)、メインプロテアーゼ (Mpro)、ならびに他の非構造ウイルスタンパク質 (例えば、NSP9 または NSP12) を阻害するペプチドも開示される。これらのペプチドは、ウイルス感染症 (例えば、コロナウイルス感染症) を処置するために使用することができる

。

背景

PLproおよびMproは、SARS-CoV-2などのコロナウイルスを含むRNAウイルスの生活環における必須酵素である。PLproは、ウイルス複製に必要とされる、ウイルスおよび細胞基質におけるペプチドおよびイソペプチド結合を加水分解することによってウイルスポリタンパク質および宿主細胞タンパク質をプロセッシングする多官能性システインプロテアーゼである (Baez-Santos, Y. M., et al. J Virol 88, 12511-27 (2014))。Mproは、ウイルスの生活環に必須である成熟タンパク質 (NSP5-16) を生じる自己プロセッシングタンパク質分解反応において主要な役割を果たす、SARS-CoV-2の主なタンパク質分解プロセッシング酵素である (Chang, G. G. Molecular Biology of the SARS-Coronavirus, 115-128 (2009))。コロナウイルス非構造タンパク質、例えば、NSP9およびNSP12は、ウイルス複製に関与する必須タンパク質である。PLproおよびMproのプロテアーゼ活性を阻害し、他のウイルスNSPを阻害する、いくつかの化合物が、開発されている (例えば、Baez-Santos et al. 2014, Jin Z Nature 2020, Anand, K., et al. Science 300, 1763-7 (2003), Ghosh, A. K. et al., J Med Chem 52, 5228-40 (2009), Baez-Santos, Y. M., et al. Antiviral Res 115, 21-38 (2015) を参照されたい)。しかしながら、これらの阻害剤は、十分に強力ではなく、したがって、部分的な阻害しか達成されない。ウイルス、例えば、コロナウイルス、例えば、SARS-CoV-2を標的とし、宿主系がCOVID-19などの感染症を撃退するのを可能にする、効果的な治療薬を開発することが急務である。

10

20

30

40

50

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Anand, K., ら、Science (2003) 300、1763～7

【非特許文献2】Ghosh, A. K. ら、J Med Chem (2009) 52、5228～40

【非特許文献3】Baez-Santos, Y. M., ら、Antiviral Res (2015) 115、21～38

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

要旨

本開示は、ウイルスタンパク質またはウイルス病原性に関与する宿主タンパク質の分解を標的とするキメラコンジュゲート (「キメラ」)、すなわち、タンパク質分解標的化キメラ (PROTAC) の特徴付けおよび使用に関する。一部の場合では、これらのウイルスタンパク質は、ウイルスの複製、感染性、または病原性に必須のタンパク質である。そのようなキメラは、任意のRNAウイルスの必須ウイルスタンパク質を分解し、それによって、そのようなRNAウイルスによって引き起こされる感染症を処置することができる。具体的には、本開示のキメラは、必須コロナウイルスタンパク質、例えば、パピリン様プロテアーゼ (PLpro)、メインプロテアーゼ (Mpro)、または別の非構造タンパク質 (例えば、NSP9およびNSP12) を分解するために使用することができる。本開示のキメラはまた、ウイルス病原性に関与する宿主タンパク質、特に、プロモドメイン2、プロモドメイン3、およびプロモドメイン4 (それぞれ、BRD2、BRD3、およびBRD4) の分解も標的化され得る。例えば、本開示は、図7および14Aに示される分子のそれぞれを包含する。

【0006】

本開示はまた、ウイルス感染症、特に、コロナウイルスによって引き起こされるウイルス感染症（例えば、COVID-19）の処置において、そのようなキメラを使用する方法についても記載する。本開示のキメラは、ウイルスタンパク質または宿主タンパク質を標的とする部分（例えば、ペプチド、ステーブルペプチド（*stapled peptide*）、小分子、ウォーヘッド（*warhead*）で誘導体化された小分子、またはヌクレオチドアナログ）を、タンパク質分解を誘導する部分（例えば、タンパク質分解薬（*protein degrader*））に結合するか、もしくはそれを動員する、ペプチド、ステーブルペプチド、または小分子）と組み合わせる。したがって、そのようなキメラは、目的とされる任意のウイルスタンパク質（例えば、コロナウイルスPLpro、Mpro、NSP9、NSP12など）またはウイルス病原性に関与する任意の宿主タンパク質（例えば、BRD2、BRD3、BRD4など）を標的とするために使用することができる、二官能性ステーブルペプチド-小分子コンジュゲート、ペプチド-小分子コンジュゲート、ステーブルペプチド-ペプチドコンジュゲート、ペプチド-ステーブルペプチドコンジュゲート、ステーブルペプチド-ステーブルペプチドコンジュゲート、ペプチド-ペプチドコンジュゲート、小分子-ステーブルペプチドコンジュゲート、および小分子-小分子コンジュゲートなどであり得る。

10

【0007】

本開示は、目的とされるウイルスタンパク質（例えば、コロナウイルスPLpro、Mpro、NSP9、NSP12など）またはウイルス病原性に関与する任意の宿主タンパク質（例えば、BRD2、BRD3、BRD4など）の分解だけでなく、HDM2および／またはHDMXと複合体を形成していないp53タンパク質の量の増加も行うための、組成物および方法を提供する。これにより、p53に媒介される、ウイルス複製および／または病原性の抑制が可能となる。したがって、本組成物は、抗ウイルス（例えば、抗SARS）活性の相加的または相乗的増加を提供する。

20

【0008】

ウイルスタンパク質、例えば、MproおよびNSP9に結合し、それを阻害することができる、ペプチドも開示される。

【0009】

第1の態様では、本開示は、第2の部分に結合している第1の部分を含み、第1の部分および第2の部分が、互いに直接的に結合しているか、またはリンカーを介して互いに結合している、キメラを特徴とする。第1の部分は、分解について標的化される第1のタンパク質に結合する。一部の場合では、第1のタンパク質は、コロナウイルスプロテアーゼ、コロナウイルス非構造タンパク質（NSP）、またはプロモドメインおよびエクストラ末端ドメイン（BET）タンパク質から選択される。第2の部分は、第2のタンパク質に結合し、第2のタンパク質は、「タンパク質分解薬」であるか、またはそれを動員する。一部の場合では、第2のタンパク質は、E3ユビキチンリガーゼである。

30

【0010】

別の態様では、本開示は、直接的またはリンカーを介して第2の部分に結合している、ウイルスタンパク質（Mpro、PLpro、NSP9、NSP12）または宿主タンパク質（例えば、BRD2、BRD3、もしくはBRD4）に結合するための手段を含むキメラに関する。第2の部分は、第2のタンパク質に結合し、第2のタンパク質は、「タンパク質分解薬」であるか、またはそれを動員する。一部の場合では、第2のタンパク質は、E3ユビキチンリガーゼである。

40

【0011】

別の態様では、本開示は、直接的にまたはリンカーを介して、E3リガーゼに結合する手段（例えば、HDM2、VHL、セレブロン、XIAP、cIAP、COP1）に結合している、分解について標的化される第1のタンパク質（例えば、コロナウイルスプロテアーゼ、コロナウイルス非構造タンパク質（NSP）、またはプロモドメインおよびエクストラ末端ドメイン（BET）タンパク質）に結合する第1の部分を提供する。

50

【0012】

一部の場合では、第1の部分および第2の部分は、リンカーを介して互いに結合している。例えば、リンカーは、ペプチドリンカー、化学リンカー、グリシン-セリンリンカー、例えば、(G4S)₃(配列番号26)もしくは(G4S)₅(配列番号27)、ベータアラニン(Z)リンカー、ベータアラニンおよびアラニン(ZA)リンカー、またはポリエチレングリコールリンカーであり得る。

【0013】

ある特定の場合では、第1の部分は、小分子、ウォーヘッドで誘導体化された小分子、ペプチド、ステーブルペプチド、ウォーヘッドで誘導体化されたペプチド、ウォーヘッドで誘導体化されたステーブルペプチド、またはヌクレオチドアナログを含む。

10

【0014】

一部の場合では、コロナウイルスプロテアーゼは、パパイン様プロテアーゼ(PLpro)、またはメインプロテアーゼ(Mpro)であり、コロナウイルスNSPは、NSP9またはNSP12であり、BETタンパク質は、プロモドメイン2(BRD2)、プロモドメイン3(BRD3)、またはプロモドメイン4(BRD4)である。

【0015】

1つの場合では、コロナウイルスプロテアーゼは、PLproであり、第1の部分は、PLproに結合する。PLproに結合する第1の部分は、PLpro阻害剤であり得る。一部の場合では、PLpro阻害剤は、GRL-0617もしくはそのPLpro結合性アナログ、ジスルフィラム、またはPLpro結合性チオプリンアナログである。

20

【0016】

ある特定の場合では、コロナウイルスプロテアーゼは、Mproであり、第1の部分は、Mproに結合する。一部の場合では、Mpro阻害剤は、ロピナビル、リトナビル、ダルナビル、ASC09、ASC09F、GC376、GC813、エブセレンカルボン酸、またはペプチドである。ある特定の場合では、ペプチドは、配列番号2または配列番号3に記載の配列に対して少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ペプチドは、Mproに結合し、それを阻害する。ある特定の場合では、ペプチドは、1~5個のアミノ酸置換を除いて、配列番号2または配列番号3に記載のアミノ酸配列を含み、ペプチドは、Mproに結合し、それを阻害する。置換は、保存的アミノ酸とのものであり得る。一部の場合では、ペプチドがMproに結合し、それを阻害する限り、置換は、非保存的アミノ酸とのものであってもよい。

30

【0017】

一部の場合では、BETタンパク質は、BRD4であり、第1の部分は、BETタンパク質に結合する。一部の場合では、BETタンパク質に結合する第1の部分は、BETタンパク質阻害剤である。ある特定の場合では、BETタンパク質阻害剤は、JQ1、ABBV-075、I-BET151、I-BET726、OTX015、もしくはPFI-1、またはBRD4、BRD3、および／もしくはBRD2に結合するそれらのアナログである。

【0018】

一部の場合では、コロナウイルスNSPは、NSP9であり、第1の部分は、NSP9に結合する。一部の場合では、NSP9に結合する第1の部分は、NSP9阻害剤である。ある特定の場合では、第1の部分は、配列番号4または配列番号5に記載の配列に対して少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチドであり、ペプチドは、NSP9に結合する。ある特定の場合では、ペプチドは、1~5個のアミノ酸置換を除いて、配列番号4または配列番号5に記載のアミノ酸配列を含み、ペプチドは、NSP9に結合する。置換は、保存的アミノ酸とのものであり得る。一部の場合では、ペプチドがNSP9に結合する限り、置換は、非保存的アミノ酸とのものであってもよい。

40

【0019】

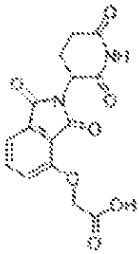
50

ある特定の場合では、コロナウイルスNSPは、NSP12であり、第1の部分は、NSP12に結合する。一部の場合では、NSP12に結合する第1の部分は、NSP12阻害剤である。ある特定の場合では、第1の部分は、レムデシビル酸もしくはNSP12に結合するそのアナログ、またはソホスブビル酸もしくはNSP12に結合するそのアナログである。

【0020】

一部の場合では、第2のタンパク質は、ヒト二重微小染色体（human double minute）2（HDM2）、フォンヒッペルリンダウ（VHL）、セレブロン、X連鎖アポトーシス阻害タンパク質（XIAP）、細胞アポトーシス阻害タンパク質（cellular inhibitor of apoptosis protein）（cIAP）、または構成的光形態形成（Constitutive photomorphogenic）1（COP1）である。一部の場合では、第2の部分は、タンパク質分解薬に結合するか、またはそれを動員する、ペプチド、ステーブルペプチド、または小分子を含む。一部の場合では、第2の部分は、小分子であるセレブロン結合性部分を含む。一部の場合では、小分子は、サリドマイド、ボマリドマイド、レナリドマイド、アバドマイド、およびセレブロンに結合するそれらのアナログからなる群より選択される。一部の場合では、第2の部分は、サリドマイド部分を含む。1つの場合では、サリドマイド部分は、以下に提供される構造：

【化1】

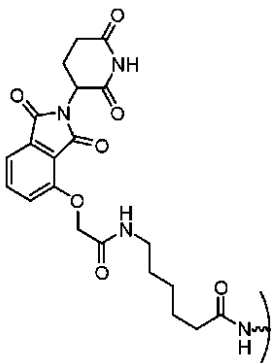


またはそのセレブロン結合性アナログを含む。

【0021】

一部の場合では、サリドマイド部分は、以下に提供される構造：

【化2】



またはそのセレブロン結合性アナログを含む。

【0022】

ある特定の場合では、サリドマイド部分は、以下に提供される構造：

10

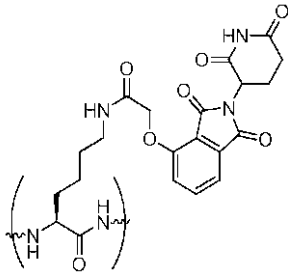
20

30

40

50

【化 3】



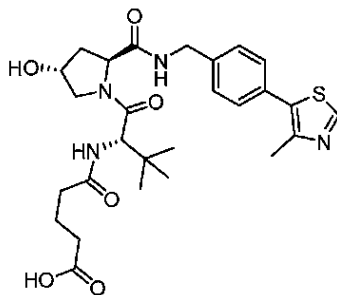
またはそのセレブロン結合性アナログを含む。

10

【0023】

一部の場合では、第2の部分、必要に応じてVH 032およびそのVHL結合性アナログからなる群より選択される、VHL結合性部分を含む。ある特定の場合では、VHL結合性部分は、以下の構造：

【化 4】



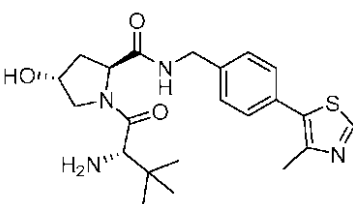
20

またはそのVHL結合性アナログを含む。

【0024】

一部の場合では、VHL結合性部分は、以下の構造：

【化 5】



30

またはそのVHL結合性アナログを含む。

【0025】

一部の場合では、第2の部分、HDM2結合性部分を含む。ある特定の場合では、HDM2結合性部分は、HDM2および／またはHDMXに結合する、p53のトランス活性化ドメインのペプチド、またはステーブルペプチド、または他の方法で化学的に安定化されたペプチドを含む。一部の場合では、HDM2結合性部分は、ATSP-7041、SP645、またはそのHDM2結合性バリエーションであるステーブルペプチドである。

40

【0026】

ある特定の場合では、ステーブルペプチドは、配列LTF(R8)EYWAQ#(S5)SAA(配列番号7)を含み、ここで、(R8)は、(R)-2-(7'-オクテニル)アラニンであり、#は、シクロブチルアラニンであり、(S5)は、(S)-2-(4'-ペンテニル)アラニン、またはそのHDM2結合性バリエーションである。ある特定の場合

50

合では、ステアブルペプチドは、配列番号 7 に記載の配列に対して少なくとも 30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ステアブルペプチドは、HDM2 に結合する。一部の場合では、ステアブルペプチドは、配列番号 7 に記載の配列に対して少なくとも 30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、または 95 % の同一性を有するアミノ酸配列であって、ペプチドの相互作用面のアミノ酸が置換されていない、アミノ酸配列を含み、ステアブルペプチドは、HDM2 に結合する。一部の場合では、ステアブルペプチドは、配列番号 7 に記載の配列に対して少なくとも 30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、または 95 % の同一性を有するアミノ酸配列であって、ペプチドの相互作用面のアミノ酸のうちの 1 つまたは複数が、保存的アミノ酸と置換されている、アミノ酸配列を含み、ステアブルペプチドは、HDM2 に結合する。ある特定の場合では、ステアブルペプチドは、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、または 6 個のアミノ酸置換を除いて、配列番号 7 に記載のアミノ酸配列を含み、ステアブルペプチドは、HDM2 に結合する。置換は、保存的アミノ酸とのものであり得る。一部の場合では、ペプチドが HDM2 に結合する限り、置換は、非保存的アミノ酸とのものであってもよい。

10

20

30

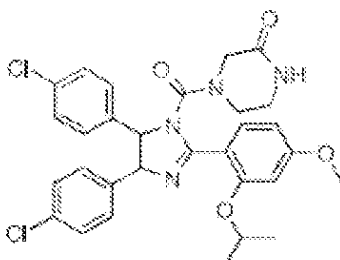
【0027】

ある特定の場合では、ステアブルペプチドは、配列 L T F (R 8) E Y W A Q L (S 5) S A A (配列番号 1) を含み、ここで、(R 8) は、(R) - 2 - (7' - オクテニル) アラニンであり、# は、シクロブチルアラニンであり、(S 5) は、(S) - 2 - (4' - ペンテニル) アラニン、またはその HDM2 結合性バリエーションである。ある特定の場合では、ステアブルペプチドは、配列番号 1 に記載の配列に対して少なくとも 30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ステアブルペプチドは、HDM2 に結合する。一部の場合では、ステアブルペプチドは、配列番号 1 に記載の配列に対して少なくとも 30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、または 95 % の同一性を有するアミノ酸配列であって、ペプチドの相互作用面のアミノ酸が置換されていない、アミノ酸配列を含み、ステアブルペプチドは、HDM2 に結合する。一部の場合では、ステアブルペプチドは、配列番号 1 に記載の配列に対して少なくとも 30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、または 95 % の同一性を有するアミノ酸配列であって、ペプチドの相互作用面のアミノ酸のうちの 1 つまたは複数が、保存的アミノ酸と置換されている、アミノ酸配列を含み、ステアブルペプチドは、HDM2 に結合する。ある特定の場合では、ステアブルペプチドは、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、または 6 個のアミノ酸置換を除いて、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を含み、ステアブルペプチドは、HDM2 に結合する。置換は、保存的アミノ酸とのものであり得る。一部の場合では、ペプチドが HDM2 に結合する限り、置換は、非保存的アミノ酸とのものであってもよい。

【0028】

一部の場合では、HDM2 結合性部分は、ヌトリン-3 a またはその HDM2 結合性アナログである。一部の場合では、HDM2 結合性部分は、以下の構造：

【化 6】



40

を含む。

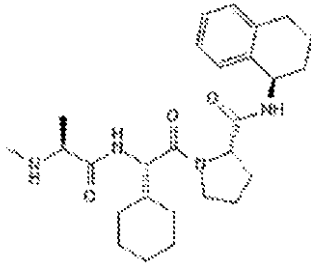
【0029】

ある特定の場合では、第 2 の部分は、A 4 1 0 0 9 9 . 1 またはその X I A P 結合性ア

50

ナログである X I A P 結合性部分を含む。一部の場合では、X I A P 結合性部分は、以下の構造：

【化 7】



10

を含む。

【0030】

ある特定の場合では、第 2 の部分は、S M - 1 2 9 5、S M - 1 2 8 0、またはその c I A P 結合性アナログである c I A P 結合性部分を含む。

【0031】

一部の場合では、第 2 の部分は、W D 4 0 リピータンパク質に結合するペプチドであって、E 3 ユビキチンリガーゼに対する基質アダプターであるペプチドを含む。ペプチドは、W D 4 0 リピータンパク質に結合するアミノ酸配列の天然結合配列または天然結合コンセンサス配列の改変型を含む。改変バージョンは、天然結合コンセンサス配列内に、少なくとも 1 個のアミノ酸置換、少なくとも 1 個のアミノ酸欠失、少なくとも 1 個のアミノ酸挿入、またはこれらの任意の組合せを含む。ある特定の場合では、W D 4 0 リピータンパク質は、E 3 ユビキチンリガーゼ H D M 2 または V H L の基質アダプターである。一部の場合では、天然結合コンセンサス配列、配列番号 1 4 もしくは 1 5、またはそのバリエーション、バリエーションが、1 ~ 6 個のアミノ酸の位置においてコンセンサス配列とは異なる。

20

【0032】

ある特定の場合では、第 2 の部分は、C O P 1 結合性部分を含む。一部の場合では、C O P 1 結合性部分は、トリブルズシュードキナーゼ (T r i b b l e s P s e u d o k i n a s e) 1 (T r i b 1) ペプチドまたはその C O P 1 結合性バリエーションであるペプチドである。一部の場合では、ペプチドは、配列 D Q I V P E Y (配列番号 6)、または配列番号 6 に記載の配列に対して少なくとも 3 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチドを含む。

30

【0033】

一部の場合では、タンパク質分解薬は、第 1 のタンパク質の分解を促進する。例えば、E 3 ユビキチンリガーゼは、第 1 のタンパク質のユビキチン化および分解を促進する。

【0034】

別の態様では、本開示は、図 7 または図 1 4 A に示される分子のうちのいずれか 1 つの構造を有する分子を含むキメラに関する。

【0035】

別の態様では、本開示は、本明細書において開示されるペプチドまたはキメラと、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を特徴とする。一部の場合では、医薬組成物は、経口、静脈内、局所、頬内、直腸、非経口、腹腔内、皮内、皮下、筋肉内、経皮、鼻内、肺、または気管内投与のために製剤化される。

40

【0036】

さらに別の態様では、本開示は、コロナウイルスによって引き起こされるウイルス感染症の処置または予防を、それを必要とする対象において行う方法を提供する。本方法は、対象に、治療有効量の、本明細書において開示されるペプチド、キメラ、または医薬組成物を投与するステップを含む。

【0037】

50

別の態様では、本開示は、コロナウイルスのウイルス複製の遮断およびそのウイルス感染性の低減の両方を、それを必要とする対象において行うための方法の特徴とする。本方法は、対象に、治療有効量の、本明細書において開示されるペプチド、キメラ、または医薬組成物を投与するステップを含む。一部の場合では、コロナウイルスは、中東呼吸器症候群コロナウイルス（MERS-CoV）、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス（SARS-CoV）、またはSARS-CoV-2である。

【0038】

別の態様では、本開示は、SARS-CoVまたはSARS-CoV-2の複製の遮断を、それを必要とする対象において行うための方法を提供する。本方法は、対象に、治療有効量の、本明細書において開示されるペプチド、キメラ、または医薬組成物を投与するステップを含む。

10

【0039】

別の態様では、本開示は、RNAウイルス感染症の処置または予防を、それを必要とする対象において行うための方法の特徴とする。本方法は、対象に、治療有効量の、本明細書において開示されるペプチド、キメラ、または医薬組成物を投与するステップを含む。

【0040】

一部の場合では、上述の方法は、対象に、コルチコステロイド、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、デキサメタゾン、レムデシビル、IL-6阻害剤、IL-1阻害剤、キナーゼ阻害剤、補体阻害剤、イベルメクチン、ヒドロキシクロロキン、ファビピラビル、インターフェロナーベータ、およびイカチバントからなる群より選択される1つまたは複数の薬剤を投与するステップをさらに含み得る。

20

【0041】

一部の場合では、対象は、ヒト、霊長類、コウモリ、トリ、マウス、シチメンチョウ、ウシ、ブタ、ネコ、およびイヌからなる群より選択される。1つの場合では、対象は、ヒトである。

【0042】

別の態様では、本開示は、配列番号2もしくは3に記載のアミノ酸配列、またはそのバリエーション（例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、もしくは7個のアミノ酸置換もしくは欠失により配列番号2もしくは3とは異なるペプチド）を含むペプチドであって、Mproに結合し、それを阻害する、ペプチドを提供する。

30

【0043】

別の態様では、本開示は、配列番号2または3に記載のアミノ酸配列を含み、1個、2個、3個、4個、5個、または6個のアミノ酸置換を有するペプチドを含む安定化（例えば、ステーブル、ステッチ）ペプチドであって、少なくとも2個のアミノ酸置換により、3個または6個のアミノ酸で隔てられたアミノ酸が、非天然アミノ酸と置き換えられ、ペプチドが、Mproに結合し、それを阻害する、安定化ペプチドの特徴とする。アミノ酸置換により、3個のアミノ酸で隔てられたアミノ酸が、非天然アミノ酸と置き換えられる場合、非天然アミノ酸は、いずれも、S5である。アミノ酸置換により、6個のアミノ酸で隔てられたアミノ酸が、非天然アミノ酸と置き換えられる場合、非天然アミノ酸は、それぞれ、R8[(R)-2-(7'-オクテニル)アラニン]およびS5[(S)-2-(4'-ペンテニル)アラニン]、またはR5[(R)-2-(4'-ペンテニル)アラニン]およびS8[(S)-2-(7'-オクテニル)アラニン]である。

40

【0044】

一部の場合では、ペプチドまたは安定化ペプチドは、50個未満、40個未満、35個未満、30個未満、25個未満、24個未満、23個未満、または21個未満のアミノ酸の長さである。

【0045】

別の態様では、本開示は、配列番号4もしくは5に記載のアミノ酸配列またはそのバリエーションを含むペプチドであって、NSP9に結合する、ペプチドの特徴とする。一部の場合では、ペプチドは、NSP9の二量体化を阻害する。

50

【0046】

別の態様では、本開示は、配列番号4または5に記載のアミノ酸配列を含み、1個、2個、3個、4個、5個、または6個のアミノ酸置換を有するペプチドを含む安定化（例えば、ステーブル、ステッチ）ペプチドであって、少なくとも2個のアミノ酸置換により、3個または6個のアミノ酸で隔てられたアミノ酸が、非天然アミノ酸と置き換えられ、ペプチドが、NSP9に結合する、安定化ペプチドを提供する。一部の場合では、安定化ペプチドは、NSP9の二量体化を阻害する。

【0047】

一部の場合では、ペプチドまたは安定化ペプチドは、50個未満、40個未満、35個未満、30個未満、25個未満、24個未満、23個未満、22個未満、または21個未満のアミノ酸の長さである。

【0048】

別の態様では、本開示は、本明細書において開示されるペプチドまたは安定化ペプチドと、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を特徴とする。

【0049】

さらに別の態様では、本開示は、コロナウイルス感染症の処置または予防を、それが必要とする対象において行う方法を提供する。本方法は、対象に、治療有効量の、本明細書において開示されるペプチド、安定化ペプチド、または医薬組成物を投与するステップを含む。一部の場合では、対象は、ヒト対象である。一部の場合では、対象は、ネコ、イヌ、ウマ、ヒツジ、ニワトリ、またはウシである。

【0050】

本開示はまた、Mpr oまたはNSP9を阻害するための手段と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物も特徴とする。

【0051】

特に定義しない限り、本明細書において使用する全ての技術および科学用語は、本発明が属する当業者によって通常理解されるものと同じ意味を有する。本明細書において記載するものと同様のまたは同等の方法および材料を本発明の実施または試験において使用することができるが、例示的な方法および材料を以下に記載する。本明細書において記載する全ての出版物、特許出願、特許、および他の参考文献は、その全体が参照により組み込まれる。矛盾がある場合は、定義を含む本出願がコントロールすることになる。材料、方法、および例は、例示にすぎず、限定することを意図するものではない。

【0052】

疑いがあればそれを回避するために、「一部の実施形態では」、「ある特定の実施形態では」、「ある特定の場では」、「一部の場では」、「さらなる実施形態では」、「一実施形態では」、および「さらなる実施形態では」などの表現は、本明細書に記載される実施形態のいずれも、それらの実施形態の特徴のそれぞれを組み合わせることを念頭に読み取られるように、ならびに本開示が、それらの実施形態の特徴の組合せが一実施形態において詳細に説明されているのと同じように取り扱われる必要があるように、使用および意図されることが強調される。同じことが、添付の特許請求の範囲および実施例において例証されている実施形態および特徴の任意の組合せにも当てはまり、これらはまた、説明において開示される対応する実施形態からの特徴と組み合わせられることも意図されており、一貫性および簡潔さのみを目的として、実施形態は、従属性によって特徴づけられているが、実際に、（多重）従属性に起因して結び付けることができるそれぞれの実施形態および特徴の組合せは、文字通り開示されていると認識されるものであり、さまざまな選択肢の中から選ばれたものとして解釈されるものではない。この文脈において、当業者であれば、実施例において開示されている実施形態および特徴が、そこで例証されているものと同じ機能を有する均等物に一般化されるよう意図することを、認識するであろう。

【0053】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0054】

【図1】図1は、PLproおよびHDM2に指向されるステーブルペプチド-タンパク質分解標的化キメラ（SP-PROTAC）が、PLproタンパク質（SARS-CoV-2 必須プロテアーゼ）を分解し、宿主細胞におけるp53レベルを増加させる機序を示す、概略図である。HDM2 結合性ステーブルペプチドは、p53を、HDM2/HDMX-p53 複合体から変位させ、それによって、遊離p53のレベルを増加させ（上向きの矢印によって示される）、一方で、SP-PROTACのPLpro 結合性部分は、PLproに結合し、それをE3 ユビキチンリガーゼであるHDM2に近接させ、これによって、PLproのユビキチン化および最終的な分解が生じる（下向きの矢印によって示される）。Ub：ユビキチン、Hdm2：ヒト二重微小染色体2、p53：腫瘍タンパク質p53、PLpro：パパイン様プロテアーゼ、E2：ユビキチン結合酵素。

10

【0055】

【図2】図2の上部パネルは、さまざまな種類のステーブルペプチドを生成するために使用する、例示的な非天然アミノ酸の化学構造を示す。図2の中央パネルは、ペプチドヘリックスの長さに沿って異なる距離にまたがるさまざまな長さのステーブル（i, i+3, i, i+4、およびi, i+7）を用いたステーブルペプチドの生成を示す。図2の下部パネルは、ペプチド配列に沿ったステーブルウォーク（staple walk）がどのように達成されるかを示す。

【0056】

20

【図3】図3は、さまざまな種類の二重および三重ステーブル化戦略を、ステーブルペプチドを生成するための例示的なステーブルウォークとともに示す。

【0057】

【図4】図4は、ステッチペプチドを生成するための例示的なステーブルウォークを示す。

【0058】

【図5】図5は、SP-PROTACのペプチドリガンド成分が、変異誘発、差示的ステーブルまたはステッチ挿入、および置換、欠失、付加、または誘導体化によるペプチド配列の変異によって最適化され得るさまざまな方法を示す。

【0059】

30

【図6】図6は、ステーブルペプチド（この場合では、i, i+7ステーブルペプチド）を生成するために利用することができる例示的な閉環メタセシス（RCM）ステーブル化反応を示す。

【0060】

【図7】図7は、必須SARS-CoV-2タンパク質（PLpro）、ならびにSARS-CoV-2タンパク質に結合する宿主タンパク質（BRD4および／またはBRD2）を標的とするようにデザインされた2つのステーブルペプチドキメラの構造を示す：BRD4（JQ1/SP645 SP-PROTAC、上部）およびPLpro（GRL0617/SP645 SP-PROTAC、下部）。ステーブルペプチド（SP645（LTF（R8）EYWAQL（S5）SAA（配列番号1）））は、E3リガーゼであるHDM2に結合し、それを動員するために組み込まれ、小分子（JQ1またはGRL0617）は、標的タンパク質（それぞれ、BRD4またはPLpro）に結合するために含まれる。可変の長さおよび組成のリンカーは、タンパク質標的の最適な係合を確実にするために、キメラの2つの結合性成分の間に導入される。

40

【0061】

【図8】図8Aは、さまざまなHDM2 結合性ステーブルp53ペプチド（SAH-p53-1~4、それぞれ、配列番号40~43）のα-ヘリックス安定化のレベルを、野生型p53₁₄₋₂₉（配列番号11）と比較して示す。図8Bは、HDM2に対するさまざまなステーブルp53ペプチド（SAH-p53-1~4、配列番号40~43）の親和性を、野生型p53₁₄₋₂₉（配列番号11）と比較して示す。

50

【0062】

【図9】図9Aは、抗HIV治療薬エンフビルチド、単一ステープル化エンフビルチド、および二重ステープル化エンフビルチドの時間に対する崩壊のプロットを表し、プロテアーゼ耐性をペプチドに付与するステープルの能力を強調表示する。図9Bは、さまざまな分子およびキメラについて、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）によって評価される複合体の形成を決定するトレースを示す。BRD4に指向されるSP-PROTAC+HDM2（第5のトレース）は、複合体の形成を誘導したが、一方で、HDM2単独（上部のトレース）、BRD4単独（第2のトレース）、HDM2+BRD4（第3のトレース）、HDM2+BRD4+SP645+JQ1（第4のトレース）は誘導しなかった。

【0063】

【図10】図10Aは、ビヒクルで処置したHeLa細胞（上の段）とは異なり、SP-PROTAC-BRD4で処置した細胞は、サイトゾルから（拡散染色）からBRD4が実験的に係留している核ラミナへのHDM2の再局在化を呈する（下の段）ことを示す画像である。図10Bは、*in vitro*ユビキチン化アッセイによって決定される、ビヒクルまたはSP-PROTAC-PLproの存在下におけるPLproタンパク質およびユビキチン化PLproタンパク質のレベルのウェスタンブロットの画像である。

【0064】

【図11】図11Aは、さまざまな濃度のSP-PROTAC-BRD4に曝露したSJS A-1細胞におけるBRD4およびp53レベルのウェスタンブロットの画像である。アクチン抗体が、ローディング対照として使用されている。図11Bは、選択的プロテアソーム阻害剤カルフィルゾミブの存在下でさまざまな濃度のSP-PROTAC-BRD4に曝露したSJS A-1細胞におけるBRD4およびp53レベルのウェスタンブロットの画像である。アクチン抗体が、ローディング対照として使用されている。

【0065】

【図12】図12Aは、SP645単独で処置した細胞におけるBRDタンパク質（BRD2/3/4）およびp53転写標的HDM2のレベルを示す。図12Bは、JQ1単独で処置した細胞におけるBRDタンパク質（BRD2/3/4）およびp53転写標的HDM2のレベルを示す。図12Cは、SP-PROTAC-BRD4で処置した細胞におけるBRDタンパク質（BRD2/3/4）およびp53転写標的HDM2のレベルを示す。

【0066】

【図13】図13Aは、SP645、JQ1、またはSP-PROTAC-BRD4の存在下におけるSJS A-1細胞の生存度パーセンテージ（%）を示す。データは、平均±SEMを表し、それぞれの群について対で* $p < 0.05$ である。図13Bは、さまざまな濃度のSP-PROTAC-PLpro1の存在下におけるSARS-CoV-2を感染させたVero E6細胞のパーセンテージ（%）を示す。データは、平均±SEMを表し、最初の3つのバー対最後の2つのバーで* $p < 0.05$ である。

【0067】

【図14】図14Aは、感染した宿主細胞のMDM2によるウイルスNSP9の標的化された分解を誘導するようにデザインされた、2つのSP-PROTACS、SP-PROTAC-NSP9-1（配列番号54）およびSP-PROTAC-NSP9-2（配列番号55）の組成を示す。図14Bは、SP-PROTAC-NSP9-1およびSP-PROTAC-NSP9-2が、*in vitro*ユビキチン化アッセイによって示されるように、MDM2を動員して、ウイルス標的タンパク質USP9をユビキチン化することができることを示す。

【発明を実施するための形態】

【0068】

詳細な説明

本開示は、タンパク質分解標的化キメラ（PROTAC）、例えば、ステープルペプチドタンパク質分解標的化キメラ（SP-PROTAC）を使用して、ウイルスタンパク質

10

20

30

40

50

(例えば、ウイルス病原性にとって重要な必須ウイルスタンパク質)を分解することができるという発見に基づく。一部の場合では、これらのPROTACは、宿主細胞においてp53の上昇を同時に誘導して、ウイルス複製および病原性を妨げる。本開示は、E3ユビキチンリガーゼを、RNAウイルス(例えば、コロナウイルス)タンパク質標的に近接させ、分解を誘導する(例えば、治療目的で)分子を特徴とする。分解のためのウイルス標的は、任意のウイルスタンパク質(例えば、必須ウイルスタンパク質、例えば、コロナウイルスプロテアーゼもしくは他の非構造タンパク質(NSP))、またはウイルス病原性を促進する宿主タンパク質(例えば、プロモドメインおよびエクストラ末端ドメイン(BET)タンパク質)であり得る。一部の場合では、ウイルスタンパク質は、コロナウイルスパイン様プロテアーゼ(PLpro)、またはメインプロテアーゼ(Mpro)であり、コロナウイルスNSPは、NSP9またはNSP12である。ある特定の場合では、BETタンパク質は、プロモドメイン2(BRD2)、プロモドメイン3(BRD3)、またはプロモドメイン4(BRD4)である。他の場合では、宿主タンパク質は、Sec61、小胞体膜タンパク質トランスロコンである。

10

20

30

40

50

【0069】

本開示は、ウイルスタンパク質標的を標的とする(例えば、ウイルスタンパク質(例えば、必須ウイルスタンパク質)またはウイルス病原性を促進する宿主タンパク質に結合する)第1の部分、「タンパク質分解薬」であるかまたはそれを動員するタンパク質に結合する第2の部分(例えば、リガンド)と組み合わせることによって、タンパク質分解を誘導する部分としての機能を果たすキメラを提供する。例えば、第2の部分は、標的のユビキチン化を触媒する酵素または複合体を動員し、このようにして分解の標的を標識し、それが、プロテアソームによって分解される。一部の場合では、「タンパク質分解薬」は、ウイルスタンパク質をユビキチン化し、そうしてそれを分解の標的とするE3リガーゼである。

【0070】

第1の部分は、必須ウイルスタンパク質または宿主タンパク質に結合する、小分子、ウォーヘッドで誘導体化された小分子、ペプチド、ステープルペプチド、ウォーヘッドで誘導体化されたペプチドもしくはステープルペプチド、またはヌクレオチドアナログを含み得る。一部の場合では、第1の部分は、PLpro結合剤、例えば、GRL-0617もしくはそのPLpro結合性アナログ、ジスルフィラム、またはPLpro結合性チオプリンアナログである。他の場合では、第1の部分は、Mpro結合剤、例えば、ロピナビル、リトナビル、ダルナビル、ASC09、GC376、GC813、エブセレンカルボン酸、または配列番号2もしくは配列番号3に記載の配列に対して少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であるアミノ酸配列を含むペプチドである。一部の場合では、第1の部分は、NSP9結合剤、例えば、配列番号4または配列番号5に記載の配列に対して少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含むペプチドである。他の場合では、第1の部分は、NSP12結合剤、例えば、レムデシビル酸、ソホスブビル酸、またはこれらのアナログである。ある特定の場合では、第1の部分は、BETタンパク質結合剤、例えば、JQ1、ABBV-075、IBET151、IBET726、OTX015、もしくはPFI-1、またはこれらのアナログである。他の場合では、第1の部分は、Sec61タンパク質結合剤、例えば、PS3061またはそのアナログである。

【0071】

第2の部分は、E3ユビキチンリガーゼに結合するかもしくはそれを動員するリガンド(例えば、ペプチド、ステープルペプチド、または小分子)、またはE3ユビキチンリガーゼに対する基質アダプターであるWD40リピートタンパク質に結合するペプチドを含み得る。E3ユビキチンリガーゼは、ヒト二重微小染色体2(HDM2)、フォンヒッペルリндаウ(VHL)、セレブロン、X連鎖アポトーシス阻害タンパク質(XIAP)、

細胞アポトーシス阻害タンパク質（cIAP）、または構成的光形態形成1（COP1）であり得る。ある特定の場合では、HDM2結合性部分は、HDM2および／もしくはHDMXに結合するp53のトランス活性化ドメインのペプチドもしくはステープルペプチド、または小分子（例えば、ヌトリン-3aもしくはヌトリン-3aの誘導体、例えば、RG7112およびRG7388（イダサヌトリン（Idasanutlin）））もしくはそのHDM2結合性アナログを含み得る。一部の場合では、セレブロン結合性部分は、サリドマイド、ポマリドマイド、レナリドマイド、アバドマイド、またはそのセレブロン結合性アナログである。他の場合では、VHL結合性部分は、VH032またはそのVHL結合性アナログである。一部の場合では、XIAP結合性部分は、A410099.1またはそのXIAP結合性アナログである。ある特定の場合では、cIAP結合性部分は、SM-1295もしくはSM-1280、またはそのcIAP結合性アナログである。他の場合では、COP1結合性部分は、トリブルズシュードキナーゼ1（Trib1-UniProtKB - Q96RU8）に由来する8～50個のアミノ酸の配列のペプチドまたはステープルペプチドを含み得る。分解薬タンパク質に効果的に結合し、それを動員するペプチドまたは小分子を、必須ウイルスタンパク質またはウイルス病原性を補助する宿主タンパク質を標的とする小分子、ペプチド、またはヌクレオチドアナログと組み合わせることによって、この新規のクラスのデグロンキメラは、ウイルス感染症と闘う新規な化合物を提供する。一部の場合では、ウイルス感染症は、コロナウイルス感染症、例えば、SARS-CoV-2である。本開示はまた、記載されるデグロンキメラを含む医薬組成物も提供する。さらに、本開示は、記載されるそのようなキメラおよび組成物を使用して、ウイルス感染症を処置し、ウイルス複製を遮断し、ウイルス感染性を低減させる、方法を提供する。PLproはまた、宿主免疫系を回避するウイルス機序にも関与するため、本開示のキメラの重要な利点は、それらが、ウイルス複製の遮断および免疫系が感染細胞を殺滅させる能力の回復の両方を行うように設計されていることである。

10

20

30

40

50

【0072】

本開示に包含されるキメラの非限定的な例には、図7および14Aに示される分子のそれぞれが含まれる。

【0073】

I. 分解について標的化される第1のタンパク質

分解について標的化される第1のタンパク質は、ウイルス病原性において役割を果たす任意のタンパク質であり得る。一部の場合では、ウイルスタンパク質は、必須ウイルスタンパク質である。一部の場合では、分解について標的化されるタンパク質は、ウイルスのなんらかの活性を補助する宿主タンパク質である。

【0074】

I. (a) 必須ウイルスタンパク質

本開示のキメラにより標的化され得る必須ウイルスタンパク質には、ウイルスの複製および／または病原性、例えば、細胞へのウイルスの進入において役割を果たす任意のウイルスタンパク質が含まれる。一部の実施形態では、必須ウイルスタンパク質は、RNAウイルス、例えば、重症急性呼吸器症候群関連コロナウイルス2（SARS-CoV）、SARS-CoV2、中東呼吸器症候群関連コロナウイルス（MERS-CoV）に由来するウイルスタンパク質である。例えば、ウイルスタンパク質は、NSP、例えば、SARS-CoV2に由来するコロナウイルスプロテアーゼである。一部の実施形態では、コロナウイルスプロテアーゼは、PLproまたはMproである。一部の実施形態では、NSPは、NSP9またはNSP12である。他の実施形態では、必須ウイルスタンパク質は、RNAウイルス、例えば、C型肝炎ウイルス（HCV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、単純ヘルペスウイルス（HSV）、ジカウイルス、およびエンテロウイルスに由来するウイルスタンパク質である。

【0075】

I. (a) (1) コロナウイルスプロテアーゼ

本明細書において記載するコロナウイルスプロテアーゼとしては、メインプロテアーゼ

(Mpro) およびパイン様プロテアーゼ (PLpro) が挙げられ、これらは、コロナウイルスゲノムRNAの複製に必須であるレプリカーゼポリタンパク質をプロセッシングするために必要である。これらのコロナウイルスプロテアーゼは、広範なタンパク質分解プロセッシングによって、2つの翻訳されたウイルスポリタンパク質 (PP1AおよびPP1AB) を、協調された様式で個々の機能的構成要素に切断する (Chen Y. W. et al. F1000Research, 2020, 9:129)。

【0076】

SARS-CoV-2の主なタンパク質分解プロセッシング酵素として、Mproは、ウイルスの生活環に必須である成熟タンパク質 (NSP5-16) を生じる自己プロセッシングタンパク質分解反応において主要な役割を果たす (Chang, G. G. et al. Molecular Biology of the SARS-Coronavirus, 115-128 (2009))。ウイルス複製におけるMpro (3C様プロテアーゼ (3CLpro) としても知られる) の機能的重要性が、ヒトにおける緊密に関連する相同性の不在と組み合わせることにより、Mproは、抗ウイルス薬の設計のための有望な標的となっている。

10

【0077】

PLproは、ウイルスポリタンパク質およびウイルス複製に必要とされる宿主細胞タンパク質をプロセッシングする多官能性システインプロテアーゼである (Baez-Santos, Y. M., et al. J Virol 88, 12511-27 (2014))。PLproはまた、p53分解の促進 (Ma-Lauer, Y. et al. Proc Natl Acad Sci U S A 113, E5192-201 (2016)) および宿主免疫系の回避 (脱ユビキチン化および脱ISG化活性 (Ratia, K., et al. PLoS Pathog 10, e1004113 (2014)) のためのウイルス機序にも関与する。したがって、抗ウイルス薬でPLproを標的とすることは、ウイルス複製を阻害することだけでなく、周囲の未感染細胞において細胞死を引き起こし得る感染細胞におけるシグナル伝達カスケードの調節不全を阻害することにおいても、利点を有し得る。

20

【0078】

I. (a) (2) コロナウイルス非構造タンパク質

本明細書において記載するコロナウイルス非構造タンパク質 (NSP) は、本開示のキメラを使用して標的化され得る必須タンパク質である。これらの非構造タンパク質としては、コロナウイルスプロテアーゼ、NSP9およびNSP12が挙げられる。コロナウイルスの複製および転写は、レプリカーゼ遺伝子においてコードされる15個または16個のウイルスNSPによって駆動され、それらのいずれも、本開示のキメラによって標的化され得る。これらのNSPは、PP1aおよびPP1abレプリカーゼポリタンパク質の翻訳時または翻訳後プロセッシング中に産生される (te Velthuis, Aartjan JW. et al. Nucleic acids research 38, 1 (2010): 203-14)。複数サブユニットのコロナウイルスRNA合成機構は、NSPの複合体である (Kirchdoerfer, R. N., Ward, A. B. Nat Commun 10, 2342 (2019))。

30

40

【0079】

NSP9は、ウイルス複製複体の必須タンパク質である。その活性はまた、タンパク質-タンパク質相互作用モチーフGXXXG (配列番号8) を含むパラレルアルファヘリックスによって媒介されるその二量体化に依存する。NSP12は、RNA依存性RNAポリメラーゼ (RdRp) 活性を有する、コロナウイルスRNA複製複体の触媒サブユニットである。NSP12は、ウイルスRNA複製を遮断するすべてのウイルスポリメラーゼおよびヌクレオチドアナログに共通のアーキテクチャを有する。

【0080】

I. (a) (3) ウイルス病原性を促進する宿主タンパク質

本開示のキメラにより標的化され得るタンパク質の別の例は、ウイルス病原性において

50

役割を果たす宿主タンパク質であり得る。例えば、宿主タンパク質は、ヒトタンパク質、例えば、プロモドメインおよびエクストラ末端ドメイン（BET）タンパク質である。一部の実施形態では、BETタンパク質は、プロモドメイン2（BRD2）またはプロモドメイン4（BRD4）である。他の実施形態では、BETタンパク質は、プロモドメイン3（BRD3）である。

【0081】

II. キメラの第1の部分

本開示のキメラの第1の部分は、分解について標的化されるタンパク質（例えば、コロナウイルスプロテアーゼ）に結合する。第1の部分は、小分子、ウォーヘッドで誘導体化された小分子、ペプチド、ステーブルペプチド、ウォーヘッドで誘導体化されたペプチドもしくはステーブルペプチド、またはヌクレオチドアナログを含み得る。例えば、第1の部分は、ウイルスタンパク質（例えば、ウイルスの複製または病原性に必要とされる必須ウイルスタンパク質）を標的とし得る。一部の場合では、第1の部分は、ウイルス病原性を補助する宿主タンパク質を標的とし得る。第1の部分は、分解について標的化されるタンパク質に結合することができるが、それ自体は、必ずしもなんらかの阻害作用またはアゴニスト作用を有するわけではない「分子グルー」として、完全にまたは部分的に作用し得る。

【0082】

一部の実施形態では、第1の部分は、Mpro結合剤、例えば、Mpro阻害剤であるか、またはそれを含む。他の実施形態では、第1の部分は、PLpro結合剤、例えば、PLpro阻害剤であるか、またはそれを含む。ある特定の実施形態では、第1の部分は、NSP結合剤、例えば、NSP阻害剤（例えば、NSP9またはNSP12阻害剤）であるか、またはそれを含む。他の実施形態では、第1の部分は、BET結合剤、例えば、BRD阻害剤（例えば、BRD2、BRD3、またはBRD4阻害剤）であるか、またはそれを含む。

【0083】

II. (a) Mpro結合剤

本開示によって包含されるMpro結合剤としては、Mproと直接的に相互作用する薬剤、例えば、Mpro阻害剤が挙げられる。Mpro阻害剤は、Mpro二量体化および／またはMpro酵素活性を阻害し得る。Mpro阻害剤、例えば、Jin Z et al. Nature 2020 582:289-293、Zumla A et al. Nat. Rev. Drug Disc. 2016 (10):327、Li G and Clercq ED. Nature Rev. Drug Disc., Feb 2020、Ghosh A. K. et al., ChemMedChem 2020 15 (11): 907-932に記載されているものを、本開示において使用することができる。

【0084】

一部の実施形態では、Mpro結合剤は、ペプチド（例えば、組換えまたは合成により産生されたペプチド）である。そのようなペプチドは、ペプチドが本明細書に記載するようにMproと相互作用する限り、非架橋であっても、ステーブル化されていても、ステッチ化されていてもよい。Mproの酵素活性は、アルファヘリックス配列TVNVLAWLYAAVINGD（配列番号9）によって媒介されるホモ二量体を形成することに依存する。配列番号9は、ペプチドをベースとした二量体化阻害剤を作製するために使用することができる。一部の場合では、Mpro結合剤ペプチドは、少なくとも6個（例えば、配列番号9の7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、または16個の連続したアミノ酸）を含み得る。一部の場合では、Mpro結合剤ペプチドは、例えば、配列番号9とは、1個、2個、3個、4個、5個、または6個のアミノ酸置換、欠失、および／または挿入によって異なる、配列番号9のバリエーションであってもよく、ここで、バリエーションは、依然としてMproと二量体を形成することができる。

【0085】

一部の実施形態では、M p r o 結合剤ペプチドは、例えば、配列番号 2 または 3 のアミノ酸配列を含み得るか、それからなり得るか、またはそれから本質的になり得る。一部の実施形態では、ペプチドは、例えば、配列番号 2 または 3 のアミノ酸配列の一部分または複数の部分と関連するか、またはそれに対して同一性を有する、アミノ酸配列を含み得るか、それからなり得るか、またはそれから本質的になり得る。

【0086】

一部の場合では、ペプチドは、配列番号 2 または 3 におけるアミノ酸に対して、少なくとももしくは約 30 %、少なくとももしくは約 40 %、少なくとももしくは約 50 %、少なくとももしくは約 60 %、少なくともしくは約 70 %、少なくともしくは約 75 % の同一性、少なくともしくは約 80 %、少なくとも 85 %、少なくともしくは約 90 %、少なくともしくは約 95 %、少なくともしくは約 98 %、少なくともしくは約 99 %、または 100 % の同一性を有し得、ここで、ペプチドは、M p r o に結合する。あるいは、またはさらに、ペプチドは、保存的であるかどうかにかかわらず、アミノ酸置換および／または欠失を含み得る。例えば、ペプチドは、保存的であるかどうかにかかわらず、0 個、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個未満、5 個未満、4 個未満、3 個未満、または 2 個未満のアミノ酸置換、欠失、および／または付加を含み得るが、ただし、ペプチドが依然として M p r o に結合することができることを条件とする。したがって、本明細書において開示される M p r o 結合性ペプチドのうちのいずれかのアミノ酸配列も、バリエーションペプチドが M p r o に結合する限り、変動し得る。

10

20

【0087】

ある特定の実施形態では、ペプチドは、それらが、1～4 個（例えば、1 個、2 個、3 個、4 個）のアミノ酸置換を有することで配列番号 2 または 3 から変動しているという点で、配列番号 2 または 3 のペプチドとは異なる。例えば、「X」とラベル付けされた位置は、配列番号 2 または 3 において、以下のように置換され得る：A T X N V L X W L Y X A V I X G D（配列番号 51）。X は、保存的アミノ酸残基であってもよく、または非保存的アミノ酸残基であってもよい。一部の場合では、それぞれの X は、オレフィン側鎖を有する非天然アミノ酸である（例えば、S5）。

【0088】

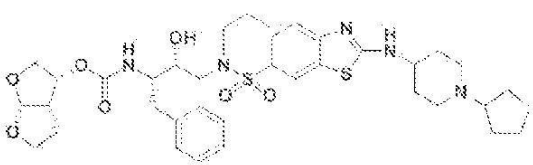
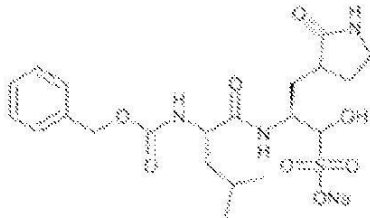
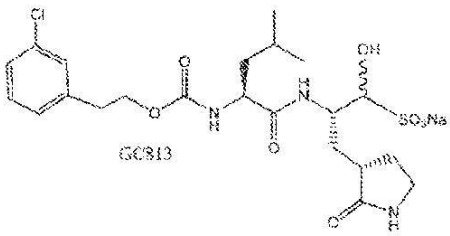
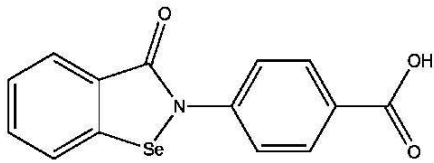
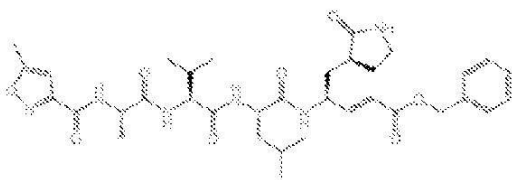
本明細書に記載するキメラにおいて利用することができる例示的な M p r o 結合剤は、以下に提供される構造を有する。

30

40

50

【表 1 - 2】

Mpro結合剤	構造
ASC09 (HIVプロテアーゼ阻害剤)	
GC376 (ANIV-19)	
GC813	
エブセレンカルボン酸	
N3	

10

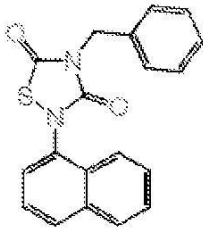
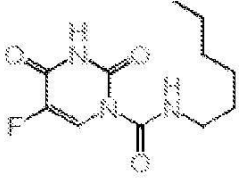
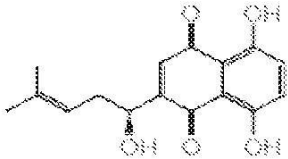
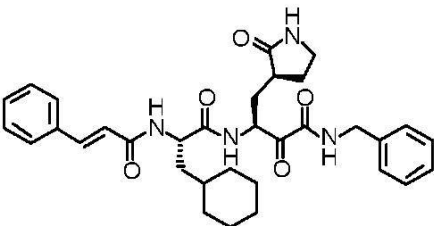
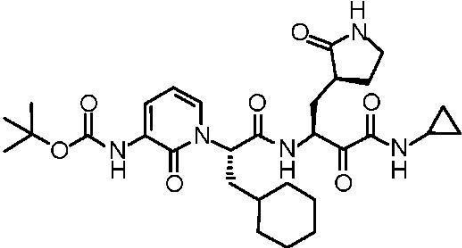
20

30

40

50

【表 1 - 3】

Mpro結合剤	構造
チデグルシブ	
カルモフル	
シコノン(Shikonon)	
α -ケトアミド阻害剤 11r	
α -ケトアミド阻害剤 13a	

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

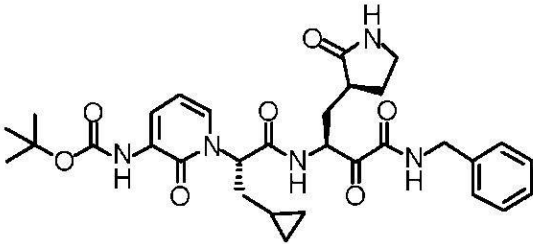
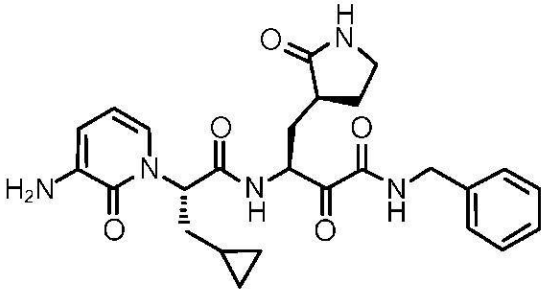
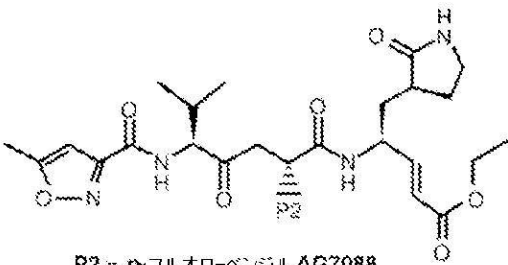
Mpro結合剤	構造
α -ケトアミド阻害剤 13b	
α -ケトアミド阻害剤 14b	
AG7088	 <p>P2 = <i>p</i>-フルオロベンジル AG7088</p>

表 1 に示される M p r o 結合剤またはそれらの M p r o 結合性アナログのいずれかを、本開示のキメラにおいて利用することができる。

【0089】

II. (b) P L p r o 結合剤

本開示によって包含される P L p r o 結合剤としては、P L p r o と直接的に相互作用する薬剤、例えば、P L p r o 阻害剤が挙げられる。P L p r o 阻害剤は、P L p r o 酵素活性を阻害することができる。P L p r o 阻害剤、例えば、Baez-Santos, Y. M., et al. J Virol 88, 12511-27 (2014)、Li G and Clercq ED. Nature Rev. Drug Disc., Feb 2020、Ghosh, A. K. et al. J Med Chem 52, 5228-40 (2009)、Baez-Santos, Y. M., et al. Antiviral Res 115, 21-38 (2015)、Elfi ky A and Ibrahim NS. Biophysics Feb 11, 2020、article/rs-13849/v1 DOI: 10.21203/rs.2.23280/v1、Lin MH, et al. Antiviral Res. 2018; 150: 155-163 に記載されるものを、本開示のキメラにおいて使用することができる。

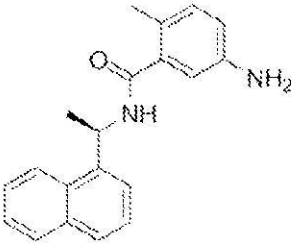
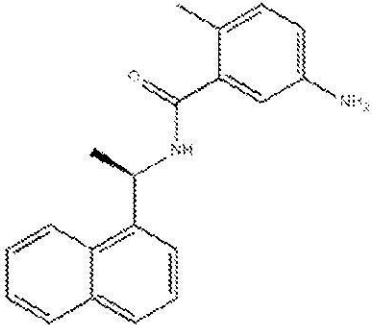
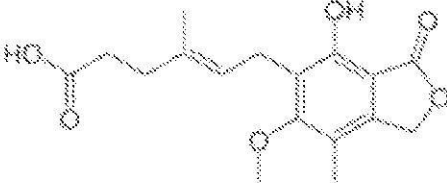
【0090】

本明細書に記載するキメラにおいて利用することができる例示的な P L p r o 結合剤は

、以下に提供される構造を有する。

【表 2 - 1】

表2: PLpro結合剤およびそれらの構造

PLpro結合剤	構造
GRL-0617	5- アミノ-2-メチル-N-[(1R)-1-ナフタレン-1-イルエチル] ベンズアミド 
GRL-0667	5- アミノ-2-メチル-N-[(1R)-1-ナフタレン-1-イルエチル] ベンズアミド 
ミコフェノール酸	

10

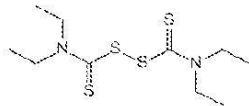
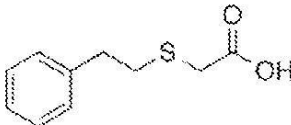
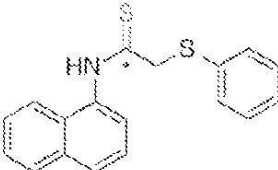
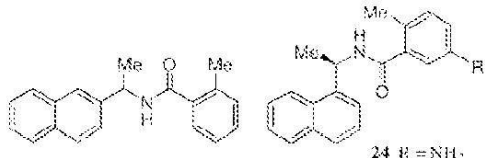
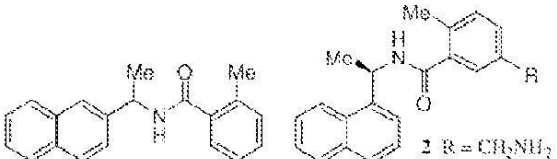
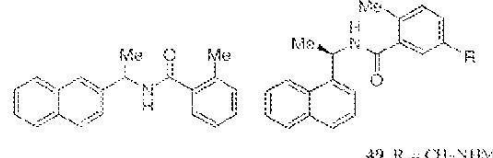
20

30

40

50

【表 2 - 2】

PLpro結合剤	構造
ジスルフィラム	テトラエチルチウラムジスルフィド 
NSC158362	2-(フェネチルチオ)酢酸 
NSC158011	N-(1-ナフチル)-2-(フェニルチオ)エタンチオアミド 
阻害剤24	 24 R = NH ₂
阻害剤2	 2 R = CH ₂ NH ₂
阻害剤49	 49 R = CH ₂ NHMe
6メルカプトプリン (6MP, Purinethol, Purinax)	

10

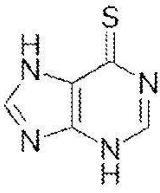
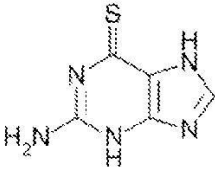
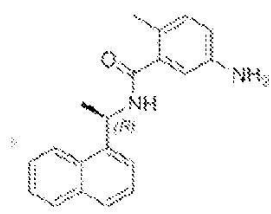
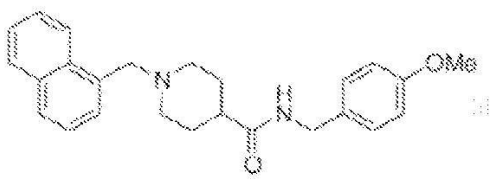
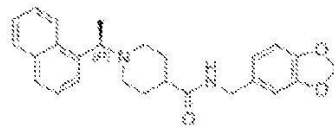
20

30

40

50

【表 2 - 3】

PLpro結合剤	構造
	
6 チオグアニン (チオグアニン, 6TG, Lanvis, Tabloid)	
化合物 7724772	
化合物 24	
化合物 6577871	
化合物 15g	

10

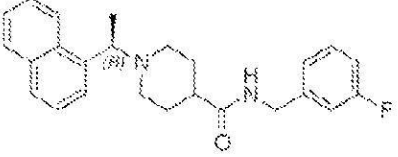
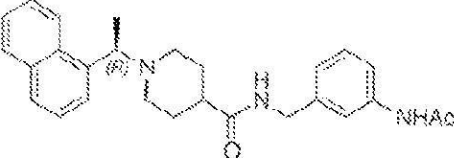
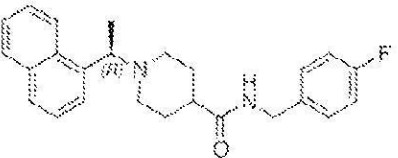
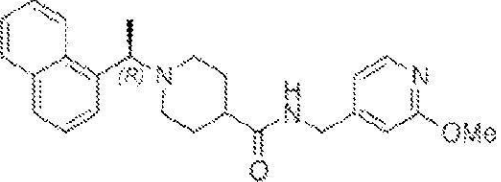
20

30

40

50

【表 2 - 4】

PLpro結合剤	構造
化合物 3k	
化合物 3e	
化合物 3j	
化合物 5c	

10

20

【0091】

表 2 に示される PLpro 結合剤またはそれらの PLpro 結合性アナログのいずれかを、本開示のキメラにおいて利用することができる。

【0092】

30

II. (c) NSP9 結合剤

本開示の NSP9 結合剤は、NSP9 と直接的に相互作用することができる薬剤である。NSP9 結合剤は、NSP9 二量体化および／または NSP9 酵素活性を抑制する、NSP9 阻害剤であり得る。一部の実施形態では、NSP9 結合剤は、ペプチド（例えば、組換えまたは合成により産生されたペプチド）である。そのようなペプチドは、ペプチドが本明細書に記載するように NSP9 と相互作用する限り、非架橋であっても、ステープル化されていても、ステッチ化されていてもよい。NSP9 の酵素活性は、アルファヘリックス配列 NLNRGMVLGSLAATVRLQ（配列番号 10）によって媒介されるホモ二量体を形成することに依存する。配列番号 10 は、ペプチドをベースとした二量体化結合剤を作製するために使用することができる。一部の 경우에는、NSP9 結合剤ペプチドは、少なくとも 6 個（例えば、配列番号 10 の 7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個、16 個、17 個、または 18 個の連続したアミノ酸）を含み得る。一部の 경우에는、NSP9 結合剤ペプチドは、バリエーションペプチドが依然として NSP9 に結合する限り、配列番号 10 において少なくとも 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、または 8 個のアミノ酸置換または欠失を含み得る。一部の 경우에는、NSP9 結合剤ペプチドは、配列 GXXXG（配列番号 8）を含み、ここで、それぞれの X は、任意のアミノ酸であり得る。一部の 경우에는、X は、任意の 1 つの M、ノルロイシン（B）、V、L、A、G、または I である。

40

【0093】

一部の実施形態では、NSP9 阻害剤ペプチドは、例えば、配列番号 4 または 5 のアミ

50

ノ酸配列を含み得るか、それからなり得るか、またはそれから本質的になり得る。一部の実施形態では、ペプチドは、例えば、配列番号 4 または 5 のアミノ酸配列の一部分または複数の部分と関連するか、またはそれに対して同一性を有する、アミノ酸配列を含み得る。

【0094】

一部の場合では、ペプチドは、配列番号 4 または 5 におけるアミノ酸に対して、少なくとももしくは約 30 %、少なくとももしくは約 40 %、少なくともしくは約 50 %、少なくともしくは約 60 %、少なくともしくは約 70 %、少なくともしくは約 80 %、少なくともしくは約 85 %、少なくともしくは約 90 %、少なくともしくは約 95 %、少なくともしくは約 98 %、少なくともしくは約 99 %、または 100 % の同一性を有し得、ここで、ペプチドは、NSP9 に結合する。あるいは、またはさらに、ペプチドは、保存的であるかどうかにかかわらず、アミノ酸置換および／または欠失を含み得る。例えば、アミノ酸は、保存的であるかどうかにかかわらず、0 個、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、10 個未満、5 個未満、4 個未満、3 個未満、または 2 個未満のアミノ酸置換、欠失、および／または付加を含み得る。したがって、本明細書において開示される任意の NSP9 結合性ペプチドのアミノ酸配列は、バリエーションペプチドが依然として NSP9 に結合する限り、変動し得る。一部の場合では、配列番号 4 もしくは 5 の NSP9 結合剤ペプチドまたはそれらのバリエーションは、配列のそれぞれの末端において、1 個、2 個、または 3 個のアミノ酸だけ短縮されていてもよい。他の場合では、配列番号 4 もしくは 5 の NSP9 結合剤ペプチドまたはそれらのバリエーションは、ステープルを含まなくてもよく、1 つのステープル（例えば、R8 と S5 との間に形成されるステープル）を含んでもよく、または二重ステープル化されていてもよい。

10

20

【0095】

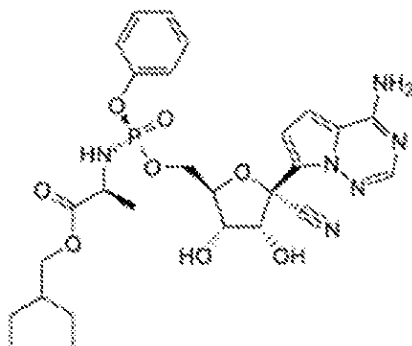
II. (d) NSP12 結合剤

本開示の NSP12 結合剤は、NSP12 と直接的に相互作用する薬剤を含む。NSP12 結合剤は、NSP12 酵素活性を抑制する、NSP12 阻害剤であり得る。一部の実施形態では、NSP12 阻害剤は、レムデシビルまたはソホスブビルアナログ（例えば、レムデシビル酸またはソホスブビルカルボン酸、またはその薬学的に許容される塩）である。

【0096】

レムデシビルの構造は、以下の通りである。

【化 8】

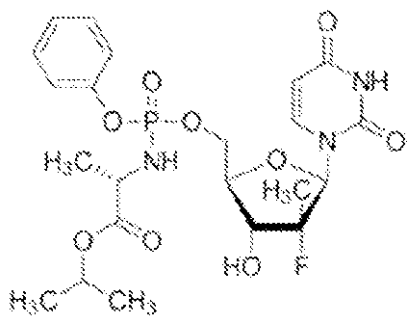


40

ソホスブビルの構造は、以下の通りである。

50

【化 9】



10

【 0 0 9 7 】

I I . (e) B E T 結 合 剤

本開示のBET結合剤には、BETタンパク質、例えば、プロモドメイン2（BRD2）、BRD3、および／またはBRD4と直接的に相互作用する薬剤が含まれる。BETタンパク質結合剤は、BET酵素活性を抑制する、BETタンパク質阻害剤であり得る。一部の実施形態では、本明細書に記載するキメラにおいて利用することができるBET阻害剤は、以下に提供される構造を有する。

20

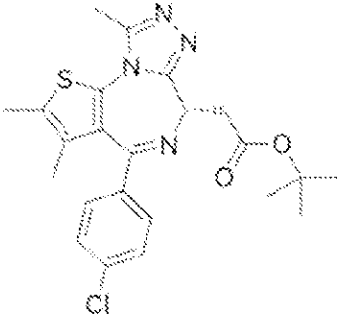
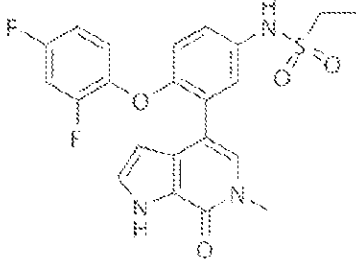
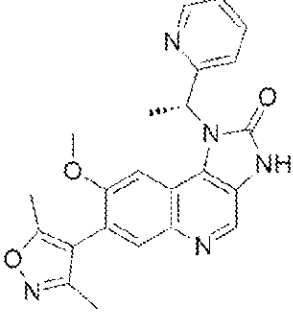
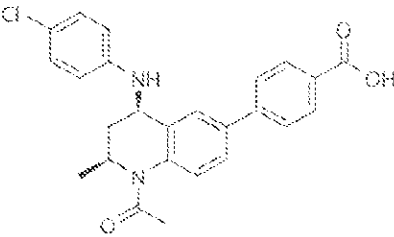
30

40

50

【表 3－1】

表3: BETタンパク質阻害剤およびそれらの構造

BETタンパク質阻害剤	構造
JQ1	
ABBV-075 (ミベプレシブ)	
I-BET151	
I-BET726	

10

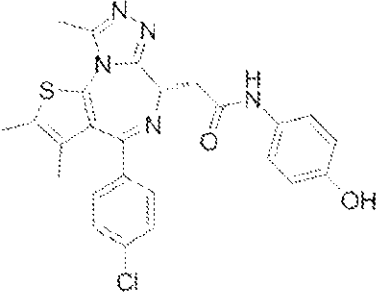
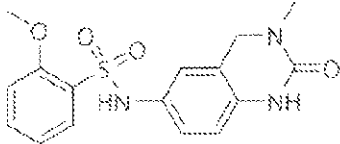
20

30

40

50

【表 3 - 2】

BETタンパク質阻害剤	構造
OTX015 (ビラプレシブ)	
PFI-1	

10

20

【0098】

表3に示されるBET阻害剤またはそれらのBET阻害アナログのいずれかを、本開示のキメラにおいて利用することができる。

【0099】

III. キメラによって標的化される第2のタンパク質

本開示のキメラにより標的化される第2のタンパク質は、標的化される第1のタンパク質（例えば、コロナウイルスプロテアーゼ、コロナウイルスNSP、またはBETタンパク質）を分解するタンパク質分解薬であるか、またはそれを動員する。ある特定の実施形態では、第2のタンパク質は、分解薬タンパク質、例えば、E3ユビキチンリガーゼまたはE3ユビキチンリガーゼに対する基質アダプターである。ある特定の実施形態では、第2のタンパク質はE3ユビキチンリガーゼである。E3ユビキチンリガーゼの非限定的な例としては、ヒト二重微小染色体2（HDM2）、フォンヒッペルリンドウ（VHL）、セレブロン、X連鎖アポトーシス阻害タンパク質（XIAP）、細胞アポトーシス阻害タンパク質（cIAP）、または構成的光形態形成1（COP1）が挙げられる。

30

【0100】

IV. キメラの第2の部分

本開示のキメラの第2の部分は、標的タンパク質（例えば、コロナウイルスプロテアーゼ、コロナウイルスNSP、またはBETタンパク質）を分解する「タンパク質分解薬」（例えば、E3ユビキチンリガーゼ）であるか、またはそれを動員する、タンパク質に結合する。一部の実施形態では、第2の部分は、標的のユビキチン化を触媒する酵素または複合体を動員し得る。「タンパク質分解薬」の例は、標的タンパク質をユビキチン化し、それによって、そのタンパク質を、プロテアソームによる分解の標的として標識する、E3リガーゼである。

40

【0101】

第2の部分は、ペプチド、ステーブルペプチド、または小分子であり得る。一部の実施形態では、第2の部分は、セレブロン結合性部分、VHL結合性部分、HDM2結合性部分、XIAP結合性部分、cIAP結合性部分、またはCOP1結合性部分であるか、またはそれを含む。

50

【 0 1 0 2 】

I V . (a) セレブロン結合性部分

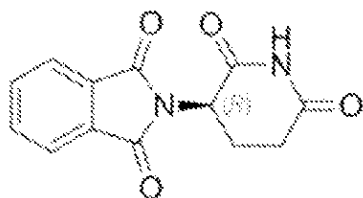
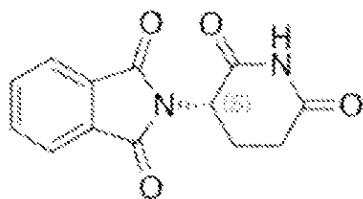
本開示のキメラの第 2 の部分は、小分子であるか、またはそれを含む、セレブロン結合性部分であり得る。セレブロンに結合する小分子の非限定的な例としては、サリドマイド、ボマリドマイド、レナリドマイド、アバドマイド、それらのアナログ、およびそれらの薬学的に許容される塩が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 1 0 3 】

セレブロンに結合することができる小分子は、以下の構造を有する。

【 化 1 0 - 1 】

サリドマイド:



10

20

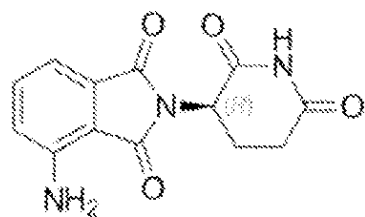
30

40

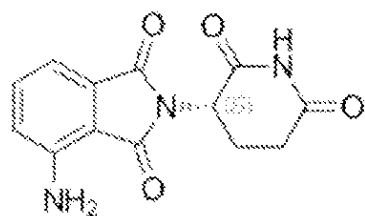
50

【化 1 0 - 2】

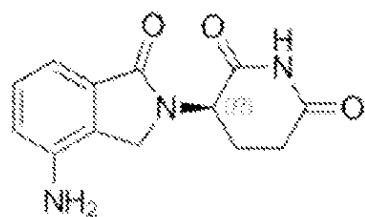
ポマリドマイド:



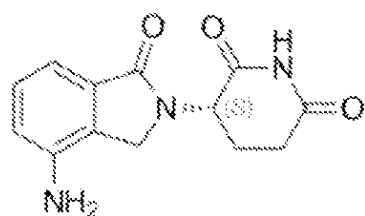
10



レナリドマイド:

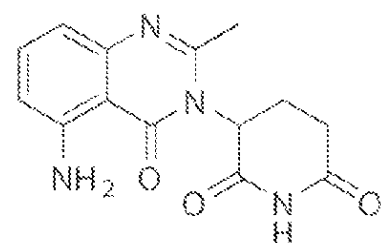


20



30

アバドマイド:



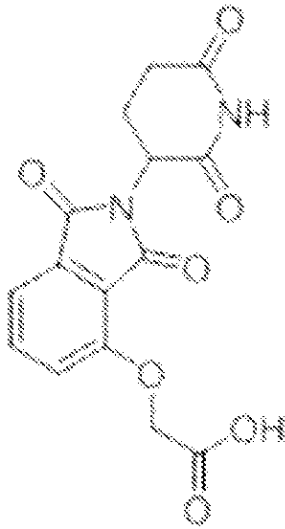
40

【 0 1 0 4】

一実施形態では、セレブロンに結合する小分子は、以下に提供される構造を有するサリドマイドに基づいている。

50

【化 1 1】



10

【0105】

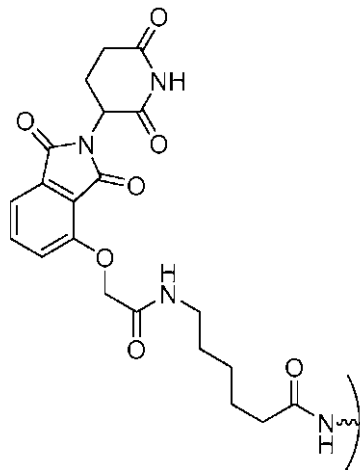
一部の実施形態では、セレブロン結合性部分は、第1のタンパク質を標的とするステープルペプチドのN末端にコンジュゲートしている。一部の 경우에는、セレブロン部分は、第1のタンパク質を標的とするステープルペプチドのC末端にコンジュゲートしている。ある特定の 경우에는、セレブロン部分は、第1のタンパク質を標的とするステープルペプチドのN末端とC末端との間のペプチド配列中に挿入された非天然アミノ酸内に含まれる。

20

【0106】

一部の 경우에는、セレブロンに結合する小分子（サリドマイド）は、第1のタンパク質を標的とする部分（例えば、ペプチド）のN末端にコンジュゲートしていてもよい。小分子（サリドマイド）が、ペプチドのN末端にコンジュゲートしている場合、それは、以下に示す構造を有する。

【化 1 2】



30

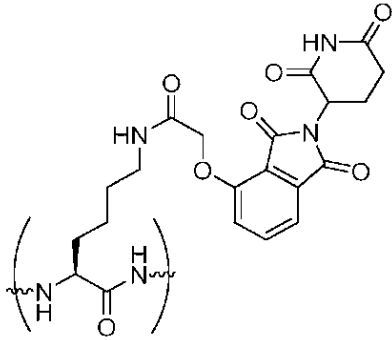
40

【0107】

ある特定の 경우에는、小分子（サリドマイド）が、第1のタンパク質を標的とするペプチドのC末端にコンジュゲートしている場合、それは、以下に示す構造を有する。

50

【化 1 3】



10

【0108】

ある特定の場合では、セレブロン結合性部分は、第1のタンパク質を標的とするステープルペプチドのN末端とC末端との間のペプチド配列中に挿入された非天然アミノ酸内に含まれる。

【0109】

I V. (b) V H L 結合性部分

本開示のキメラの第2の部分は、小分子であるか、またはそれを含む、V H L 結合性部分であり得る。V H L に結合する小分子の非限定的な例としては、V H 032 およびそのV H L 結合性アナログが挙げられるが、これらに限定されない。

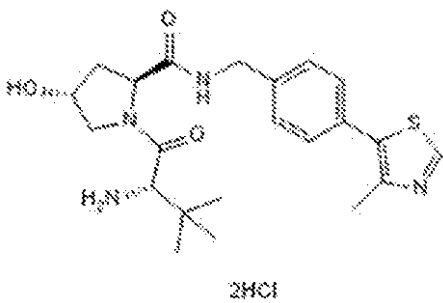
20

【0110】

V H L に結合することができる小分子は、以下の構造を有する。

V H 032 :

【化 1 4】

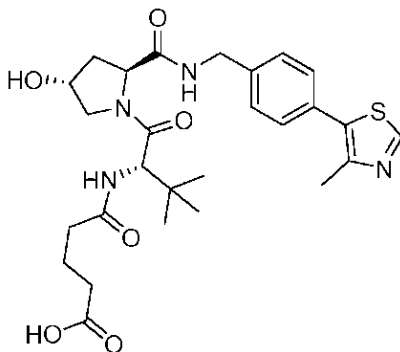


30

【0111】

一部の場合では、V H L 部分が、アミンにコンジュゲートしている場合、以下に示すカルボキシレートアナログが用いられる。

【化 1 5】



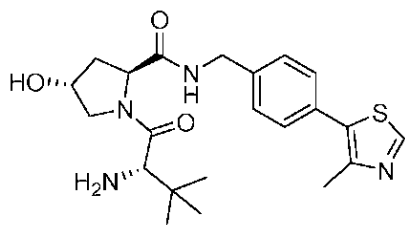
40

【0112】

一部の場合では、V H L 部分は、以下の構造（酸性残基へのカップリングに適合する）を含む。

50

【化 1 6】



【 0 1 1 3】

一部の実施形態では、VHL 結合性部分は、第 1 のタンパク質を標的とするステーブルペプチドの N 末端にコンジュゲートしている。一部の場合では、VHL 部分は、第 1 のタンパク質を標的とするステーブルペプチドの C 末端にコンジュゲートしている。ある特定の場合では、VHL 部分は、第 1 のタンパク質を標的とするステーブルペプチドの N 末端と C 末端との間のペプチド配列中に挿入された非天然アミノ酸内に含まれる。

ある特定の場合では、VHL 結合性部分は、以下に挙げられるペプチドのアミノ酸配列を有するペプチド、またはその VHL 結合性バリエーションである：

L A P A A G D T I I S L D F (配列番号 1 2) - E 3 リガーゼ：VHL、

L A P Y I P M D D D F Q L (配列番号 1 3) - E 3 リガーゼ：VHL。

【 0 1 1 4】

バリエーションは、例えば、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、または 6 個のアミノ酸位置において（例えば、別のアミノ酸との置換、挿入、または欠失によって）配列番号 1 2 または 1 3 とは異なり得るが、ただし、それが依然として VHL に結合することを条件とする。

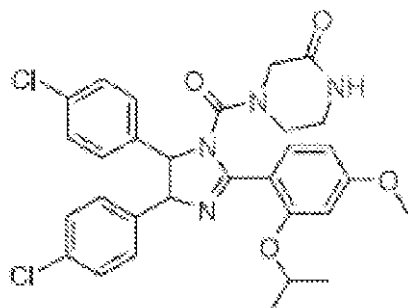
【 0 1 1 5】

I V. (c) HDM 2 結合性部分

本開示のキメラの第 2 の部分は、HDM 2 および／または HDM X に結合する p 5 3 のトランス活性化ドメインの小分子、ペプチドもしくはステーブルペプチド、または他の方法で化学的に安定化されたペプチド（例えば、ステッチ化されている）であるか、またはそれを含む、HDM 2 結合性部分であり得る。HDM 2 に結合する小分子の非限定的な例としては、ヌトリン-3、ヌトリン-3 a、ヌトリン-3 a 誘導体、例えば、R G 7 1 1 2 および R G 7 3 8 8 (イダサヌトリン)、ならびにそれらの HDM 2 結合性アナログが挙げられるが、これらに限定されない。

ヌトリン-3 a は、以下の構造を有する。

【化 1 7】



R G 7 1 1 2 は、以下の構造を有する。

10

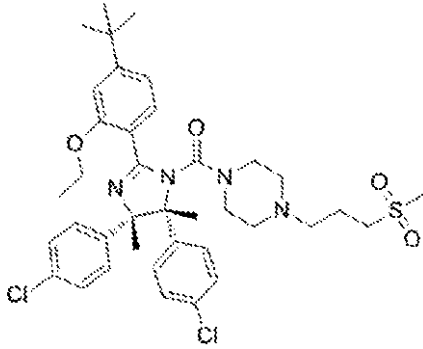
20

30

40

50

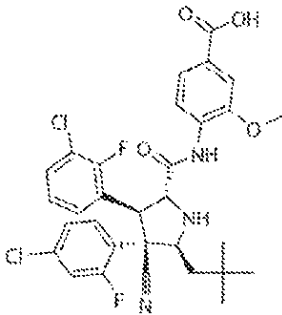
【化 18】



10

R G 7 3 8 8 は、以下の構造を有する。

【化 19】



20

【0116】

ある特定の実施形態では、HDM2 結合性部分は、当該技術分野において公知の p 5 3 ペプチドまたはステーブル p 5 3 ペプチド（例えば、p 5 3 のトランス活性化ドメイン（LSQETFSDLWKLLPEN（配列番号 11）を含むペプチド）、HDM2 に結合するそのバリエーション、またはそのステーブル化バージョン）である。ある特定の場
合では、HDM2 結合性部分は、HDMX と HDM2 との間の複合体に直接的に結合し、それを
動員する、安定化またはステーブル p 5 3 ペプチドである。一部の実施形態では、ステー
ブル p 5 3 ペプチドは、HDMX に結合することができ、HDMX / HDM2 複合体を動
員することができる。ある特定の実施形態では、ステーブル p 5 3 ペプチドは、直接的
または間接的に、HDM2 に結合するか、または HDM2 に結合する HDMX に結合する。

30

【0117】

一部の場合では、本開示の HDM2 結合性ステーブルペプチドは、残基（R 5）、（R
8）、（S 5）、および（S 8）を有する。そのような配列（例えば、配列番号 1、7、
および 40～47）において、「R」および「S」は、非天然アミノ酸の立体化学を指し
、一方で「5」および「8」は、非天然アミノ酸のオレフィン側鎖における炭素残基の
数を指す。したがって、「（R 5）」は、（R）-2-（4'-ペンテニル）アラニン〔（
R）-α-（4'-ペンテニル）アラニンとしても知られる〕であり、「（R 8）」は、
（R）-2-（7'-オクテニル）アラニン〔（R）-α-（7'-オクテニル）アラニン 40
としても知られる〕であり、「（S 5）」は、（S）-2-（4'-ペンテニル）アラニ
ン〔（S）-α-（4'-ペンテニル）アラニンとしても知られる〕であり、「（S 8）」
は、（S）-2-（7'-オクテニル）アラニン〔（S）-α-（7'-オクテニル）ア
ラニンとしても知られる〕である。一部の場合では、配列番号 1、7、および 40～47
は、（R 8）が（R 5）で置き換えられ、同時に、（S 5）が（S 8）で置き換えられ
るように、変動し得る。そのようなバリエーション HDM2 結合性ステーブルペプチドは、本開
示に包含される。配列番号 1、7、および 40～47 のこれらのバリエーションは、HDM2
に結合する能力を保持する。例えば、配列番号 1 のバリエーション配列は、配列番号 49 で
あり、配列番号 7 のバリエーション配列は、配列番号 50 である。

【0118】

50

本開示のキメラにおいて使用され得るステープル p 5 3 ペプチドの非限定的な例を、以下に列挙する。

L T F (R 8) E Y W A Q L (S 5) S A A (配列番号 1) - S P 6 4 5

L T F (R 8) E Y W A Q # (S 5) S A A (配列番号 7) - A T S P - 7 0 4 1、# はシクロブチルアラニンである

L T F (R 5) E Y W A Q L (S 8) S A A (配列番号 4 9) - S P 6 4 5 バリエーション配列 2

L T F (R 5) E Y W A Q # (S 8) S A A (配列番号 5 0) - A T S P - 7 0 4 1 バリエーション配列

L S Q E T F S D (R 8) W K L L P E (S 5) (配列番号 4 0) - S A H - p 5 3 - 1

L S Q E (R 8) F S D L W K (S 5) L P E N (配列番号 4 1) - S A H - p 5 3 - 2

L S Q (R 8) T F S D L W (S 5) L L P E N (配列番号 4 2) - S A H - p 5 3 - 3

L S Q E T F (R 8) D L W K L L (S 5) E N (配列番号 4 3) - S A H - p 5 3 - 4

L S Q E T F (R 8) N L W K L L (S 5) Q N (配列番号 4 4) - S A H - p 5 3 - 5

L S Q Q T F (R 8) N L W R L L (S 5) Q N (配列番号 4 5) - S A H - p 5 3 - 6

Q S Q Q T F (R 8) N L W K L L (S 5) Q N (配列番号 4 6) - S A H - p 5 3 - 7

Q S Q Q T F (R 8) N L W R L L (S 5) Q N (配列番号 4 7) - S A H - p 5 3 - 8

【 0 1 1 9 】

H D M 2 および／または H D M X に結合し、本開示のキメラにおいて使用することができる、ステープル p 5 3 ペプチドおよび他のペプチドの他の例としては、A L R N - 6 9 2 4、ならびに米国特許第 1 0, 2 0 2, 4 3 1 号、同第 9, 6 1 7, 3 0 9 号、同第 9, 5 5 6, 2 2 7 号、同第 9, 5 2 7, 8 9 6 号、同第 9, 5 1 7, 2 5 2 号、同第 9, 5 0 5, 8 0 4 号、同第 9, 5 0 5, 8 0 1 号、同第 9, 4 0 8, 8 8 5 号、同第 9, 1 7 5, 0 4 5 号、同第 9, 1 6 3, 3 3 0 号、同第 8, 9 2 7, 5 0 0 号、同第 8, 8 8 9, 6 3 2 号、同第 8, 5 9 2, 3 7 7 号、同第 8, 5 8 6, 7 0 7 号、米国特許出願公開第 U S 2 0 1 4 0 0 1 8 3 0 2 号、同第 U S 2 0 1 5 0 2 4 6 9 4 6 号、同第 2 0 1 7 0 2 1 2 1 2 5 号、同第 U S 2 0 1 8 0 0 3 0 0 9 0 号、同第 2 0 1 9 0 0 7 6 5 0 4 号、国際特許出願第 W O 2 0 0 8 1 0 6 5 0 7 号、同第 W O 2 0 1 4 0 6 5 7 6 0 号、および欧州特許出願第 E P 2 9 1 2 4 6 3 号に提供されるステープルまたはステッチ p 5 3 ペプチドが挙げられるがこれらに限定されず、これらの文献のすべての内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 1 2 0 】

一部の 경우에는、依然として H D M 2 および／または H D M X に結合する配列番号 1、7、4 0 ~ 4 7、および 4 9 ~ 5 0 のうちのいずれか 1 つのバリエーションは、本開示によって包含される。これらのバリエーションは、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、または 6 個のアミノ酸位置において（例えば、異なるアミノ酸との置換、挿入、または欠失によって）配列番号 1、7、4 0 ~ 4 7、および 4 9 ~ 5 0 のうちのいずれか 1 つとは異なり得、ここで、バリエーションは、H D M 2 に結合するその能力を保持する。1 つの例では、配列番号 1 または 7 におけるトリプトファン（「W」）残基は、3 - （2 - ナフチル） - L - アラニンによって置換され得る。ある特定の実施形態では、バリエーションは、1 ~ 6 個（例えば、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個）のアミノ酸置換を有することで配列番号 1 または 7 から変動しているという点で、配列番号 1 または 7 のペプチドとは異なる。例えば、X₁、X₂、X₃、X₄、および X₅ とラベル付けされている残基は、配列番号 1 または 7 において、以下のように置換され得る：X₁ T F (R 8) X₂ Y X₃ A Q X₄ (S 5) X₅ A A (配列番号 4 8)、ここで、X₁、X₂、および X₅ は、任意のアミノ酸（例えば、A、W、F、L、V、I、ナフチルアラニン、E、D、Y、シクロブチルアラニン、およびそれらの側鎖アナログ）であり、X₃ は、W、F、または 3 - （2 - ナフチル） - L - アラニンであり、X₄ は、L またはロイシン模倣体（例えば、シクロブチルアラニン）である。

【 0 1 2 1 】

一部の場合では、ペプチドは、配列番号 1 または 7 におけるアミノ酸に対して、少なくとももしくは約 30 %、少なくとももしくは約 40 %、少なくともしくは約 50 %、少なくともしくは約 60 %、少なくともしくは約 70 %、少なくともしくは約 75 % の同一性、少なくともしくは約 80 %、少なくともしくは約 85 %、少なくともしくは約 90 %、少なくともしくは約 95 %、少なくともしくは約 98 %、少なくともしくは約 99 %、または 100 % の同一性を有し得、ここで、ペプチドは、HDM2 および／または HDMX に結合する。あるいは、またはさらに、ペプチドは、保存的であるかどうかにかかわらず、アミノ酸置換および／または欠失を含み得る。例えば、ペプチドは、保存的であるかどうかにかかわらず、0 個、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、6 個未満、5 個未満、4 個未満、3 個未満、または 2 個未満のアミノ酸置換、欠失、および／または付加を含み得るが、ただし、ペプチドが依然として HDM2 および／または HDMX に結合することができることを条件とする。したがって、本明細書において開示される HDM2 および／または HDMX ペプチドのうちのいずれのアミノ酸配列も、バリエーションペプチドが HDM2 および／または HDMX に結合する限り、変動し得る。

10

20

30

40

50

【0122】

一部の場合では、p53 のトランス活性化ドメイン (LSQETFSDLWKLLPEN (配列番号 11))、HDM2 に結合するバリエーション、またはその安定化 (例えば、ステープル化もしくはステッチ化) 形態は、本開示のキメラにおいて使用することができる。一部の場合では、上記の配列の太字の F、W、および L は、置換されない。一部の場合では、上記の配列の太字の F、W、および L のうちの 1 つまたは複数は、保存的置換によってのみ置換される。ある特定の場合では、上記の配列の 1 つまたは複数のアスパラギン酸 (D) は、アスパラギンで置換される。ある特定の場合では、上記の配列の 1 つまたは複数のグルタミン酸 (E) は、グルタミンで置換される。一部の場合では、上記の配列のリシンは、アルギニンで置換される。一部の場合では、上記の配列の第 1 のロイシンは、グルタミンで置換される。一部の場合では、フェニルアラニンの後のセリンおよび／またはフェニルアラニンの前のスレオニンは、任意のアミノ酸 (例えば、非天然アミノ酸、例えば、R8) によって置換される。一部の場合では、リシンの後のロイシンおよび／またはプロリンは、任意のアミノ酸 (例えば、非天然アミノ酸、例えば、S5) によって置換される。一部の場合では、配列番号 11 の第 1、第 2、第 3、第 4、および／または第 5 の N 末端アミノ酸は、欠失していてもよい。一部の場合では、配列番号 11 の C 末端アミノ酸のうちの 1 個、2 個、および／または 3 個は、欠失していてもよい。ある特定の場合では、配列番号 11 の第 1、第 2、第 3、第 4、および／または第 5 の N 末端アミノ酸、ならびに C 末端アミノ酸のうちの 1 個、2 個、および／または 3 個は、欠失していてもよい。これらの置換のうちの 1 つまたは複数の組合せが、本開示によって包含されることを理解されたい。一部の場合では、ペプチドまたは安定化ペプチドは、中性であるか、または正に荷電している。すべての場合で、ペプチドまたは安定化ペプチドは、HDM2 に結合する (例えば、ナノモル濃度の親和性で)。一部の場合では、ペプチドまたはステープルペプチドは、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、または 15 個のアミノ酸の長さである。

【0123】

ある特定の場合では、第 2 の部分のペプチドは、以下に列挙されるペプチドのうちの 1 つのアミノ酸配列またはその HDM2 結合性バリエーション (バリエーションは、先行する段落に記載されるように行われ得る)、例えば、Chong Li et al., J Mol Biol. 2010 Apr 30; 398 (2): 200-213 に記載されるものを有する:

FSDLWKLL (配列番号 38) - p53 トランス活性化ドメイン配列、
TSFAEYWNLLSP (配列番号 39) - PMI 12 (duodecimal) ペプチド阻害剤。

【0124】

本明細書に記載するキメラにおいて用いることができる p53 ペプチドの他の例は、国

際公開第WO2017/165617号(図7)および同第WO2012/065181号(図1C)において開示されており、これらのすべての内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる(特に、ステーブル化されたおよびステーブル化されていないp53ペプチドの開示に関して)。

【0125】

ステーブルp53ペプチドは、それらの構造安定性、ペプチド溶解度、細胞透過性、およびステーブルp53ペプチドが組み込まれる本明細書において開示されるキメラの関連する分解効力を強化するために、改変することができる。例えば、p53ペプチドは、 α -ヘリックス含有量を増加させ、HDM2に対する高い結合親和性を保持し、細胞取り込みを強化するなどのために、改変することができる。p53ペプチドにおける一部の残基は、適切な電荷を達成するために、置換することができる。例えば、ステーブルp53ペプチドにおけるアスパラギン酸およびグルタミン酸は、ペプチドの電荷を調節するために、すなわち、細胞浸透を強化するためにペプチドの電荷を負から中性または正へと変更するために、アスパラギンおよびグルタミンと置き換えられ得る。p53ペプチドにおけるある特定のアミノ酸残基はまた、核外輸送の回避(L14Q)および/または潜在的なユビキチン化の回避(K24R)のために、変異され得る。

【0126】

F19、W23、およびL26は、HDM2との相互作用に関して重要なヒトp53残基である。Raj, N. and Attardi, L. D. Cold Spring Harb Perspect Med. 2017 Jan; 7(1): a026047。本開示のキメラにおいて使用することができるステーブルp53ペプチドには、ヒトp53(UniProtKB-P04637)のアミノ酸14~29に対応するトランス活性化ドメイン配列のすべてもしくは一部、またはそのバリエーション(例えば、少なくとも必須の相互作用アミノ酸F19、W23、およびL26)を含み、*in vitro*結合アッセイにおいて測定した場合に、完全にまたは部分的に、p53のHDMX、HDM2、またはHDMXおよびHDM2への結合を阻害する。HDM2およびHDMXに係合するp53トランス活性化ドメインのヒト野生型アミノ酸配列は、LSQETFSDLWLKLLPEN(配列番号11)

を含み、

これは、全長p53のアミノ酸14~29に対応する。

【0127】

ステーブルp53ペプチドのいずれかまたはすべてのアミノ酸は、必須の相互作用するアミノ酸(上記を参照されたい)を除いて、置換することができ、かつ/または必須の相互作用するアミノ酸(上記を参照されたい)のうちの1つもしくは複数は、1つもしくは複数の保存的置換で置換されてもよい。例えば、Coffill et al Genes Dev 2016 30: 281-292およびBaek et al JACS 2012 134: 103-6を参照されたい。一部の場合では、配列番号11の第1、第2、第3、第4、および/または第5のN末端アミノ酸は、欠失していてもよい。一部の場合では、配列番号11のC末端アミノ酸のうちの1個、2個、および/または3個は、欠失していてもよい。ある特定の場合では、配列番号11の第1、第2、第3、第4、および/または第5のN末端アミノ酸、ならびにC末端アミノ酸のうちの1個、2個、および/または3個は、欠失していてもよい。

【0128】

「非必須」アミノ酸残基は、ポリペプチドの野生型および/または完全に機能性の配列から(その活性を破壊することも、実質的に変化させることもなしに)変更することができる残基である。「必須」アミノ酸残基は、ポリペプチドの野生型および/または完全に機能性の配列から変化させた場合に、ポリペプチド活性の破壊または実質的な破壊をもたらす残基である。

【0129】

「必須」アミノ酸残基という用語は、本明細書で使用される場合、必須アミノ酸の保存

10

20

30

40

50

的置換を含む。一般に、「必須」アミノ酸残基は、アルファヘリックスの相互作用面において見出される。

【0130】

本明細書において開示されるステーブルp53ペプチドに含めるのに好適な保存的置換は、以下で考察されており、1つのアミノ酸残基が、類似の側鎖を有する別のアミノ酸残基と置き換えられる置換を含み得る。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野において定義されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベータ分岐側鎖を有するアミノ酸（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が挙げられる。保存的アミノ酸置換の1つの例では、配列番号11における必須アミノ酸フェニルアラニン（F19）が、アラニンと置き換えられ得る。

10

【0131】

IV. (d) XIAP結合性部分

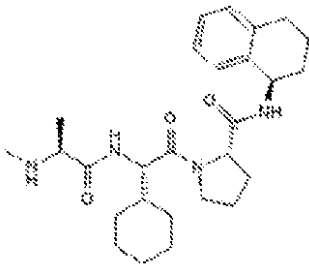
本開示のキメラの第2の部分は、小分子であるか、またはそれを含む、XIAP結合性部分であり得る。XIAPに結合する小分子の非限定的な例としては、A410099.1またはそのXIAP結合性アナログが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0132】

XIAP結合性部分A410099.1は、以下の構造を有する。

【化20】



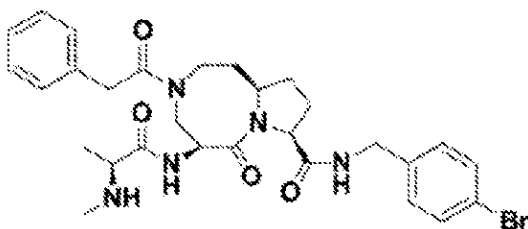
30

【0133】

IV. (e) cIAP結合性部分

本開示のキメラの第2の部分は、小分子であるか、またはそれを含む、cIAP結合性部分であり得る。cIAPに結合する小分子の非限定的な例としては、SM-1295もしくはSM-1280、またはそのcIAP結合性アナログが挙げられるが、これらに限定されない。cIAP結合性部分SM-1295は、以下の構造を有する。

【化21】

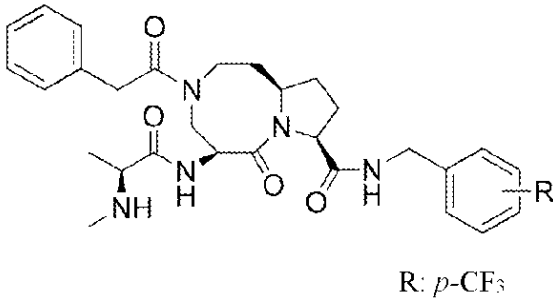


40

cIAP結合性部分SM-1280は、以下の構造を有する。

50

【化 2 2】



10

【0134】

I V. (f) C O P 1 結合性部分

本開示のキメラの第2の部分は、ペプチドまたはステーブルペプチドであるか、またはそれを含む、C O P 1 結合性部分であり得る。C O P 1 に結合するペプチドの非限定的な例としては、以下の配列を有するトリブルズシュードキナーゼ1 (T r i b 1) ペプチドが挙げられるが、これに限定されない：D Q I V P E Y (配列番号6) またはそのバリエーション。

【0135】

一部の場合では、ペプチドは、配列番号6におけるアミノ酸に対して、少なくとももしくは約30%、少なくとももしくは約40%、少なくとももしくは約50%、少なくともしくは約60%、少なくともしくは約70%、少なくともしくは約75%の同一性、少なくともしくは約80%、少なくとも85%、少なくともしくは約90%、少なくともしくは約95%、少なくともしくは約98%、少なくともしくは約99%、または100%の同一性を有し得、ここで、ペプチドは、C O P 1 に結合する。あるいは、またはさらに、ペプチドは、保存的であるかどうかにかかわらず、アミノ酸置換および/または欠失を含み得る。例えば、ペプチドは、保存的であるかどうかにかかわらず、0個、1個、2個、3個、4個、5個、5個未満、4個未満、3個未満、または2個未満のアミノ酸置換、欠失、および/または付加を含み得るが、ただし、ペプチドが依然としてC O P 1 に結合することができることを条件とする。したがって、本明細書において開示されるC O P 1 結合性ペプチドのうちのいずれのアミノ酸配列も、バリエーションペプチドがC O P 1 に結合する限り、変動し得る。

20

30

【0136】

I V. (g) 基質アダプター結合性ペプチド

本開示のキメラの第2の部分は、E 3 ユビキチンリガーゼに対する基質アダプターであるタンパク質に結合するペプチドであり得る。一部の場合では、ペプチドは、E 3 ユビキチンリガーゼに対する基質アダプターであるW D - 4 0 タンパク質に結合する。ペプチドは、浅い溝にあるE 3 ユビキチンリガーゼの基質認識ドメインに結合し、N-またはC末端のいずれかにおける同化(すなわち、ステーブルペプチド配列のコンジュゲート)に対して耐性がある。E 3 ユビキチンリガーゼに対する例示的な基質アダプターとしては、H D M 2 およびV H L が挙げられる。

40

【0137】

ある特定の場合では、第2の部分のペプチドは、トリブルズシュードキナーゼ1 (T r i b 1) タンパク質配列：D Q I V P E Y (配列番号6) またはそのバリエーションに基づく。

【0138】

ある特定の場合では、第2の部分のペプチドは、E 3 ユビキチンリガーゼに対する基質アダプターであるW D 4 0 リピータンパク質に結合するペプチドの天然結合コンセンサス配列に基づいている。一部の場合では、第2の部分のペプチドは、E 3 ユビキチンリガーゼに対する基質アダプターであるW D 4 0 リピータンパク質に結合するペプチドの天然結合コンセンサス配列のバリエーション(例えば、置換、欠失、または挿入バリエーション)で

50

ある。E3ユビキチンリガーゼに対する基質アダプターであるWD40リピートタンパク質に結合するペプチドの天然結合コンセンサス配列の非限定的な例を以下に示す。

【表 7】

配列番号:	E3 リガーゼ/デグロン	公知の 事例数	モチーフパターン ^{†‡}
14	MDM2_SWIB	5	F ¹ [P] ³ W ¹ [P] ^{2,3} [VIL]
15	ODPH_VHL_1	8	[IL]A(P) ^{6,8} [FLIVM] ¹ [FLIVM]

10

【0139】

†モチーフパターンは以下の命名法を使用する:「¹」は任意のアミノ酸タイプを指定し、「[X]」はその位置において許可されるアミノ酸タイプ(複数可)を指定し、パターンの最初における「¹X」は、配列がアミノ酸タイプXで開始することを指定し、「[¹X]」は、その位置がタイプX以外のアミノ酸を有することができることを示し、次のように指定される数「X{x,y}」のxおよびyは、その位置において必要な「X」アミノ酸タイプの最小および最大数を指定する。翻訳後に改変(例えば、リン酸化およびプロリンヒドロキシル化)されることが公知である第1級デグロン内の保存残基の位置を太字で示す。

20

【0140】

V. 第2の部分のペプチド

本明細書に記載するキメラは、E3ユビキチンリガーゼ結合性ペプチド(例えば、配列番号1、6、7、12、13、38~47、および49~50)を、第2の部分として含み得る。第2の部分のペプチドは、安定化またはステーブルペプチドであり得る。当該技術分野において公知の任意の他のペプチドもまた、第2の部分として、本開示のキメラに組み込むことができる。例えば、Meszaros et al., Sci. Signal., 10(470):eaak9982 (2017); Guharoy et al., Nature Communications, 7:10239, doi:10.1038/ncomms10239 (2016); 米国特許第9,783,575号; 同第9,297,017号; および同第9,115,184号を参照されたく、これら全ては、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0141】

本開示のペプチド(すなわち、配列番号1、6、7、12、13、38~47および49~50)のバリエーションは、1個または複数(例えば、1、2、3、4、5個)のアミノ酸置換; 1個または複数の欠失(例えば、1、2、3); 1個または複数の挿入(例えば、1、2、3個); またはこれらの任意の2つまたはそれを超える組合せを有するペプチドを含む。適切なE3リガーゼと相互作用するバリエーションが選択される。

【0142】

本開示の第2の部分のペプチドは、1000nMを下回る結合親和性でその関連するE3リガーゼに結合し得る。ある特定の場合では、第2の部分ペプチドは、4から20個のアミノ酸長(例えば、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個)である。

40

【0143】

ある特定の場合では、第2の部分ペプチドは、配列番号1、6、7、12、13、38~47および49~50のうちのいずれか1つに記載のペプチドのアミノ酸配列を有する。一部の場合では、第2の部分ペプチドは、配列番号1、6、7、12、13、38~47および49~50のうちのいずれか1つに記載のペプチドのバリエーションであるアミノ酸配列を有する。バリエーションは、1個または複数(例えば、1、2、3、4、5個)のアミノ酸置換; 1個または複数の欠失(例えば、1、2、3); 1個または複数の挿入(例え

50

ば、1、2、3個）；またはこれらの任意の2つまたはそれを超える組合せを有する第2の部分ペプチドを含む。

【0144】

VI. 安定化ペプチド

本開示のキメラの第1および／または第2の部分は、安定化ペプチド（例えば、ステープルペプチド）を含み得る。ペプチドヘリックスは、多くの重要な生物学的プロセス（例えば、アポトーシス）を調節する鍵となるタンパク質-タンパク質相互作用の重要なメディエーターであるが、そのようなヘリックスが、タンパク質の範囲内でその背景を無視して解釈され、単離して調製された場合、それは折りたたまれず、ランダムコイルコンフォメーションをとる場合があり、生物活性において劇的な減少につながり、したがって治療的潜在力が低下する。この問題を回避するために、構造的に安定化したペプチドを用いることができる。一部の 경우에는、構造的に安定化したペプチドは、内部（分子内）架橋（またはステープル）によって接合した少なくとも2個の改変アミノ酸を含む。本明細書において記載する安定化ペプチドは、ステープルペプチド、ステッチペプチド、複数のステッチを含むペプチド、複数のステープルを含むペプチド、またはステープルおよびステッチのミックスを含むペプチド、ならびに他の化学的戦略によって構造的に強化されたペプチドを含む（例えば、Balaram P. Cur. Opin. Struct. Biol. 1992; 2: 845; Kemp DS, et al., J. Am. Chem. Soc. 1996; 118: 4240; Orner BP, et al., J. Am. Chem. Soc. 2001; 123: 5382; Chin JW, et al., Int. Ed. 2001; 40: 3806; Chapman RN, et al., J. Am. Chem. Soc. 2004; 126: 12252; Horne WS, et al., Chem., Int. Ed. 2008; 47: 2853; Madden et al., Chem Commun (Camb). 2009 Oct 7; (37): 5588-5590; Lau et al., Chem. Soc. Rev., 2015, 44: 91-102; および Gunnoo et al., Org. Biomol. Chem., 2016, 14: 8002-8013を参照されたく、これら全ては、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。安定化ペプチドのさらなる例については、例えば、国際公開第WO 2019/118893号を参照されたく、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

20

30

【0145】

ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、ペプチドをステープル化することによって安定化することができる（例えば、Walensky, J. Med. Chem., 57: 6275-6288 (2014)を参照されたく、その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。ステープルペプチドは、生体活性ペプチドの天然の α -ヘリックス形状を強化し、安定化された構造、in vivoでのプロテアーゼ耐性、強化された標的結合親和性、および好ましい薬理学を付与する（Walensky, L. D. & Bird, G. H. J Med Chem 57, 6275-88 (2014)、Walensky, L. D. et al. Science 305, 1466-70 (2004)）。ペプチドは、その天然二次構造を維持する点で「安定化」されている。例えば、ステープル化は、 α -ヘリックス二次構造を有する傾向があるポリペプチドが、その天然 α -ヘリックスコンフォメーションを維持することを可能にする。この二次構造は、タンパク質の分解的切断および熱に対するポリペプチドの抵抗性を増加させ、標的への結合親和性、疎水性、および細胞透過性も増加させる場合がある。したがって、本明細書において記載するステープル（架橋）ポリペプチドは、対応する非ステープル（非架橋）ポリペプチドと比較して改善された生物活性を有する。

40

【0146】

「ペプチドのステープル化」は、合成方法論から作り出された用語であり、ポリペプチド鎖に存在する2個のオレフィン含有側鎖（例えば、架橋可能な側鎖）が、閉環メタセシ

50

ス（RCM）反応を使用して共有接合し（例えば、「一緒にステープル化され」）、架橋環を形成している（例えば、Blackwell et al., J. Org. Chem., 66: 5291-5302, 2001; Angew et al., Chem. Int. Ed. 37: 3281, 1994を参照のこと）。「ペプチドのステープル化」という用語は、本明細書で使用される場合、そのような反応を促進し、単一の「ステープル」ポリペプチドを提供する任意の数の反応条件および／または触媒を使用した、ポリペプチド鎖に存在する場合がある２個の（例えば、少なくとも一対の）二重結合含有側鎖、三重結合含有側鎖、または二重結合含有および三重結合含有側鎖の接合を含む。「マルチプライ（multiply）ステープル」ポリペプチドという用語は、１個を超える個々のステープルを含み、２個、３個、またはそれを超えるさまざまな間隔の独立したステープルを含んでいてもよいポリペプチドを指す。さらに「ペプチドのステッチ化」という用語は、本明細書で使用される場合、２個のステープルが、例えば共通の残基に連結している「ステッチ」（例えば、直列のまたはマルチプライステープル）ポリペプチドを提供する、単一のポリペプチド鎖における複数のかつ直列の「ステープル化」事象を指す。ペプチドのステッチ化は、例えば、WO2008/121767およびWO2010/068684で開示されており、これら両方は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。一部の 경우에는、ステープルは、本明細書で使用される場合、不飽和結合を保持することができるかまたは減少させることができる。

10

【0147】

ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、例えば、炭化水素のステープル化によって安定化することができる。ある特定の 場合では、ステープルペプチドは、少なくとも２個（例えば、２、３、４、５、６個）のアミノ酸置換を含み、置換されたアミノ酸は、２個、３個、または６個のアミノ酸で隔てられ、置換されたアミノ酸は、オレフィン側鎖を有する非天然アミノ酸である。多数の公知の非天然のまたは自然界には存在しないアミノ酸が存在し、これらのうちのいずれかは、ステープルペプチドに含まれる場合がある。自然界には存在しないアミノ酸の一部の例は、４-ヒドロキシプロリン、デスモシン、ガンマ-アミノ酪酸、ベータ-シアノアラニン、ノルバリン、４-(E)-ブテニル-４(R)-メチル-N-メチル-L-トレオニン、N-メチル-L-ロイシン、１-アミノ-シクロプロパンカルボン酸、１-アミノ-２-フェニル-シクロプロパンカルボン酸、１-アミノ-シクロブタンカルボン酸、４-アミノ-シクロペンタンカルボン酸、３-アミノ-シクロヘキサンカルボン酸、４-ピペリジル酢酸、４-アミノ-L-メチルピロール-２-カルボン酸、２, 4-ジアミノ酪酸、２, 3-ジアミノプロピオン酸、２, 4-ジアミノ酪酸、２-アミノヘブタン二酸、４-(アミノメチル)安息香酸、４-アミノ安息香酸、オルト-、メタ-およびパラ-置換フェニルアラニン（例えば、-C(=O)C₆H₅; -CF₃; -CN; -H; -NO₂; CH₃で置換された）、二置換フェニルアラニン、置換チロシン（例えば、-C(=O)C₆H₅; -CF₃; -CN; -H; -NO₂; CH₃でさらに置換された）、ならびにスタチンである。さらに、アミノ酸は、ヒドロキシル化、リン酸化、スルホン化、アシル化、またはグリコシル化されたアミノ酸残基を含むように誘導体化することができる。

20

30

【0148】

炭化水素ステープルポリペプチドは、２個の非天然アミノ酸間に１個または複数のテザー（連結）を含み、このテザーは、ポリペプチドのα-ヘリックス二次構造を顕著に強化する。一般的に、テザーは、１つまたは２つの螺旋ターン（すなわち、約３．４または約７個のアミノ酸）の長さにならって伸長する。したがって、i および i + 3 個目； i および i + 4 個目；または i および i + 7 個目に位置するアミノ酸は、化学的修飾および架橋に関して理想的な候補である。したがって、例えば、ペプチドが、配列... X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、X₈、X₉... を有する場合、X₁とX₄との間、またはX₁とX₅との間、またはX₁とX₈との間の架橋がそのペプチドの有用な炭化水素のステープル化形態であり、X₂とX₅との間、またはX₂とX₆との間、またはX₂とX₉との間などの架橋も同様である。複数の架橋（例えば、２、３、４個、またはそれ

40

50

10

20

【 0 1 5 1 】

30

一態様では、安定化ポリペプチドは式（I）

$$\left[\begin{array}{c} \text{O} \qquad \qquad \text{O} \\ \parallel \qquad \qquad \parallel \\ [\text{Xaa}]_y - \text{NH} - \text{C} - [\text{Xaa}]_x - \text{NH} - \text{C} \\ \diagup \qquad \diagdown \qquad \diagup \qquad \diagdown \\ \text{R}_1 \qquad \qquad \text{R}_3 \qquad \qquad \text{R}_2 \end{array} \right] \text{---} [\text{Xaa}]_y$$

40

50

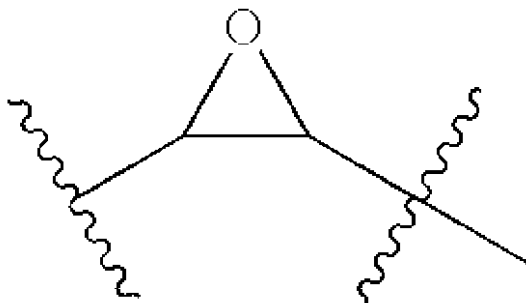
ル、アリールアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロアリールアルキル、もしくはヘテロシクリルアルキルであり；

R_3 は、アルキル、アルケニル、アルキニル； $[R_4 - K - R_4]_n$ であり；これらはそれぞれ 0 ～ 6 個の R_5 で置換されており；

R_4 は、アルキル、アルケニル、またはアルキニルであり；

R_5 は、ハロ、アルキル、 OR_6 、 $N(R_6)_2$ 、 SR_6 、 SOR_6 、 SO_2R_6 、 CO_2R_6 、 R_6 、蛍光部分、または放射性同位体であり；

K は、 O 、 S 、 SO 、 SO_2 、 CO 、 CO_2 、 $CONR_6$ であるか、または
【化 2 4】



10

であり、

R_6 は、 H 、アルキル、または治療剤であり；

20

n は 1 ～ 4 の整数であり；

x は 2 ～ 10 の整数であり；

各 y は、独立して、0 ～ 100 の整数であり；

z は、1 ～ 10（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10）の整数であり；

各 X_{aa} は、独立してアミノ酸である）を有する。

【0153】

テザーは、アルキル、アルケニル、またはアルキニル部分（例えば、 C_5 、 C_8 、もしくは C_{11} アルキル、 C_5 、 C_8 、もしくは C_{11} アルケニル、または C_5 、 C_8 、もしくは C_{11} アルキニル）を含んでもよい。テザーされたアミノ酸は、アルファニ置換（例えば、 $C_1 \sim C_3$ またはメチル）とすることができる。

30

【0154】

一部の場合では、 x は 2、3、または 6 である。一部の場合では、各 y は、独立して、1 から 15 または 3 から 15 の整数である。一部の場合では、 R_1 および R_2 は、それぞれ独立して、 H または $C_1 \sim C_6$ アルキルである。一部の場合では、 R_1 および R_2 は、それぞれ独立して、 $C_1 \sim C_3$ アルキルである。一部の場合では、 R_1 および R_2 のうちの少なくとも 1 つはメチルである。例えば、 R_1 および R_2 は、両方ともメチルとすることができる。一部の場合では、 R_3 はアルキル（例えば、 C_8 アルキル）であり、 x は 3 である。一部の場合では、 R_3 は C_{11} アルキルであり、 x は 6 である。一部の場合では、 R_3 はアルケニル（例えば、 C_8 アルケニル）であり、 x は 3 である。一部の場合では、 x は 6 であり、 R_3 は C_{11} アルケニルである。一部の場合では、 R_3 は、直鎖状アルキル、アルケニル、またはアルキニルである。一部の場合では、 R_3 は $-CH_2-CH_2-CH_2-CH=CH-CH_2-CH_2-CH_2-$ である。

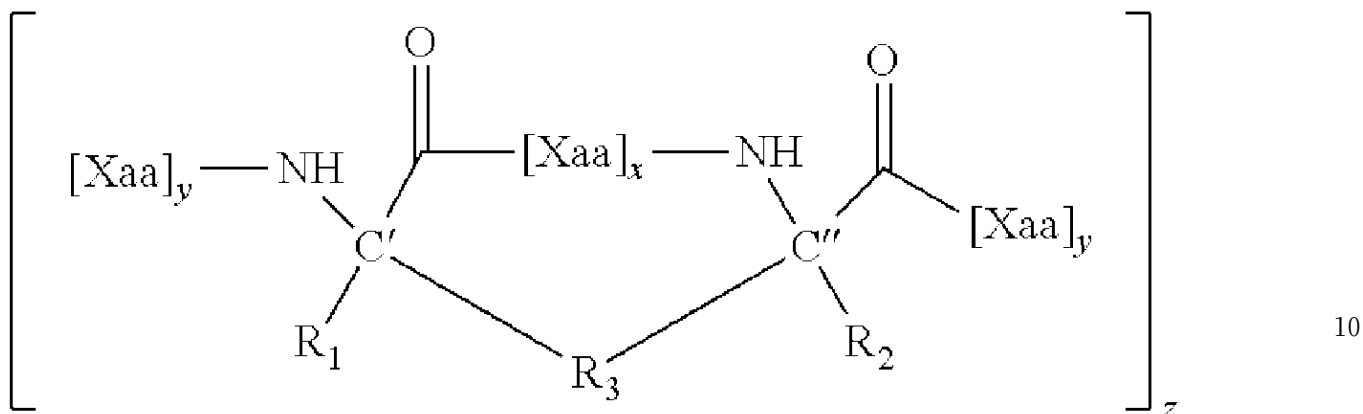
40

【0155】

別の態様では、2 個のアルファ、アルファニ置換立体中心は、両方とも R 立体配置もしくは S 立体配置（例えば、 i 、 $i+4$ 個目の架橋）であるか、または一方の立体中心は R であり、もう一方は S （例えば、 i 、 $i+7$ 個目の架橋）である。したがって、式 I

50

【化 2 5】



10

として図示する場合、例えば、 x が 3 のとき、 C' および C'' 二置換立体中心は、両方とも R 立体配置とすることができるか、または両方とも S 立体配置とすることができる。 x が 6 である場合、 C' 二置換立体中心は R 立体配置であり、 C'' 二置換立体中心は S 立体配置である。 R_3 二重結合は、 E または Z 立体化学配置とすることができる。

【0156】

一部の場合では、 R_3 は、 $[R_4-K-R_4]_n$ であり； R_4 は、直鎖状アルキル、アルケニル、またはアルキニルである。

20

【0157】

一部の実施形態では、本開示は、2 個、3 個、または 6 個のアミノ酸で隔てられた 2 個のアミノ酸の側鎖が内部ステーブルで置き換えられた；3 個のアミノ酸の側鎖が内部ステッチで置き換えられた；4 個のアミノ酸の側鎖が 2 個の内部ステーブルで置き換えられた、または 5 個のアミノ酸の側鎖が、内部ステーブルおよび内部ステッチの組合せで置き換えられた、内部架橋された（「ステーブル化された」または「ステッチ化された」）ペプチドを特徴とする。ステーブル化された／ステッチ化されたペプチドは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または 50 個のアミノ酸長とすることができる。

30

【0158】

ある特定の場合では、安定化ペプチドは、分解について標的化されるタンパク質（例えば、コロナウイルスプロテアーゼ）に結合する細胞内タンパク質のペプチド、E3 ユビキチンリガーゼに結合するペプチド、または E3 ユビキチンリガーゼに対する基質アダプター（例えば、WD40 リピードタンパク質）に結合するペプチドである。

【0159】

本開示のキメラに組み込むことができるステーブルペプチドの非限定的な例を、以下に列挙する。

ATVNVLAWL YAAVINGD（配列番号 2）-Mpr o 結合性ペプチド

40

ATVNVLAWL YX₁AVIX₂GD（配列番号 3）-Mpr o 結合性ペプチド

ANL NAGBX₁LG SX₂AA TVELQ（配列番号 4）-NSP9 結合性ペプチド

ANL NRGBX₁LG SX₂AA TVRLQ（配列番号 5）-NSP9 結合性ペプチド

ここで、B = ノルロイシンであり、X₁ および X₂ は、同じである（例えば、(S5)）。

LTF (R8) EYWAQ# (S5) SAA（配列番号 7）-ATSP-7041、# = シクロブチルアラニンである

LTF (R8) EYWAQL (S5) SAA（配列番号 1）-p53 (SP645) ある特定の実施形態では、ステーブルペプチドは、配列番号 1 ~ 7、12、13、38 ~ 47 および 49 ~ 50 のうちのいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列を含むかまたはこれらから

50

なる。ある特定の実施形態では、本開示は、ステープル／ステッチの位置が異なる点で、上記で開示されるペプチドとは異なる安定化ペプチドを特徴とする。ある特定の実施形態では、本開示は、これらのペプチドのアルファヘリックスの非相互作用面上に1から7（例えば、1、2、3、4、5、6、7）個のアミノ酸置換を有する上記で開示した配列とは異なる点で、上記で開示されるペプチドとは異なる安定化ペプチドを特徴とする。ある特定の場 10
合では、置換は保守的である。他の場合では、置換は非保守的である。ある特定の実施形態では、本開示は、これらのペプチドのアルファヘリックスの相互作用面上に1から5（例えば、1、2、3、4、5）個のアミノ酸置換を有する上記で開示した配列とは異なる点で、上記で開示されるペプチドとは異なる安定化ペプチドを特徴とする。ある特定の場 20
合では、置換は保守的である。ステープルペプチドに対する例示的な変形／改変のタイプを図5に示す。

【0160】

VII. 安定化ペプチドにおけるテザー

炭化水素テザーが、本開示の安定化ペプチドにおいて使用される。一部の場合では、他のテザーもまた、本開示の安定化ペプチドにおいて用いられ得る。例えば、テザーは、1個または複数のエーテル、チオエーテル、エステル、アミン、またはアミド、またはトリアゾール部分を含んでいてもよい。一部の場合では、天然に存在するアミノ酸側鎖を、テザー中に組み込むことができる。例えば、テザーは、官能基、例えばセリン中のヒドロキシル、システイン中のチオール、リシン中の第1級アミン、アスパラギン酸もしくはグルタミン酸中の酸、またはアスパラギンもしくはグルタミン中のアミドとカップリングすること 20
ができる。したがって、2個の天然に存在しないアミノ酸をカップリングすることによって作製されるテザーを使用するのではなく、天然に存在するアミノ酸を使用してテザーを生成することが可能である。天然に存在するアミノ酸とともに単一の天然に存在しないアミノ酸を使用することも可能である。トリアゾール含有（例えば、1，4トリアゾールまたは1，5トリアゾール）架橋を使用することができる（例えば、Kawamoto et al., 2012 Journal of Medicinal Chemistry 55:1137; WO2010/060112を参照のこと）。更に、異なるタイプのステープル化を行う他の方法は当技術分野において周知であり、それを用いることができる（例えば、ラクタムステープル化: Shepherd et al., J. Am. Chem. Soc., 127:2974-2983 (2005); UV付加環化ステープル化: Madden et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 21:1472-1475 (2011); ジスルフィドステープル化: Jackson et al., Am. Chem. Soc., 113:9391-9392 (1991); オキシムステープル化: Haney et al., Chem. Commun., 47:10915-10917 (2011); チオエーテルステープル化: Brunel and Dawson, Chem. Commun., 552-2554 (2005); 光スイッチ (Photoswitchable) ステープル化: J. R. Kumita et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 97:3803-3808 (2000); ダブルクリックステープル化: Lau et al., Chem. Sci., 5:1804-1809 (2014); ビスラクタムステープル化: J. C. Phelan et al., J. Am. Chem. Soc., 119:455-460 (1997); およびビスアリアル化ステープル化: A. M. Spokony et al., J. Am. Chem. Soc., 135:5946-5949 (2013)を参照のこと）。 30
40

【0161】

テザーの長さが変わる場合がある点が更に想定される。例えば、二次性アルファヘリックス構造に対して比較的高度の拘束を与えることが望ましい場合、長さが短いテザーを使用することができるが、一部の場合では、二次性アルファヘリックス構造に対して拘束は低いことが望ましく、したがって長いテザーが望まれる場合がある。 50

【0162】

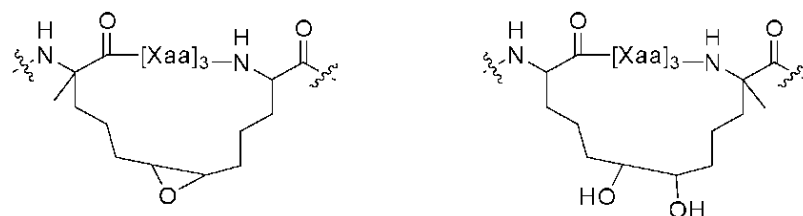
さらに、主にアルファヘリックスの片面上にあるテザーを与えるために、アミノ酸 i から $i + 3$ 個目、 i から $i + 4$ 個目、および i から $i + 7$ 個目までのテザー全長は共通であるが、テザーは、アミノ酸の数の任意の組合せに及ぶように合成することができ、複数のテザーを導入するように組み合わせて使用することもできる。

【0163】

一部の場合では、本明細書において記載する炭化水素テザー（すなわち、架橋）は、更に操作することができる。一例では、（例えば、ルテニウム触媒による閉環メタセシス（RCM）を使用して合成されるような）炭化水素アルケニルテザーの二重結合を酸化し、（例えば、エポキシ化、アミノヒドロキシル化またはジヒドロキシル化を介して）、以下の化合物のうちの1つを提供することができる。

10

【化26】



20

【0164】

エポキシド部分か、または遊離ヒドロキシル部分のうちの1つのいずれかは、さらに官能基化することができる。例えば、エポキシドは、例えば、治療剤に結合するために使用することができる追加の官能性を与える求核試薬で処置することができる。あるいはそのような誘導体化は、ポリペプチドのアミノまたはカルボキシ末端の合成操作によってまたはアミノ酸側鎖を介して達成することができる。他の薬剤、例えばポリペプチドが細胞中に侵入するのを促進する薬剤を、官能基化テザーに結合させることができる。

【0165】

一部の場合では、アルファニ置換アミノ酸は、アルファヘリックス二次構造の安定性を改善するためにポリペプチドにおいて使用する。しかし、アルファニ置換アミノ酸は必須ではなく、（例えば、テザーされたアミノ酸において）モノ-アルファ置換基を使用した場合も想定される。

30

【0166】

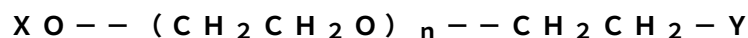
ステーブルポリペプチドは、薬物、毒素、ポリエチレングリコール誘導体；第2のポリペプチド；炭水化物などを含んでもよい。ポリマーまたは他の薬剤がステーブルポリペプチドに連結している場合、組成物は実質的に均質であることが望ましい場合がある。

【0167】

ポリエチレングリコール（PEG）分子が付加すると、ポリペプチドの薬物動態および薬力学特性が改善される場合がある。例えば、PEG化を行うと、腎クリアランスを低下させることができ、より安定な血漿濃度をもたらす場合がある。PEGは水溶性ポリマーであり、式：

40

【0168】



（式中、 n は2から10、000であり、 X は、 H または末端改変、例えば $C_1 \sim 4$ アルキルであり； Y は、ポリペプチドのアミン基（これらに限定されないが、リシンのイブシロンアミン、または N 末端を含む）への、アミド、カルバメートまたは尿素連結である）としてポリペプチドへ連結しているとして表すことができる。 Y はまた、チオール基（これらに限定されないがシステインのチオール基を含む）へのマレイミド連結であってもよい。PEGをポリペプチドに直接的にまたは間接的に連結するための他の方法は、当業者であれば公知である。PEGは、直鎖状または分岐状とすることができる。さまざまな官

50

能基化誘導体を含む P E G のさまざまな形態が市販されている。

【0169】

分解可能な連結を骨格において有する P E G を使用することができる。例えば、P E G は、加水分解するための対象であるエステル連結を用いて調製することができる。分解可能な P E G 連結を有するコンジュゲートは、W O 9 9 / 3 4 8 3 3、W O 9 9 / 1 4 2 5 9、および U . S . 6 , 3 4 8 , 5 5 8 に記載されている。

【0170】

ある特定の実施形態では、高分子ポリマー（例えば、P E G）は、中間体リンカーを介して本明細書において記載する薬剤に結合している。ある特定の実施形態では、リンカーは、ペプチド結合によって連結された 1 から 2 0 個のアミノ酸で構成されており（*made up of*）、アミノ酸は、2 0 種類の天然に存在するアミノ酸から選択される。これらのアミノ酸のうちの一部は、当業者であれば十分に理解しているようにグリコシル化されていてもよい。他の実施形態では、1 から 2 0 個のアミノ酸は、グリシン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミン、およびリシンから選択される。他の実施形態では、リンカーは、グリシンおよびアラニンなどの立体障害のない大部分のアミノ酸で構成されている。非ペプチドリンカーも可能である。例えば、アルキルリンカー、例えば $-NH(CH_2)_nC(O)-$ （式中、 $n=2\sim 20$ ）を使用することができる。これらのアルキルリンカーは、任意の立体障害のない基、例えば低級アルキル（例えば、 $C_1\sim C_6$ ）低級アシル、ハロゲン（例えば、Cl、Br）、CN、 NH_2 、フェニル等でさらに置換されていてもよい。米国特許第 5 , 4 4 6 , 0 9 0 号では、二官能性 P E G リンカー、および各 P E G リンカー末端でペプチドを有するコンジュゲートの形成におけるその使用が記載されている。

10

20

【0171】

一部の実施形態では、安定化ペプチドも、例えば、細胞取込みをさらに促進するために、または *in vivo* 安定性を増加させるために改変してもよい。例えば、ペプチド模倣大員環をアシル化または P E G 化すると、細胞取込みが促進され、バイオアベイラビリティが増加し、血液循環が増加し、薬物動態が変化し、免疫原性が減少しおよび／または必要とされる投与頻度が減少する。

【0172】

一部の実施形態では、本明細書において開示されるステーブルペプチドは、（例えば、非ステーブルペプチドと比較して）細胞膜を貫通するための強化された能力を有する。

30

【0173】

本明細書において記載する安定化ペプチドを合成する方法は当技術分野において公知である。それにもかかわらず、以下の例示的な方法を使用する場合がある。さまざまなステップを、代替の配列または順序で行い、所望の化合物を得てもよいことは理解されるであろう。本明細書において記載する化合物の合成において有用である合成化学的変換および官能基を保護する方法論（保護および脱保護）は、当技術分野において公知であり、例えば、R . L a r o c k , C o m p r e h e n s i v e O r g a n i c T r a n s f o r m a t i o n s , V C H P u b l i s h e r s (1 9 8 9) ; T . W . G r e e n e a n d P . G . M . W u t s , P r o t e c t i v e G r o u p s i n O r g a n i c S y n t h e s i s , 3 d . E d . , J o h n W i l e y a n d S o n s (1 9 9 9) ; L . F i e s e r a n d M . F i e s e r , F i e s e r a n d F i e s e r ' s R e a g e n t s f o r O r g a n i c S y n t h e s i s , J o h n W i l e y a n d S o n s (1 9 9 4) ; および L . P a q u e t t e , e d . , E n c y c l o p e d i a o f R e a g e n t s f o r O r g a n i c S y n t h e s i s , J o h n W i l e y a n d S o n s (1 9 9 5)、ならびにこれらのその後の版に記載されているものを含む。

40

【0174】

安定化ペプチドは、当業者であれば周知の化学的合成方法によって作製することができる。例えば、F i e l d s e t a l . , C h a p t e r 3 i n S y n t h e

50

tic Peptides: A User's Guide, ed. Grant, W. H. Freeman & Co., New York, N. Y., 1992, p. 77を参照されたい。したがって、ペプチドは、例えばApplied Biosystems Peptide Synthesizer Model 430Aまたは431において、側鎖が保護されたアミノ酸を使用してt-BocまたはFmoc化学作用で保護された α -NH₂を用いた固相合成の自動化Merrifield技術を使用して合成することができる。

【0175】

本明細書において記載するペプチドを作製する一様式は、固相ペプチド合成（SPPS）を使用することである。C末端アミノ酸は、リンカー分子を用い、酸に不安定な結合を介して架橋ポリスチレン樹脂に結合させる。この樹脂は、合成のために使用する溶媒に不溶性であり、過剰な試薬および副生成物を洗い流すのを比較的単純にかつ迅速にする。N末端は、酸において安定なFmoc基で保護されるが、塩基によって取り外し可能である。任意の側鎖官能基は、塩基で安定であり、酸に不安定な基で保護される。

【0176】

長いペプチドは、ネイティブケミカルライゲーションを使用して個々の合成ペプチドを接続させることによって作製してもよい。あるいは、長い合成ペプチドは、周知の組換えDNA技術によって合成することができる。そのような技術は、詳細なプロトコール含む周知の標準的なマニュアルとして提供される。本発明のペプチドをコードする遺伝子を構築するために、アミノ酸配列を逆翻訳し、好ましくは遺伝子が発現される生物に最適なコドン有するアミノ酸配列をコードする核酸配列を得る。次に、合成遺伝子を、典型的には必要に応じてペプチドおよび任意の調節性エレメントをコードするオリゴヌクレオチドを合成することによって作製する。合成遺伝子を、好適なクローニングベクターに挿入し、宿主細胞中にトランスフェクトする。次いで、ペプチドを、選択された発現系および宿主に適切な好適な状態で発現させる。ペプチドは精製し、標準的な方法によって特徴付ける。

【0177】

ペプチドは、例えば、Advanced Chemtechから入手可能なハイスループットマルチチャンネルコンビナトリアルシンセサイザーを使用したハイスループット組合せ様式で作製することができる。ペプチド結合は、例えば、ペプチドの生理学的安定性を高めるために、レトロインベルソ結合（C(O)-NH）；還元アミド結合（NH-CH₂）；チオメチレン結合（S-CH₂またはCH₂-S）；オキシメチレン結合（O-CH₂またはCH₂-O）；エチレン結合（CH₂-CH₂）；チオアミド結合（C(S)-NH）；トランス-オレフィン結合（CH=CH）；フルオロ置換トランス-オレフィン結合（CF=CH）；ケトメチレン結合（C(O)-CHR）またはCHR-C(O）（式中、RはHまたはCH₃である）；およびフルオロケトメチレン結合（C(O)-CFRまたはCFR-C(O）（式中、RはHまたはFまたはCH₃である）で置き換えることができる。

【0178】

ポリペプチドは、アセチル化、アミド化、ビオチン化、シンナモイル化、ファルネシル化、フルオレセイン化、ホルミル化、ミリストイル化、パルミトイル化、リン酸化（Ser、TyrまたはThr）、ステアロイル化、スクシニル化およびスルフィリル化によってさらに改変することができる。上記で示すように、ペプチドは、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）；アルキル基（例えば、C1～C20直鎖状または分岐状アルキル基）；脂肪酸ラジカル；およびこれらの組合せにコンジュゲートすることができる。さまざまな長さのオレフィン側鎖を含む α 、 α -二置換非天然アミノ酸は、公知の方法で合成することができる（Williams et al., J. Am. Chem. Soc., 113:9276, 1991; Schafmeister et al., J. Am. Chem. Soc., 122:5891, 2000; および Bird et al., Methods Enzymol., 446:369, 2008; 10

10

20

30

40

50

Bird et al., Current Protocols in Chemical Biology, 2011)。ペプチドに関しては、 $i+7$ 個目のステープルに連結した i 個目を使用する（ヘリックス 2 回転が安定化される）場合、a) 1 個の S5 アミノ酸および 1 個の R8 を使用するか、または b) 1 個の S8 アミノ酸および 1 個の R5 アミノ酸を使用する。R8 は、出発キラル助剤が R-アルキル-立体異性体をもたらすことを除いて、同様の経路を使用して合成する。また、8-ヨードオクテンを 5-ヨードペンテンの代わりに使用する。阻害剤は、MBHA 樹脂上での固相ペプチド合成 (SPPS) を使用して固体支持体上で合成する（例えば、WO2010/148335 を参照のこと）。

【0179】

Fmoc-保護された α -アミノ酸（オレフィンアミノ酸 Fmoc-S5-OH、Fmoc-R8-OH、Fmoc-R8-OH、Fmoc-S8-OH および Fmoc-R5-OH 以外）、2-(6-クロロ-1-H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルアミニウムヘキサフルオロホスフェート (HCTU)、および Rink Amide MBHA は、例えば、Novabiochem (San Diego, CA) から市販されている。ジメチルホルムアミド (DMF)、N-メチル-2-ピロリジノン (NMP)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (DIEA)、トリフルオロ酢酸 (TFA)、1,2-ジクロロエタン (DCE)、フルオロセインイソチオシアネート (FITC)、およびピペリジンは、例えば、Sigma-Aldrich から市販されている。オレフィンアミノ酸合成は、当技術分野において報告されている (Williams et al., Org. Synth., 80:31, 2003)。

【0180】

本開示のキメラに組み込まれ得る本明細書において開示されるステープル化され、精製されたペプチドを得る（例えば、合成する）のに好適な方法もやはり、当技術分野において公知である（例えば、Bird et al., Methods in Enzymol., 446:369-386 (2008); Bird et al., Current Protocols in Chemical Biology, 2011; Walensky et al., Science, 305:1466-1470 (2004); Schafmeister et al., J. Am. Chem. Soc., 122:5891-5892 (2000); 2010年3月18日に出席された米国特許出願公開第12/525,123号; および 2010年5月25日に登録された米国特許第7,723,468号を参照されたく、これらそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【0181】

一部の実施形態では、ペプチドは、非ステープルペプチド混入物質を実質的に含まないか、または単離されている。ペプチドを精製するための方法としては、例えば、固相支持体上でのペプチド合成がある。環化後、固相支持体は、単離し、溶媒溶液、例えば DMSO、DMSO/ジクロロメタン混合物、または DMSO/NMP 混合物中に懸濁してもよい。DMSO/ジクロロメタンまたは DMSO/NMP 混合物は、約 30%、40%、50% または 60% の DMSO を含んでいてもよい。特定の実施形態では、50%/50% DMSO/NMP 溶液を使用する。溶液は、1、6、12 または 24 時間インキュベートしてもよく、その後、樹脂は、例えばジクロロメタンまたは NMP で洗浄してもよい。一実施形態では、樹脂は NMP で洗浄する。振盪および溶液中への不活性ガスのバブリングを行ってもよい。

【0182】

本開示の安定化（例えば、ステープル）ポリペプチドの特性は、例えば、例として、国際公開第 WO2019/118893 号に記載される方法を使用して、アッセイすることができ、これは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0183】

VIII. リンカー

上述の構築物において使用することができるリンカーに関しては、特に制限はない。一

10

20

30

40

50

部の実施形態では、リンカーは、アミノ酸、例えばアミノプロピオン酸、アミノブタン酸、アミノペンタン酸、またはアミノヘキサン酸である。一部の実施形態では、リンカーは、オリゴエチレングリコール、すなわち、 $\text{NH}_2 - (\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O})_x - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$ である。一部の実施形態では、リンカーはペプチドリンカーである。一部の実施形態では、約1から30個の残基（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30個のアミノ酸）を含む任意の（any arbitrary）単鎖ペプチドをリンカーとして使用することができる。他の実施形態では、リンカーは、10から20、10から30、10から40、10から50、10から60、10から70、10から80、10から90、10から100、10から144、または10から150個のアミノ酸長である。ある特定の場合では、リンカーは、グリシンおよび／またはセリン残基のみを含む。そのようなペプチドリンカーの例としては、Gly、Ser；GlySer；GlyGlySer；SerGlyGly；GlyGlyGlySer（配列番号16）；SerGlyGlyGly（配列番号17）；GlyGlyGlyGlySer（配列番号18）；SerGlyGlyGlyGly（配列番号19）；GlyGlyGlyGlyGlySer（配列番号20）；SerGlyGlyGlyGlyGly（配列番号21）；GlyGlyGlyGlyGlyGlySer（配列番号22）；SerGlyGlyGlyGlyGlyGly（配列番号23）；（GlyGlyGlyGlySer）_n（配列番号24）_n（ここで、nは1またはそれよりも多い整数である）；および（SerGlyGlyGlyGly）_n（配列番号25）_n（ここで、nは1またはそれよりも多い整数である）がある。一部の場合では、リンカーは、リンカーの各コピーにおけるセリン残基が別のアミノ酸で置き換えられていることを除いて、配列番号16のアミノ酸配列の複数のコピー（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10コピー）を有する。

10

20

30

40

50

【0184】

一部の実施形態では、リンカーは、ペプチドリンカー、化学リンカー、グリシン-セリンリンカー、（G4S）₃（配列番号26）、（G4S）₅（配列番号27）、ベーターアラニン（Z）リンカー、ベーターアラニンおよびアラニン（ZA）リンカー、またはポリエチレングリコールリンカーである。一部の実施形態では、リンカーは、ベーターアラニンを含む。別の実施形態では、リンカーは、ベーターアラニンおよびアラニンリンカーを含む。

【0185】

他の実施形態では、リンカーペプチドは、（従来のGly／Serリンカーペプチドリピートのジャンクションにおいて生じる）アミノ酸配列GSGが存在しないように改変される。例えば、ペプチドリンカーは、（GGGX₁X₂）_nGGGGS（配列番号28）およびGGGGS（XGGGS）_n（配列番号29）（ここで、Xは、配列へ挿入することができ、配列GSGを含むポリペプチドはもたらさない任意のアミノ酸であり、nは0から4である）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、リンカーペプチドの配列は、（GGGX₁X₂）_nGGGGS（ここで、X₁はPであり、X₂はSであり、nは0から4である）（配列番号30）である。別の実施形態では、リンカーペプチドの配列は、（GGGX₁X₂）_nGGGGS（ここで、X₁はGであり、X₂はQであり、nは0から4である）（配列番号31）である。別の実施形態では、リンカーペプチドの配列は、（GGGX₁X₂）_nGGGGS（ここで、X₁はGであり、X₂はAであり、nは0から4である）（配列番号32）である。更に別の実施形態では、リンカーペプチドの配列は、GGGGS（XGGGS）_n（ここで、XはPであり、nは0から4である）（配列番号33）である。一実施形態では、本発明のリンカーペプチドは、アミノ酸配列（GGGGA）₂GGGGS（配列番号34）を含むか、またはそれからなる。別の実施形態では、リンカーペプチドは、アミノ酸配列（GGGGQ）₂GGGGS（配列番号35）を含むかまたはそれからなる。更に別の実施形態では、リンカーペプチドは、アミノ酸配列（GGGPS）₂GGGGS（配列番号36）を含むかまたはそれから

なる。さらなる実施形態では、リンカーペプチドは、アミノ酸配列 G G G G S (P G G G S)₂ (配列番号 37) を含むかまたはそれからなる。

【0186】

ある特定の実施形態では、リンカーは、合成化合物リンカー（化学的架橋剤）である。市場で入手可能な架橋剤の例としては、N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS)、ジスクシンイミジルスベレート (DSS)、ビス（スルホスクシンイミジル）スベレート (BS3)、ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート） (DSP)、ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート） (DTSSP)、エチレングリコールビス（スクシンイミジルスクシネート） (EGS)、エチレングリコールビス（スルホスクシンイミジルスクシネート） (スルホ-EGS)、酒石酸ジスクシンイミジル (DST)、酒石酸ジスルホスクシンイミジル（スルホ-DST）、ビス [2-（スクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル] スルホン (BSOCOS)、およびビス [2-（スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル] スルホン（スルホ-BSOCOS）がある。

10

【0187】

ある特定の実施形態では、リンカーは、図7で図示するリンカーである。

【0188】

IX. Mpro 阻害剤ペプチド

本開示は、配列番号2または3に記載の配列を有する新規なペプチドであって、Mpro に結合し、それを阻害する（例えば、Mpro 二量体化および／またはMpro 酵素活性を阻害する）ことができ、それによって、ウイルス（例えば、コロナウイルス）の成熟および／または複製を阻害することができる、ペプチドを特徴とする。本開示はまた、バリエーション、例えば、配列番号2または3とは、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、または13個のアミノ酸が異なる配列も特徴とし、ここで、バリエーションは、Mpro を阻害する。一部の 경우에는、ペプチドは、配列番号2または3におけるアミノ酸に対して、少なくとももしくは約30%、少なくとももしくは約40%、少なくとももしくは約50%、少なくとももしくは約60%、少なくとももしくは約70%、少なくとももしくは約75%の同一性、少なくとももしくは約80%、少なくとも85%、少なくとももしくは約90%、少なくとももしくは約95%、少なくとももしくは約98%、少なくとももしくは約99%、または100%の同一性を有し得、ここで、ペプチドは、Mpro に結合し、Mpro 二量体化および／またはMpro 酵素活性を阻害する。一部の 경우에는、これらのペプチドは、コロナウイルス（例えば、SARS-CoV2）活性を阻害する（例えば、ウイルスの成熟および複製を阻害する）。

20

30

【0189】

一部の 実施形態では、Mpro 阻害剤ペプチドは、組換えまたは合成により産生されたペプチドである。そのようなペプチドは、ペプチドが本明細書に記載するようにMpro と相互作用し、その二量体化および／または酵素活性を阻害する限り、非架橋であっても、ステーブル化されていても、ステッチ化されていてもよい。ある特定の実施形態では、ペプチドは、それらが、1～5個（例えば、1個、2個、3個、4個、5個）のアミノ酸置換を有することで配列番号2または3から変動しているという点で、配列番号2または3のペプチドとは異なる。一部の 場合には、オレフィン側鎖を有する非天然アミノ酸（例えば、S5）が、配列番号2の3位および7位に挿入される。一部の 場合には、オレフィン側鎖を有する非天然アミノ酸（例えば、S5）が、配列番号2の11位および15位に挿入される。ある特定の 場合には、オレフィン側鎖を有する非天然アミノ酸（例えば、S5）が、配列番号2の3位および7位、ならびに11位および15位に挿入される。これらのステーブルペプチドのそれぞれは、これらのステーブルペプチドが、Mpro に結合しそれを阻害するその能力を保持する限り、1個、2個、3個、4個、または5個のアミノ酸置換をさらに含み得る。例えば、「X」とラベル付けされた位置は、配列番号2または3において、以下のように置換され得る：A T X N V L X W L Y X A V I X G D（配列番号51）。Xは、保存的アミノ酸残基であってもよく、または非保存的アミノ酸残基で

40

50

あってもよい。一部の実施形態では、「X」は、非天然アミノ酸、例えば、(S)-2-(4'-ペンテニル)アラニン(S5)である。それらの実施形態では、ペプチドは、i位とi+4位との間で単一ステープル化または二重ステープル化されていてもよい。

【0190】

Mprの酵素活性は、アルファヘリックス配列TVNVLAWLYAAVINGD(配列番号9)によって媒介されるホモ二量体を形成することに依存する。配列番号9は、ペプチドをベースとした二量体化阻害剤を作製するために使用することができる。一部の 경우에는、Mpr阻害剤ペプチドは、少なくとも6個(例えば、配列番号9の7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、または16個の連続したアミノ酸)を含み得る。一部の 경우에는、Mpr結合剤ペプチドは、例えば、配列番号9とは、1個、2個、3個、4個、5個、または6個のアミノ酸置換、欠失、および/または挿入によって異なる、配列番号9のバリエーションであってもよく、ここで、バリエーションは、依然としてMprと二量体を形成することができる。

10

【0191】

一部の実施形態では、Mpr阻害剤ペプチドは、例えば、配列番号2または3のアミノ酸配列を含み得るか、それからなり得るか、またはそれから本質的になり得る。一部の実施形態では、ペプチドは、例えば、配列番号2または3のアミノ酸配列の一部分または複数の部分と関連するか、またはそれに対して同一性を有する、アミノ酸配列を含み得るか、それからなり得るか、またはそれから本質的になり得る。

【0192】

あるいは、またはさらに、ペプチドは、保存的であるかどうかにかかわらず、アミノ酸置換および/または欠失を含み得る。例えば、ペプチドは、保存的であるかどうかにかかわらず、0個、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個未満、5個未満、4個未満、3個未満、または2個未満のアミノ酸置換、欠失、および/または付加を含み得るが、ただし、ペプチドが依然としてMprに結合し、その二量体化および/または酵素活性を阻害することができることを条件とする。したがって、本明細書において開示されるMpr阻害剤ペプチドのうちのいずれのアミノ酸配列も、バリエーションペプチドがMprに結合し、それを阻害する限り、変動し得る。

20

【0193】

X.NSP9阻害剤ペプチド

本開示は、配列番号4または5に記載の配列を有する新規なペプチドであって、NSP9に結合し、それを阻害する(例えば、NSP9二量体化および/またはNSP9酵素活性を阻害する)ことができ、それによって、ウイルス(例えば、コロナウイルス)の成熟および/または複製を阻害することができる、ペプチドを特徴とする。一部の実施形態では、NSP9阻害剤ペプチドは、組換えまたは合成により産生されたペプチドである。そのようなペプチドは、ペプチドが本明細書に記載するようにNSP9と相互作用する限り、非架橋であっても、ステープル化されていても、ステッチ化されていてもよい。

30

【0194】

NSP9の酵素活性は、アルファヘリックス配列NLNRGMVLGSLAATVRLQ(配列番号10)によって媒介されるホモ二量体を形成することに依存する。配列番号10は、ペプチドをベースとした二量体化結合剤を作製するために使用することができる。一部の 경우에는、NSP9阻害剤ペプチドは、少なくとも6個(例えば、配列番号10の7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、または18個の連続したアミノ酸)を含み得る。一部の 경우에는、NSP9阻害剤ペプチドは、バリエーションペプチドが依然としてNSP9に結合し、それを阻害する限り、配列番号10において少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、または8個のアミノ酸置換または欠失を含み得る。一部の 경우에는、NSP9阻害剤ペプチドは、配列GX XXG(配列番号8)を含む。

40

【0195】

一部の実施形態では、NSP9阻害剤ペプチドは、例えば、配列番号4または5のアミ

50

ノ酸配列を含み得るか、それからなり得るか、またはそれから本質的になり得る。一部の
実施形態では、ペプチドは、例えば、配列番号 4 または 5 のアミノ酸配列の一部分または
複数の部分と関連するか、またはそれに対して同一性を有する、アミノ酸配列を含み得る
。

【0196】

一部の場合では、ペプチドは、配列番号 4 または 5 におけるアミノ酸に対して、少なく
とももしくは約 30 %、少なくとももしくは約 40 %、少なくとももしくは約 50 %、少
なくともしくは約 60 %、少なくともしくは約 70 %、少なくともしくは約 80 %
、少なくとも 85 %、少なくともしくは約 90 %、少なくともしくは約 95 %、少な
くともしくは約 98 %、少なくともしくは約 99 %、または 100 % の同一性を有し
得、ここで、ペプチドは、NSP9 に結合する。あるいは、またはさらに、ペプチドは、
保存的であるかどうかにかかわらず、アミノ酸置換および／または欠失を含み得る。例え
ば、アミノ酸は、保存的であるかどうかにかかわらず、0 個、1 個、2 個、3 個、4 個、
5 個、6 個、7 個、8 個、10 個未満、5 個未満、4 個未満、3 個未満、または 2 個未満
のアミノ酸置換、欠失、および／または付加を含み得る。したがって、本明細書において
開示される NSP9 阻害剤ペプチドのアミノ酸配列は、バリエーションペプチドが依然として
NSP9 に結合し、それを阻害する限り、変動し得る。

10

【0197】

一部の場合では、配列番号 4 もしくは 5 の NSP9 阻害剤ペプチドまたはそれらのバリ
アントは、配列のそれぞれの末端において、1 個、2 個、または 3 個のアミノ酸だけ短縮
されていてもよい。他の場合では、配列番号 4 もしくは 5 の NSP9 阻害剤ペプチドまた
はそれらのバリエーションは、ステープルを含まなくてもよく、1 つのステープル（例えば、
S5 と S5 との間（ i ， $i+4$ 位）、R8 と S5 との間（ i ， $i+7$ 位）、または S5 と
R8 との間（ i ， $i+7$ ）に形成されるステープル）を含んでもよく、または二重ステ
ープル化されていてもよい。ある特定の実施形態では、ペプチドは、それらが、1～4 個（
例えば、1 個、2 個、3 個、4 個）のアミノ酸置換を有することで配列番号 4 または 5 か
ら変動しているという点で、配列番号 4 または 5 のペプチドとは異なる。例えば、「X」
とラベル付けされた位置は、配列番号 4 において、以下のように置換され得る：ANLN
AGBX LGSXAATVELQ（配列番号 52）。X は、保存的アミノ酸残基であって
もよく、または非保存的アミノ酸残基であってもよい。一部の実施形態では、「X」は、
非天然アミノ酸、例えば、（S）-2-（4'-ペンテニル）アラニン（S5）である。
それらの実施形態では、ペプチドは、 i 位と $i+4$ 位との間で単一ステープル化され得る
。一部の場合では、必要とされるコアペプチド配列は、GX₁X₂X₃G モチーフ（配列
番号 8）であり、X₁、X₂、および X₃ は、任意のアミノ酸であり得る。一部の場合で
は、X₁=M、ノルロイシン（B）、A、または G であり、X₂=V、A、G、M、また
は B であり、X₃=L、A、G、V、または I である。

20

30

【0198】

XI. 処置の方法

本明細書において開示されるキメラは、キメラ分子が結合する標的タンパク質（例えば
、ウイルスタンパク質、例えば、コロナウイルスプロテアーゼ、コロナウイルス NSP、
または宿主 BET タンパク質）の分解を促進することができる。ある特定の場
合では、本開示のキメラによって分解されるタンパク質は、コロナウイルス PLp
タンパク質である。一部の場合では、コロナウイルス Mpro タンパク質は、本開示のキメラ
によって分解される。他の場合では、コロナウイルス NSP9 タンパク質は、本開示のキメラ
によって分解される。ある特定の場
合では、コロナウイルス Mpro タンパク質は、本開示のキメラによって分解される。さら
に他の場合では、宿主 BRD2 タンパク質は、本開示のキメラによって分解される。一部
の場合では、宿主 BRD3 タンパク質は、本開示のキメラによって分解される。さらに一
部の場合では、宿主 BRD4 タンパク質は、本開示のキメラによって分解される。コ
ロナウイルスプロテアーゼ、コロナウイルス NSP、および／または宿主 BET タン
パク質の分解は、例えば、コロナウイルス感染症を処置すること

40

50

、コロナウイルス複製を阻害すること、コロナウイルス負荷を低減すること、コロナウイルス感染症または疾患（例えば、COVID-19）と関連する症状を処置すること、ウイルス病原性を低減すること、コロナウイルスクリアランスまでの時間を低減すること、およびコロナウイルス感染症を有する対象の臨床転帰における死亡率を低減することにおいて、有用である。本開示のキメラは、個体がコロナウイルス疾患（例えば、SARSまたはCOVID-19）を発症するであろう危険性を低減する方法を、さらに提供する。一部の 경우에는、本開示のキメラでのコロナウイルス感染症の処置は、症状、例えば、発熱および悪寒、咳嗽、息切れまたは呼吸困難、疲労、筋肉痛または体の痛み、頭痛、味覚または嗅覚の喪失、咽喉痛、鼻詰まりまたは鼻水、吐き気または嘔吐、ならびに下痢を低減させる。

10

【0199】

本開示は、RNAウイルス（例えば、コロナウイルス、例えば、SARS-CoV2）によって引き起こされる感染症または疾患の予防および／または処置を、それを必要とする対象（例えば、ヒト対象）において行うために、本明細書に記載するキメラのいずれかを使用する方法を特徴とする。本明細書で使用される場合、「処置する」、「処置すること」などの用語は、対象が患う疾患または状態を軽減する、阻害する、または好転させる（ameliorate）ことを指す。例えば、本開示のキメラは、SARS-CoV2によって引き起こされるCOVID-19を処置するために使用することができる。本開示はまた、疾患（例えば、COVID-19）またはその症状を、完全にまたは部分的に予防する方法も特徴とする。

20

【0200】

本開示は、既知のまたは疑いのあるコロナウイルスへの曝露の後に、コロナウイルス感染症の臨床徴候を呈する対象（例えば、ヒト、霊長類、コウモリ、トリ、マウス、シチメンチョウ、ウシ、ブタ、ネコ、イヌなど）におけるコロナウイルス（例えば、SARS-CoV-2）感染症を治療的に処置する方法をさらに提供する。コロナウイルス感染症と診断されている個体と濃厚接触している対象、および発熱（38℃を超えることが多い）、悪寒、咳嗽、息切れまたは呼吸困難、疲労、筋肉痛または体の痛み、頭痛、味覚喪失、嗅覚喪失、咽喉痛、鼻詰まりまたは鼻水、吐き気または嘔吐、下痢を含むがこれらに限定されない1つまたは複数の症状を呈する対象は、本開示の方法での処置に適格であると考えられる。主題の方法の利点は、コロナウイルス感染症の重症度が低減されること、例えば、ウイルス負荷が低減されること、および／またはウイルスクリアランスまでの時間が低減されること、および／または罹患率もしくは死亡率が低減されることである。

30

【0201】

一部の実施形態では、本開示は、コロナウイルス（例えば、SARS-CoV-2）感染症の処置または予防を、それを必要とするかまたはその危険性がある対象において行うための方法であって、対象に、本開示のキメラ組成物を、1つまたは複数の抗ウイルス薬、またはコルチコステロイド、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、デキサメタゾン、レムデシビル、IL-6阻害剤、IL-1阻害剤、キナーゼ阻害剤、補体阻害剤、イベルメクチン、ヒドロキシクロロキン、ファビピラビル、およびインターフェロナーベータを含むがこれらに限定されない他の薬剤と組み合わせて含む組成物を投与することによって行う、方法を提供する。

40

【0202】

本開示は、まだコロナウイルスに感染していない個体、および／またはコロナウイルス感染症に典型的な症状を呈していない個体において、コロナウイルス感染症を予防的に処置する方法を提供する。そのような個体としては、例えば、医療従事者、COVID-19を有する個体と限定された空間にいる人物（例えば、商用航空会社の職員、例えば、客室乗務員およびパイロット、旅行者、会議出席者など）、ならびにCOVID-19を有する個体と同じ世帯の居住者を含む、COVID-19を有する個体と接触したものが挙げられる。本開示の利点は、個体が病的なコロナウイルス感染症を発症するであろう危険性が低減されることである。

50

【0203】

本明細書で使用される場合、「コロナウイルス」という用語は、コロナウイルス科の任意のメンバーを含み、これには、コロナウイルス属の任意のメンバーが含まれるが、これらに限定されない。コロナウイルス属としては、アルファコロナウイルス (Alpha coronavirus) 株 (例えば、ヒトコロナウイルス 229E (HCoV-229E))、および HCoV-NL63)、ベータコロナウイルス (Betacoronavirus) 株 (例えば、HCoV-OC43、HCoV Hong Kong University 1 (HCoV-HKU1)、中東呼吸器症候群コロナウイルス (MERS-CoV)、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス (SARS-CoV)、および SARS-CoV-2)、ガンマコロナウイルス (Gammacoronavirus) (例えば、トリ伝染性気管支炎ウイルス、およびシチメンチョウコロナウイルス)、ならびにデルタコロナウイルス (Deltacoronavirus) 株 (例えば、ブタコロナウイルス HKU15、メジロコロナウイルス HKU16、スズメコロナウイルス HKU17、シキチョウコロナウイルス HKU18、ゴイサギコロナウイルス HKU19、ヒドリガモコロナウイルス HKU20、およびバンコロナウイルス HKU21) が挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、対象は、SARS-CoV-2 に感染しており、本開示のキメラで処置され得る。「コロナウイルス」という用語は、さらに、天然に存在する (例えば、野生型) コロナウイルス、天然に存在するコロナウイルスバリエーション、および研究室において生成されたコロナウイルスバリエーション (選択によって生成されたバリエーション、化学的改変によって生成されたバリエーション、および遺伝子改変されたバリエーション (例えば、組換え DNA 方法によって研究室において改変されたコロナウイルス) を含む) を含む。

10

20

【0204】

一般的に、方法は、対象を選択すること、および例えば、医薬組成物中のまたは医薬組成物としての、有効量の 1 つまたは複数の本開示のキメラを対象に投与すること、ならびにコロナウイルス感染症、例えば、SARS または COVID-19 の予防または処置に必要とされるように必要に応じて投与を反復することを含み、経口、静脈内、局所、頬内、直腸、非経口、腹腔内、皮内、皮下、筋肉内、経皮、鼻内、肺、または気管内で投与してもよい。対象は、例えば、対象がコロナウイルス感染症を有すること、または有すると疑われることを決定することに基づいて、処置に選択してもよい。

30

【0205】

任意の特定の患者に関する特異的投薬量および処置レジメンは、さまざまな因子に左右されることになり、その因子としては、用いられる特定の化合物の活性、年齢、体重、一般的な健康状態、性別、食事、投与時間、排泄速度、薬物の組合せ、疾患、状態または症状の重症度および経過、疾患に対する患者の傾向、状態または症状、ならびに処置する医師の判断がある。

【0206】

有効量は、1 回または複数回の投与、適用または投薬として投与してもよい。治療有効量の治療化合物 (すなわち、有効投薬量) は、選択される治療化合物に依存する。組成物は、1 日当たり 1 回または複数回から 1 週当たり 1 回または複数回、投与することができ、隔日で 1 回を含む。当業者であれば、これらに限定されないが、疾患または障害の重症度、治療歴、対象の全身的な健康および／または年齢、ならびに存在する他の疾患を含むある特定の因子が、対象を効果的に処置するために必須の投薬量およびタイミングに影響を与えることがあることは理解するであろう。更に、本明細書において記載する治療有効量の治療化合物を用いた対象の処置は、単回の処置または一連の処置を含んでいてもよい。例えば、有効量を、少なくとも一回投与してもよい。

40

【0207】

一部の実施形態では、本開示のキメラおよび処置の方法は、予防的に使用される。例えば、本方法は、コロナウイルス感染症に易罹患性であるかまたは罹患する危険性にあると決定された対象に、本明細書に記載するキメラおよび／またはキメラを含む組成物を投与

50

するステップを含む。

【0208】

一部の実施形態では、本明細書に記載するキメラは、コルチコステロイド、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、デキサメタゾン、レムデシビル、IL-6阻害剤、IL-1阻害剤、キナーゼ阻害剤、補体阻害剤、イベルメクチン、ヒドロキシクロロキン、ファビピラビル、インターフェロナーベータ、およびイカチバントを含むリストから選択される1つまたは複数の薬剤を含む、ウイルス感染症を処置するための1つまたは複数の公知かつ好適な医薬品と組み合わせて投与され得る。その文脈において、1つまたは複数の薬剤および本開示のキメラは、キメラを含む組成物と、同時に、または逐次的に、すなわち、単一の製剤として、または一緒にもしくは個々にのいずれかでパッケージングされた別個の製剤として、投与され得る。

10

【0209】

一部の実施形態では、本開示のキメラは、図1および図12A～Cに示されるように、ウイルスの複製および／または病原性に必要な標的タンパク質（例えば、PLproタンパク質またはBRD）を相乗的に分解すること、および宿主細胞におけるp53レベルを増加させることによって、二重の作用を有し得る。実施例4も参照されたい。さらに、PLproは、宿主免疫系を回避するウイルス機序にも関与するため、本開示のキメラは、ウイルス複製の遮断、および感染細胞を殺滅させる免疫系の能力の回復の両方を行うことができる。

20

【0210】

XII. 医薬組成物

本明細書において記載する1個または複数の安定化ペプチドまたはキメラのうちのいずれかは、医薬組成物としてまたはそれにおいて使用するために製剤化することができる。そのような組成物は、任意の経路、例えば食品医薬品局（FDA）によって承認された任意の経路を介した対象への投与のために、製剤化するかまたは適応させることができる。例示的な方法は、FDAのCDER Data Standards Manual第004版（[fda.give/cder/dsm/DRG/drg00301.htm](https://www.fda.gov/cder/dsm/DRG/drg00301.htm)において利用可能である）に記載されている。例えば、組成物は、経口、静脈内、局所、頬内、直腸、非経口、腹腔内、皮内、皮下、筋肉内、経皮、鼻内、肺、または気管内経路による投与のために製剤化または適合され得る。これらの経路には、吸入（例えば、経口および／または鼻吸入（例えば、ネブライザーまたはスプレーを介した））、注射（例えば、静脈内、動脈内、真皮下（subdermally）、腹腔内、筋肉内、および／または皮下）；および／または経口投与、経粘膜投与、および／または局所投与（局所（例えば、鼻）スプレーおよび／または液剤を含む）が含まれる。本開示の組成物は、体重1kg当たり約0.001～約100mgの範囲の投薬量で、または特定の薬物の要件に応じて、投与され得る。あるいは、またはさらに、組成物は、例えば、FDA Data Standards Manual (DSM) (www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/FormsSubmissionRequirements/ElectronicSubmissions/DataStandardsManualmonographsにおいて入手可能）において記載されている、食品医薬品局に承認されている方法のいずれかに従って投与され得る。

30

40

【0211】

典型的には、本開示の医薬組成物は、1日当たり約1～約6回、または代替的には連続的な注入として、投与される。そのような投与は、慢性的または急性的な治療として使用することができる。単回剤形を産生するために担体材料と組み合わされ得る活性成分の量は、処置される宿主および具体的な投与様式に応じて変動するであろう。典型的な調製物は、約5%～約95%の活性キメラ（重量／重量）を含むであろう。あるいは、そのような調製物は、約20%～約80%の活性キメラを含む。

【0212】

一部の実施形態では、本開示のキメラの有効用量としては、例えば、静脈内で投与され

50

る、例えば、約0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1、もしくは10~10000；0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1、もしくは10~5000；0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1、もしくは10~2500；0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1、もしくは10~1000；0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1、もしくは10~900；0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1、もしくは10~800；0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1、もしくは10~700；0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1、もしくは10~600；0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1、もしくは10~500；0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1、もしくは10~400；0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1、もしくは10~300；0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1、もしくは10~200；0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1、もしくは10~100；0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1、もしくは10~90；0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1、もしくは10~80；0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1、もしくは10~70；0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1、もしくは10~60；0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1、もしくは10~50；0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1、もしくは10~40；0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1、もしくは10~30；0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1、もしくは10~20；0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1、もしくは10~30；0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1、もしくは10~15、0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1、もしくは10~30；0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1、もしくは10~10、0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1、もしくは10~30；または0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1~5mg/kg/日を挙げることができるが、これらに限定されない。

10

20

30

【0213】

上記で引用されたものよりも低いかまたは高い用量が、必要とされる場合がある。任意の特定の対象に関する特異的投薬量および処置レジメンは、さまざまな因子に左右されることになり、その因子としては、用いられる特定のキメラの活性、年齢、体重、一般的な健康状態、性別、食事、投与時間、排泄速度、薬物の組合せ、疾患、状態または症状の重症度および経過、疾患に対する対象の傾向、状態または症状、ならびに処置する医師の判断がある。

【0214】

患者の状態の改善に応じて、維持用量の本開示のキメラ、組成物、または組合せが、必要に応じて、投与され得る。続いて、投薬量または投与の頻度、またはその両方が、症状の関数として、改善された状態が保持されるレベルまで、低減され得る。対象は、しかしながら、疾患症状の任意の再発時には、長期間の間欠的な処置を必要とし得る。

40

【0215】

本開示の組成物におけるキメラは、選択的な生物学的特性を強化するために適切な機能性を付加することによって、改変され得る。そのような改変は、当該技術分野において公知であり、これには、所与の生物学的コンパートメント（例えば、血液、リンパ系、中枢神経系）への生物学的浸透を増加させ、経口アベイラビリティを増加させ、溶解度を増加させて注射による投与を可能にし、代謝を変化させ、排出の速度を変化させるものが含まれる。

【0216】

50

一部の場合では、医薬組成物は、有効量の1個または複数のキメラを含んでいてもよい。「有効量」および「処置に有効な」という用語は、本明細書で使用される場合、意図する効果または生理学的アウトカムをもたらすためのその投与（例えば、コロナウイルス感染症の処置）の背景内で有効な期間（急性または慢性投与および周期的または連続的投与を含む）で利用される、本明細書において記載する1個または複数のキメラまたは医薬組成物の量または濃度を指す。本明細書に記載する1つまたは複数のキメラまたは医薬組成物の有効量としては、標的タンパク質（例えば、コロナウイルスP L p r o、コロナウイルスM p r o、コロナウイルスN S P 9、コロナウイルスN S P 1 2、宿主B R D 2、宿主B R D 3、または宿主B R D 4）のレベルの減少、ならびに／または細胞における宿主p 5 3レベル（例えば、タンパク質レベル）および／もしくはp 5 3活性（例えば、生物学的活性）の増加を促進する量が挙げられる。キメラの治療有効量は、状態（例えば、C O V I D - 1 9）を治癒することを要求されるものではないが、状態の処置を提供するであろう。

10

【0217】

本開示の医薬組成物は、1つまたは複数のキメラ、ならびに任意の薬学的に許容される担体および／またはビヒクルを含んでいてもよい。一部の場合では、医薬組成物は、疾患または感染症（例えば、C O V I D - 1 9）または疾患の症状のモジュレーションまたは好転を達成するために有効な量で、1つまたは複数の追加の治療剤をさらに含み得る。1つまたは複数の治療剤としては、コルチコステロイド、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、デキサメタゾン、レムデシビル、I L - 6 阻害剤、I L - 1 阻害剤、キナーゼ阻害剤、補体阻害剤、イベルメクチン、ヒドロキシクロロキン、ファビピラビル、インターフェロナーベータ、およびイカチバントが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0218】

「薬学的に許容される担体」という用語は、本開示のキメラとともに対象に投与してもよく、その薬理学的活性を破壊せず、治療量のキメラを送達するのに十分な用量で投与した場合に非毒性である担体またはアジュバントを指す。

【0219】

本開示の医薬組成物において使用してもよい薬学的に許容される担体、アジュバントおよびビヒクルとしては、これらに限定されるものではないが、イオン交換剤、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、自己乳化薬物送達系（S E D D S）、例えばd - α - トコフェロールポリエチレングリコール1000スクシネート、医薬品投薬形態において使用する界面活性剤、例えばT w e e n（登録商標）または他の同様の高分子送達マトリックス、血清タンパク質、例えばヒト血清アルブミン、緩衝物質、例えばホスフェート、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物脂肪酸の部分的グリセリド混合物、水、塩または電解質、例えば硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイドシリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロース系物質、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリレート、ワックス、ポリエチレンーポリオキシプロピレンーブロックポリマー、ポリエチレングリコール、および羊毛脂がある。シクロデキストリン、例えば α -、 β -、および γ - シクロデキストリンも、本明細書において記載するキメラの送達を強化するために有利に使用してもよい。

30

40

【0220】

本開示のキメラの薬学的に許容される塩には、薬学的に許容される無機および有機酸および塩基に由来するものが含まれる。好適な酸性塩の例としては、酢酸塩、アジピン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、酪酸塩、クエン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、グリコール酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2 - ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、パモ酸塩（p a l m o a t e）、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、サリチル酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、トシル酸塩、トリフルオロメチルスルホン酸塩、およ

50

びウンデカン酸塩が挙げられる。適切な塩基に由来する塩としては、アルカリ金属（例えば、ナトリウム）塩、アルカリ土類金属（例えば、マグネシウム）塩、アンモニウム塩、およびN-（アルキル）4+塩が挙げられる。

【0221】

本開示の医薬組成物は、任意の従来の非毒性の薬学的に許容される担体、アジュバントまたはビヒクルを含んでいてもよい。一部の場合では、製剤のpHは、キメラまたはその送達形態の安定性を強化するための薬学的に許容される酸、塩基または緩衝剤を用いて調整してもよい。非経口という用語は、本明細書で使用される場合、皮下、皮内、静脈内、筋肉内、関節内、動脈内、滑膜内、胸骨内、髄腔内、病変部内および頭蓋内注射または注入技術を含む。

10

【0222】

医薬組成物は、吸入および／または経鼻投与のための液剤または散剤の形態であってもよい。そのような組成物は、好適な分散剤または湿潤剤（例えば、Tween（登録商標）80）および懸濁化剤を使用して、当技術分野において公知の技術に従って製剤化してもよい。例えば、そのような組成物は、ベンジルアルコールもしくは他の好適な防腐剤、バイオアベイラビリティを強化するための吸収促進剤、フルオロカーボン、および／または当技術分野において公知の他の可溶化剤もしくは分散剤を用いて、食塩水中の液剤として調製してもよい。

【0223】

医薬組成物は、非毒性非経口で許容される希釈剤または溶媒中の、例えば1,3-ブタンジオール中の溶液として注射用滅菌液剤または懸濁剤などの注射可能な滅菌調製物の形態であってもよい。用いてもよい許容されるビヒクルおよび溶媒のうちの1つは、マンニトール、水、リンゲル溶液および等張塩化ナトリウム溶液である。更に、滅菌、固定油を、溶媒または懸濁媒体として慣例的に用いる。この目的のために、合成モノまたはジグリセリドを含む任意の無菌固定油を用いてもよい。脂肪酸、例えばオレイン酸およびそのグリセリド誘導体は、注射可能な調製物において有用であり、天然の薬学的に許容される油、例えば特にそのポリオキシエチル化型のオリーブ油またはヒマシ油も同様である。これらの油性液剤または懸濁剤には、長鎖アルコール希釈剤もしくは分散剤、またはカルボキシメチルセルロース、または薬学的に許容される投薬形態の製剤、例えばエマルションおよび／もしくは懸濁剤において通常使用する同様の分散剤も含まれる場合がある。他の通常使用する界面活性剤、例えばTween（登録商標）またはSpan（登録商標）および／または薬学的に許容される固形剤、液剤、もしくは他の投薬形態の製造において通常使用する他の同様の乳化剤もしくはバイオアベイラビリティ促進剤も、製剤の目的で使用してもよい。

20

30

【0224】

医薬組成物は、任意の経口で許容される投薬形態で、経口で投与することができ、その投薬形態としては、これらに限定されないが、カプセル剤、錠剤、エマルション剤および水性懸濁剤、分散剤および液剤がある。経口使用のための錠剤の場合、通常使用される担体としては、ラクトースおよびコーンスターチがある。滑沢剤、例えばステアリン酸マグネシウムも通常添加される。カプセル剤形態での経口投与に関しては、有用な希釈剤としては、ラクトースおよび乾燥コーンスターチがある。水性懸濁剤および／またはエマルション剤が経口で投与される場合、活性成分は、乳化剤および／または懸濁化剤と組み合わせることで油性相中に懸濁するかまたは溶解してもよい。必要に応じて、ある特定の甘味料および／または香味料および／または着色剤を添加してもよい。

40

【0225】

本開示の医薬組成物はまた、直腸投与のために坐剤の形態で投与されてもよい。これらの組成物は、本開示のキメラを、室温では固体であるが直腸温度では液体であり、したがって、直腸内で融解して活性成分を放出する、好適な非刺激性賦形剤と混合することによって、調製することができる。そのような材料としては、例えば、カカオバター、蜜蝋、およびポリエチレングリコールが挙げられるが、これらに限定されない。

50

【0226】

本開示の組成物が、本明細書に記載するキメラと1つまたは複数の追加の治療剤または予防剤との組合せを含む場合、キメラおよび追加の薬剤のいずれも、単剤療法レジメンにおいて通常投与される投薬量の約1～100%、より好ましくは約5～95%の投薬量レベルで存在すべきである。追加の薬剤は、例えば、複数回用量レジメンの一部として、本開示のキメラとは別個に投与され得る。あるいは、それらの薬剤は、単回剤形の一部として、本開示のキメラと一緒に単一の組成物に混合されてもよい。

【0227】

一部の場合では、本明細書において開示される1個または複数のキメラは、例えば、担体タンパク質にコンジュゲートすることができる。そのようなコンジュゲート組成物は、一価または多価であってもよい。例えば、コンジュゲート組成物は、担体タンパク質にコンジュゲートしている本明細書において開示される1個のペプチドを含んでいてもよい。あるいは、コンジュゲート組成物は、担体にコンジュゲートしている2個またはそれを超える本明細書において開示されるペプチドを含んでいてもよい。

10

【0228】

本明細書で使用される場合、2個の実体が互いに「コンジュゲート」している場合、これらは直接的または間接的な共有または非共有相互作用によって連結している。ある特定の実施形態では、会合は共有性である。他の実施形態では、会合は非共有性である。非共有相互作用としては、水素結合、ファンデルワールス相互作用、疎水性相互作用、磁性相互作用、静電的相互作用などがある。間接的共有相互作用は、2個の実体が共有的に連結されている場合、必要に応じてリンカー基を介する。

20

【0229】

担体タンパク質は、対象における免疫原性を増加させるかまたは強化する任意のタンパク質を含んでいてもよい。例示的な担体タンパク質は、当技術分野において記載されている（例えば、Fattom et al., Infect. Immun., 58: 2309-2312, 1990; Devi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7175-7179, 1991; Li et al., Infect. Immun. 57: 3823-3827, 1989; Suzuet al., Infect. Immun. 59: 4555-4561, 1991; Suzuet al., J. Exp. Med. 166: 1510-1524, 1987; および Suzuet al., Infect. Immun. 62: 4440-4444, 1994を参照のこと）。高分子担体は、1個または複数の第1級および／または第2級アミノ基、アジド基、またはカルボキシル基を含む天然または合成材料であってもよい。担体は、水溶性であってもよい。

30

【0230】

一部の実施形態では、本開示は、本明細書において開示されるキメラ（以下で「X」として示される）のうちのいずれか1つまたは複数の、以下の方法において使用するための方法を提供する。

【0231】

本明細書において開示される1つまたは複数の状態（例えば、COVID-19、以下の例において「Y」として言及される）の処置において医薬品として使用するためのキメラX。Yの処置のための医薬品の製造のためのキメラXの使用、およびYの処置において使用するためのキメラX。

40

【表 4 - 1】

表 4:配列表

配列 番号	説明	配列
1	HDM2 結合性ペ プチド SP645	LTF(R8)EYWAQL(S5)SAA
2	Mpro 結合性ペ プチド	ATVNVLAWLAAVINGD
3	Mpro 結合性ペ プチド	ATVNVLAWLX ₁ AVIX ₂ GD
4	NSP9 結合性ペ プチド	ANLNAGBX ₁ LGSX ₂ AATVELQ
5	NSP9 結合性ペ プチド	ANLNRGBX ₁ LGSX ₂ AATVRLQ
6	Trib1	DQIVPEY
7	ATSP-7041	LTF(R8)EYWAQ#(S5)SAA
8	NSP9 モチーフ	GXXXG
9	Mpro アルファヘ リックス配列	TVNVLAWLAAVINGD
10	NSP9 アルファ ヘリックス配列	NLNRMVLGSLAATVRLQ
11	野生型ヒト p53 aa 14-29	LSQETFSDLWKLLPEN
12	VHL 結合性ペプ チド	LAPAAGDTIISLDF
13	VHL 結合性ペプ チド	LAPYIPMDDDFQL
14	MDM2_SWIB モ チーフパターン	F[[^] P]{3}W[[^] P]{2,3}[VIL]
15	ODPH_VHL_1 モ チーフパターン	[IL]A(P).[6,8][FLIVM].[FLIVM]
16	リンカー配列	GGGS
17	リンカー配列	SGGG
18	リンカー配列	GGGGS
19	リンカー配列	SGGGG

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

配列番号	説明	配列
20	リンカー配列	GGGGGS
21	リンカー配列	SGGGGG
22	リンカー配列	GGGGGGGS
23	リンカー配列	SGGGGGGG
24	リンカー配列	(GGGGGS) _n 、式中、n=1 またはそれよりも大きい
25	リンカー配列	(SGGGG) _n 、式中、n=1 またはそれよりも大きい
26	リンカー配列	GGGGSGGGSGGGGS
27	リンカー配列	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
28	リンカー配列	(GGGXX) _n GGGGS
29	リンカー配列	GGGGS(XGGGS) _n
30	リンカー配列	(GGGX ₁ X ₂) _n GGGGS、式中、X ₁ はPであり、X ₂ はSであり、nは0~4である
31	リンカー配列	(GGGX ₁ X ₂) _n GGGGS、式中、X ₁ はGであり、X ₂ はQであり、nは0~4である
32	リンカー配列	(GGGX ₁ X ₂) _n GGGGS、式中、X ₁ はGであり、X ₂ はAであり、nは0~4である
33	リンカー配列	GGGGS(XGGGS) _n 、式中、XはPであり、nは0~4である
34	リンカー配列	(GGGGA) ₂ GGGGS
35	リンカー配列	(GGGGQ) ₂ GGGGS
36	リンカー配列	(GGGPS) ₂ GGGGS
37	リンカー配列	GGGGS(PGGGS) ₂
38	p53 トランス活性化ドメイン配列	FSDLWKLL
39	PMI 12 ペプチド阻害剤	TSFAEYWNLLSP
40	SAH-p53-1	LSQETFSD(R8)WKLLPE(S5)
41	SAH-p53-2	LSQE(R8)FSDLWK(S5)LPEN
42	SAH-p53-3	LSQ(R8)TFSDLW(S5)LLPEN
43	SAH-p53-4	LSQETF(R8)DLWKLL(S5)EN
44	SAH-p53-5	LSQETF(R8)NLWKLL(S5)QN
45	SAH-p53-6	LSQQTF(R8)NLWRLL(S5)QN
46	SAH-p53-7	QSQQTF(R8)NLWKLL(S5)QN
47	SAH-p53-8	QSQQTF(R8)NLWRLL(S5)QN
48	SP645 バリエーション配列 1	X ₁ TF(R8)X ₂ YX ₃ AQX ₄ (S5)X ₅ AA
49	SP645 バリエーション配列 2	LTF(R5)EYWAQL(S8)SAA
50	ATSP-7041 バリエーション配列	LTF(R5)EYWAQ#(S8)SAA
51	Mpro 結合性ペプチドバリエーション配列	ATXNVLXWLYXAVIXGD

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

配列番号	説明	配列
52	NSP9 結合性ペプチドバリエーション配列	ANLNAGBXLGSXAATVELQ
53	N 末端ヘキサヒスチジンタグ	HHHHHH
54	NSP9-SP645 (SP-PROTAC-NSP9-1)	ANLNAGB(S5)LGS(S5)AATVELQZA LTF(R8)EYWAQL(S5)SAA
55	SP645-NSP9 (SP-PROTAC-NSP9-2)	LTF(R8)EYWAQL(S5)SAAZ ANLNAGB(S5)LGS(S5)AATVELQ

10

【0232】

配列番号 14 および 15 におけるモチーフパターンは、以下の命名法を使用する：「.」は、任意のアミノ酸タイプを指し、「[X]」は、その位置において許容されるアミノ酸タイプを指し、パターンの開始点における「^X」は、配列がアミノ酸タイプ X で開始することを指し、「[^X]」は、その位置がタイプ X 以外の任意のアミノ酸を有し得ることを示し、数字が続いて「X{x, y}」として示され、ここで、x および y は、その位置に置いて必要とされる「X」アミノ酸タイプの最小数および最大数を示す。翻訳後改変（例えば、リン酸化およびプロリンヒドロキシル化）されることが知られている一次ドメイン内の保存される残基の位置は、太字で示される。配列番号 1、7、40～48、および 54～55 において、(R8) は、(R) - 2 - (7' - オクテニル) アラニンであり、(S5) は、(S) - 2 - (4' - ペンテニル) アラニンである。配列番号 48 において、X₁、X₂、および X₅ は、任意のアミノ酸（例えば、A、W、F、L、V、I、ナフチルアラニン、E、D、Y、シクロブチルアラニン、およびそれらの側鎖アナログ）であり、X₃：W、F、または 3 - (2 - ナフチル) - L - アラニンであり、X₄：L またはロイシン模倣体（例えば、シクロブチルアラニン）である。配列番号 49～50 において、(R5) は、(R) - 2 - (4' - ペンテニル) アラニンであり、(S8) は、(S) - 2 - (7' - オクテニル) アラニンである。配列番号 7 および 50 において、# は、シクロブチルアラニンである。配列番号 3～5 において、X₁ および X₂ は、(S) - 2 - (4' - ペンテニル) アラニンである。配列番号 4～5 において、B は、ノルロイシンである。配列番号 28～29 において、X は、配列に挿入することができ、配列 GSG を含むポリペプチドをもたらさない任意のアミノ酸であり、n は、0～4 である。配列番号 51～52 において、X は、(S) - 2 - (4' - ペンテニル) アラニンである。配列番号 54～55 において、Z は、ベーターアラニンである。

20

30

【実施例】

40

【0233】

以下の例は、特許請求する発明を更に例示するために提供され、発明の範囲を限定するものとして判断されるべきではない。特定の材料が言及されている範囲で、それは例示を目的とするにすぎず、本発明を限定することを意図しない。当業者であれば、発明の能力を行使することなくかつ発明の範囲から逸脱することなく、同等の手段または反応物を発展させることができる。

【0234】

(実施例 1)

SARS-CoV-2 の生活環の必須タンパク質を分解するための SP-PROTAC の合成

50

ステーブルまたはステッチ p 5 3 ペプチドを樹脂上で合成し、可変長のリンカー（例えば、 β -アラニン、PEG、Gly-Ser リンカーなど）、続いて、縮合反応のために必要に応じて誘導体化された選択した小分子を付加することによって、ステーブルペプチドタンパク質分解標的化キメラ（SP-PROTAC）を、標的化される SARS-CoV-2 タンパク質の分解のために生成した。図 2～5 によって、これらのキメラの安定化（すなわち、ステーブルまたはステッチ）ペプチド部分をデザインする際のアプローチの多様性が実証される。例えば、SP645 は、2つのアミノ酸を、6つのアミノ酸が隣接する（i, i+7 位）非天然アミノ酸 S-オクテニルアラニンおよび R-ペンテニルアラニンと置き換えることによって合成した（図 6 を参照されたい）。図 7 は、SP645（配列番号 1）の構造を示す。必要とされる α , α -二置換アミノ酸の合成を、以前に説明されているように行った（Walensky, L. D. et al. Science 305, 1466-70 (2004)、Schafmeister, C. E. et al. J. Am. Chem. Soc. 122, 5891-5892 (2000)）。固相 Fmoc 化学およびルテニウムに触媒されるオレフィンメタセシスを、ペプチド合成およびステーブル形成に使用し、続いて、リンカーおよび小分子を標準的なカップリング化学を使用して樹脂上で付加した。

10

【0235】

PLpro 阻害剤 GRL-0617 を組み込むために、例えば、化学的置換を、その NH_2 基を介して達成した。GRL-0617-酸（11.3 mg、0.0281 mmol、1 当量）を、室温で、DMF（0.28 ml、0.1 M）中に溶解した N-（4-アミノブチル）-2-（（2-（2,6-ジオキソピペリジン-3-イル）-1,3-ジオキソイソインドリン-4-イル）オキシ）アセトアミドトリフルオロアセテート（14.5 mg、0.0281 mmol、1 当量）と合わせた。DIPEA（14.7 マイクロリットル、0.0843 mmol、3 当量）および HATU（10.7 mg、0.0281 mmol、1 当量）を、次いで、ペプチドに添加し、その N 末端 Fmoc を、ピペリジンで事前に脱保護し、混合物を、20 時間、窒素下で反応させた。最終的な SP-PROTAC は、ペプチドの脱保護および切断、LC/MS による精製、ならびにアミノ酸分析による定量後に得た。SP-PROTAC の C 末端を、結合分析のために FITC でさらに誘導体化した。

20

【0236】

SP-PROTAC のプロトタイプパネルは、Baez-Santos, et al. J. Virol., 88, 12511-27 (2014)、Ghosh, A. K. et al. J. Med. Chem., 52, 5228-40 (2009)、Baez-Santos, et al. Antiviral Res., 115, 21-38 (2015)、および Zhang, L. et al. Science, 368, 409-412 (2020)、および Gorgulla, C. et al. Nature, 580, 663-668 (2020) に記載されている報告されている化合物を含む、PLpro および Mpro を標的とする小分子を組み込んでいた。上記のプロセスを適用して、SARS-CoV-2 E タンパク質および SARS-CoV-2 タンパク質 PLpro（図 7）に結合する、プロモドメインを含むタンパク質（BRD2、BRD3、および BRD4）を標的としそれを分解する、例示的な SP-PROTAC を生成した。

30

40

【0237】

重要な SARS-CoV-2 標的（PLpro、Mpro、NSP9、および NSP12）の追加のペプチドおよび分子モジュレーターを、上述の方法を使用して、SP-PROTAC に組み込んでもよい。表 5 は、SARS-CoV-2 標的、分子のタイプ、および SP-PROTAC に組み込まれる分子の名称／構造を列挙する。関心が持たれるものの例としてはとりわけ、PLpro、Mpro、NSP9 阻害剤、および NSP12 阻害剤を組み込んだ SP-PROTAC である。

50

【表 5】

表 5: SP-PROTAC に組み込むためのウイルスタンパク質標的に係合する小分子、ペプチド配列、およびヌクレオチドアナログの例

ウイルス標的	分子のタイプ	分子
PLpro	小分子	GRL-0617
Mpro	小分子	エブセレンカルボン酸:4-(3-オキソ-1,2-ベンゾセリナゾール-2-イル)安息香酸
Mpro	ペプチド(二量体化)	ATVNVLAWLAAVINGD (配列番号 2)
Mpro	ステーブルペプチド(二量体化)	ATVNVLAWLX ₁ AVIX ₂ GD (配列番号 3)、式中、X ₁ および X ₂ =(S)-2-(4'-ペンテニル)アラニン
NSP9	ステーブルペプチド(二量体化)	ANLNAGBX ₁ LGSX ₂ AATVELQ (配列番号 4)、式中、B はノルロイシンであり、X ₁ および X ₂ =(S)-2-(4'-ペンテニル)アラニン
NSP9	ステーブルペプチド(二量体化)	ANLNRGBX ₁ LGSX ₂ AATVRLQ (配列番号 5)、式中、B はノルロイシンであり、X ₁ および X ₂ =(S)-2-(4'-ペンテニル)アラニン
NSP12	ヌクレオチドアナログ	レムデシビル酸((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-アミノピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-7-イル)-5-シアノ-3,4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メトキシ)(フェノキシ)ホスホリル)-L-アラニン
NSP12	ヌクレオチドアナログ	ソホスブビルカルボン酸(S)-2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-ジオキソ-3,4-ジヒドロピリミジン-1(2H)-イル)-4-フルオロ-3-ヒドロキシ-4-メチルテトラヒドロフラン-2-イル)メトキシ)(フェノキシ)ホスホリル)アミノ)プロパン酸

10

20

30

【0238】

SP-PROTAC はまた、宿主タンパク質、例えば、プロモドメインタンパク質、BRD2、BRD3、および／または BRD4 も標的とし得る。JQ1 は、BRD4 に結合する例示的な分子である。

【0239】

さらに、以下の表 6 は、E3 ユビキチンリガーゼの例、およびこれらの標的に結合し得るリガンド分子のタイプを列挙する。表 6 に列挙される分子は、表 5 の例示的な分子に、直接的に結合するか、またはリンカーを介して連結させて、ウイルスタンパク質またはウイルス病原性を補助する宿主タンパク質の分解のために、分解薬（例えば、E3 リガーゼ）を動員することができる。

40

【表 6】

表 6:標的分解のために E3 リガーゼを動員するリガンドの例

E3 リガーゼ	リガンド分子の タイプ	リガンド分子
HDM2	ペプチド	ステーブル p53 ペプチド(例えば、ATSP-7041、SP645)、その HDM2 結合性バリエーション、およびそのアナログ
セレブロン	小分子	サリドマイドおよびアナログ、例えば、ポマリドマイド、レナリドマイド、およびアバドマイド
VHL	小分子	VH 032 アナログ
HDM2	小分子	ヌトリン(例えば、ヌトリン-3a)およびアナログ、例えば、RG7388
XIAP	小分子	A 410099.1
cIAP	小分子	SM-1295, SM-1280
COP1	ペプチド	Trib1

10

20

【0240】

(実施例 2)

SP-PROTAC の結合親和性を測定するためのサイズ排除クロマトグラフィー

SP-PROTAC の結合親和性を評価するために、SP-PROTAC、HDM2、および SARS-CoV-2 タンパク質標的の間の三元複合体の形成をモニタリングする定量的サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) ベースのアッセイをデザインした。N 末端ヘキサヒスチジンタグ (配列番号 53) およびトロンピン切断部位を有する組換え HDM2 および SARS-CoV-2 タンパク質 (例えば、PLpro、Mpro) を pET28a ベクターにクローニングし、BL21 (DE3) 大腸菌 (E. coli) において発現させ、親和性 Ni-NTA クロマトグラフィー、続いて、記載のようにタグ切断および SEC によって精製する (Ben-Nun, Y. et al. Structure 28 (7): 847-857 (2020)、Bernal, F., et al. J Am Chem Soc 129, 2456-7 (2007))。成分を、1:1:1 の比で混合し、SEC プロファイルを、それぞれのタンパク質単独および SP-PROTAC を添加しないタンパク質の組合せとの比較で、記録する。この様式で、所望される結合性複合体を形成する SP-PROTAC の能力を、文書化する。この結合親和性 SEC アッセイの適用の例として、図 9B は、BRD4 に指向される SP-PROTAC が、BRD4 と HDM2 との間の複合体の形成を誘導したことが見出されたが (一番下のトレース)、一方で、HDM2 単独、BRD4 単独、HDM2 + BRD4、HDM2 + BRD4 + SP645 + JQ1 は、SEC によって評価した場合に複合体の形成を誘導しなかったことを示す。これらの結果により、in vitro で所望されるタンパク質複合体の核となる、SP-PROTAC の能力が確認された。

30

40

【0241】

(実施例 3)

SP-PROTAC の細胞浸透度

2つの機能が1つになった (two-in-one) 生細胞タンパク質相互作用アッセ

50

イを使用して (Herce, H. D. et al. Nat Chem 9, 762-771 (2017))、SP-PROTACがHeLa細胞に進入する能力、および所望される三元複合体を生成する能力を同時に評価した。簡単に述べると、GFPを認識するラクダ科由来の一本鎖VHH抗体を、そのラミニン融合を介して、核ラミナに局在化させた。GFP-HDM2およびRFP-融合体としての標的ウイルスタンパク質を、次いで、細胞において一過的に発現させ、続いて、SP-PROTACまたはビヒクルで処置した。両方の標的に係合する細胞浸透剤SP-PROTACは、RFP-ウイルスタンパク質を、GFP-HDM2が係留された核ラミナに濃縮させることが見出され、これにより、GFP/RFPオーバーレイにおけるシグナルによってスコア付けされる、タンパク質の共局在化が生じた。図10Aに示されるように、SP-PROTAC-BRD4は、HDM2をサイトゾル（拡散パターン、上部）から、BRD4が実験的に係留している核ラミナ（集中パターン、下部）に再局在化させ、これによって、共局在化（下部、右側）が生じた。これらの結果により、in celluloで所望されるタンパク質複合体の核となる、SP-PROTACの能力が確認された（図10A）。

10

【0242】

（実施例4）

SP-PROTACを使用したウイルスPLprタンパク質ユビキチン化

ウイルス標的のユビキチン化を可能にする三元複合体を形成するSP-PROTACの能力を測定するために、HDM2ユビキチンリガーゼキット (Boston Biochem) を使用してin vitroユビキチン化アッセイを行い、ウイルスタンパク質分子量における対応するユビキチンシフトを、ウエスタンブロット分析によってモニタリングした。図10Bに示されるように、SP-PROTAC-PLpro1 (10 μM) は、in vitroにおいて、HDM2に媒介されるPLproのユビキチン化を誘導した。これらの結果は、HDM2近接性を誘導することにより、ウイルス標的（例えば、PLpro）ユビキチン化を達成することができることを示す。

20

【0243】

（実施例5）

SP-PROTACを用いたSARS-CoV-2タンパク質に結合する宿主タンパク質の選択的な分解

細胞内タンパク質分解に関してアッセイするために、SJS A-1細胞を、10%ウシ胎仔血清 (FBS) および1%ペニシリン/ストレプトマイシン (Pen Strep) を含むDMEM (Life Technologies, Grand Island, NY) 培養培地 (CM) 中で、37℃で湿度制御されたCO₂平衡化インキュベーターにおいて継代した。処置の前日に、細胞を継代し、6ウェルプレート中に100,000細胞/mLの密度で播種した。24時間後に、細胞を、プロテアソーム阻害剤であるカルフィルゾミブ (Advanced ChemBlocks Inc, カタログID: F-4770)、400 nM) の存在下または非存在下において、2時間、さまざまな濃度のSP-PROTAC-BRD4（例えば、0.1~10 μM）で処置し、その後で、それらを採取し、溶解させた。細胞溶解物を、次いで、アクチン（対照）、p53、およびBRD4抗体を使用し、標準的なウエスタンブロット技術を使用してアッセイして、タンパク質レベルおよびローディング対照のためのアクチン抗体を評価した。

30

40

【0244】

図11Aに示されるように、BRD4に指向されるSP-PROTACは、用量応答的に、SJS A-1細胞におけるp53レベルを増加させ、BRD4レベルを減少させた。プロテアソーム阻害剤（カルフィルゾミブ）の存在下において、BRD4分解は、阻害された（図11B）。

【0245】

（実施例6）

SP-PROTACによる培養細胞のタンパク質のランドスケープの変化

ハイコンテンツスクリーニングにより得られたもっとも強力なSP-PROTAC化合

50

物を、天然で易罹患性のヒト由来Huh7細胞 (Mosse l, E. C. et al. J Virol 79, 3846-50 (2005)) およびACE2を発現するCalu-3細胞 (Tseng, C. T. et al. J Virol 79, 9470-9 (2005)) において試験した。播種した細胞を、SP-PROTACの連続希釈物 (開始用量10 μ M、三連) で1時間処置した後、SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2/ヒト/USA/WA-CDC-WA1/2020、Genbank受託番号MN985325.1) でチャレンジした。培養上清から試料採取し、RNAse阻害剤の存在下でウイルスを溶解させ、逆転写 (RT) および定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) を、記載のように行った (Suzuki, Y. et al. J Vis Exp (2018))。CDCにより検証されているBHQでクエンチした色素対プライマーを、IDTから購入し、Ct値からゲノム当量を計算した。

10

【0246】

もっとも強力な抗ウイルス活性を示したSP-PROTACを使用して、Huh7およびCalu-3細胞 (50%を上回る感染性) を処置し、続いて、タンパク質レベルにおける動的变化についてモニタリングした。処置した細胞を、10% SDS含有緩衝液において時間をわたり (例えば、2時間、4時間、6時間、8時間) 溶解させ、溶解物を、p53、SARS-CoV-2標的 (PLpro、Mpro)、およびアクチン対照についてのウェスタン分析に供した。機序上のp53誘導および標的-タンパク質特異的分解 (例えば、PLpro、Mpro、BRD4) を示す、処置細胞に由来する溶解物は、記載のように行われるグローバルプロテオミクス分析も受ける (Winter, G. E. et al. Science 348, 1376-81 (2015))。この様式で、細胞タンパク質のランドスケープ全体にわたる作用のSP-PROTAC特異性を、BRD4に指向されるSP-PROTACについて試験した (図12A~C)。対照 (ステابلペプチドSP645単独 (図12A) および非連結型小分子JQ1単独 (図12B)) とは対照的に、SP-PROTAC-BRD4 (図12C) は、BRD2/3/4タンパク質レベルの低減、およびp53転写標的、例えば、HDM2の誘導の両方を行うことが見出された。これらの結果は、最適な抗ウイルス活性が、p53誘導および標的タンパク質分解の相乗的なSP-PROTAC機序から導出されたことを示す。

20

【0247】

(実施例7)

30

SP-PROTACによる培養細胞の機序上の細胞傷害の改善

CellTiter-Glo (登録商標) 発光細胞生存度アッセイ (Promega、Madison、WI) を製造業者のプロトコールに従って使用して、細胞傷害アッセイを行った。SJSA-1細胞を、SP645、JQ1、またはSP-PROTAC-BRD4で72時間、示される濃度で処置し、in vitro分析を、技術的に三連で行い、化合物、タンパク質、または細胞の独立した調製物を用いて少なくとも2回反復し、一元配置分散分析を使用して分析した。0.05を下回る両側p値を、有意とみなした。

【0248】

図13Aにおいて見られるように、SP-PROTAC-BRD4は、SP645およびJQ1単独と比較して、SJSA-1細胞の機序上の細胞傷害を有意に改善した (生存度パーセントの減少)。

40

【0249】

(実施例8)

SP-PROTACによる培養細胞のウイルス感染の遮断

エボラウイルスに対する以前のスクリーニングに基づいて、SARS-CoV-2のハイスループットなウイルス検出プラットフォームを開発した (Anantpadma, M. et al. Antimicrob Agents Chemother 60, 4471-81 (2016))。384ウェルの形式で播種したVero E6細胞を、SP-PROTACの連続希釈物 (開始用量50 μ M) で1時間処置し、三連で行い、続いて、SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2/ヒト/USA/WA-CDC-

50

WA1 / 2020、Genbank 受託番号 MN985325.1) で 4 時間チャレンジして、10~20% の細胞の制御感染を達成した (試験化合物の動的範囲を評価するのに最適な感染性)。次いで、感染した細胞を洗浄し、4% パラホルムアルデヒドで固定し、PBS 中で再洗浄し、抗 SARS-CoV-2 ヌクレオキャプシドモノクローナル抗体 (ThermoFisher Sci、Waltham、MA)、続いて抗マウス Ig 二次抗体 (Alexa Fluor 488、Life Technologies) で免疫染色し、細胞体を HCS CellMask ブルーで対比染色した。細胞を、Nikon Ti Eclipse 自動化顕微鏡において z 面でイメージングし、CellProfiler ソフトウェアによって分析し、感染細胞を総細胞で除すことによって感染効率を計算した。図 13B は、25 μ M および 50 μ M の SP-PROTAC-PLpro1 が、Vero E6 細胞の SARS-CoV-2 感染を遮断することが見出されたことを示す。【0250】

10

(実施例 9)

SP-PROTAC の α -らせん度の測定

小分子二量体化が SP-PROTAC の成分であるステープルペプチド (例えば、SP645、ATSP-7041 など) の構造に影響を及ぼさないことを確実にするため、SP-PROTAC のらせん度を、円偏光二色性 (CD) によって溶液中で測定する (Bird, G. H., et al. *Methods Enzymol.*, 446, 369-86 (2008))。50 μ M のリン酸カリウム (pH 7.5) または Milli-Q 脱イオン水中で再構成した化合物を用いて、CD スペクトルを、Aviv Biomedical 分光計 (モデル 410) で記録する。190~260 nm の 5 回のスキャンを平均して、それぞれのスペクトルを得、これを、波長対残基平均楕円率としてプロットし、らせん度 % を、記載のように計算する (Forood, B., et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 838-42 (1993))。上記の方法の例として、SP-PROTAC のらせん度を、4 つの HDM2 結合性ステープル p53 ペプチドステープルペプチド (SAH-p53-1~4、配列番号 40~43) について、Bernal F., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 129 (9): 2456-2457 (2007).) に示されるように、円偏光二色性によって評価した。図 8A (Bernal F., et al. における図 1C と同一) は、SAH-p53-4 (配列番号 43) が、SAH-p53-1~3 (配列番号 40~42) または野生型 p53 ペプチド (配列番号 11) よりも安定であったことを示す。

20

30

【0251】

(実施例 10)

SP-PROTAC のタンパク質分解安定性の測定

ステープルペプチドの重要な特性は、ステープル自体および誘導されるらせん状フォールディングによる不安定なアミド結合の遮蔽に起因する *in vivo* でタンパク質分解に抵抗するそれらの能力である。タンパク質分解安定性を決定するために、比較可能なタンパク質分解分析を、(Bird, G. H. et al. *ACS Chem Biol*, 15, 6, 1340-1348 (2020)) によって記載のように液体クロマトグラフィー-質量分析 (LC-MS) (Agilent 1200) を行って、細胞および *in vivo* 研究に関して、最もプロテアーゼ耐性が高い化合物を特定する。反応試料は、DMSO 中の 5 μ L の SP-PROTAC (1 mM ストック) および 50 mM Tris HCl、pH 7.4 からなる 195 μ L の緩衝液から構成される。ゼロ時間試料の注射時に、2.5 μ L の 100 ng/ μ L プロテイナーゼ K (New England Biolabs) を添加し、インタクトな化合物の量を、時間をわたっての逐次的な注射によって定量する。時間に対する平均二乗変位 (MSD) 面積のプロットにより、指数関数型崩壊曲線を生成し、半減期を、Prism ソフトウェア (GraphPad) を使用して非線形回帰分析によって決定する。このタンパク質分解安定性評価の適用の例は、Bird G. H., et al., *PNAS August 10, 20*

40

50

10 107 (32) 14093-14098. に示されている。図9A (Bird G. H., et al. に由来) は、単一ステープル化および二重ステープル化された抗HIV治療薬エンフビルチドが、ステープル化されていないエンフビルチドと比較して、顕著なプロテアーゼ耐性を有することが見出されたことを示す。エンフビルチドの安定性は、ステープルの数に比例して増加した。

【0252】

(実施例11)

SP-PROTACの結合親和性を測定するためのサイズ排除クロマトグラフィー

SP-PROTACのそれぞれの成分について相対結合親和性を評価するために、蛍光偏光 (FP) 結合分析を行い、ここで、C末端FITC誘導体化SP-PROTAC (例えば、25 nM) を、結合緩衝液 (50 mM NaCl、20 mM HEPES pH 7.4、5 mM DTT) 中で、個々にそれぞれのタンパク質の連続希釈物 (例えば、HDM2、PLpro) とともにインキュベートする。FPを、Spectramax M5 マイクロプレートリーダー (Molecular Devices) において平衡状態で測定し、データをプロットし、Kd値を、Prismソフトウェア (Graphpad) を使用して計算する。このFP分析の適用の例は、Bernal F., et al., J. Am. Chem. Soc. 129 (9): 2456-2457 (2007) に示されている。図8B (Bernal F. et al. における図1Dと同一) は、さまざまなステープルp53ペプチド (配列番号40~43) のHDM2への相対結合親和性を示す。SAH-p53-4は、SAH-p53-1~3または野生型p53ペプチドと比較して高い親和性で、HDM2に結合することが見出された。

【0253】

(実施例12)

SARS-CoV-2感染症のヒト化ACE2受容体マウスモデルにおけるリードSP-PROTACの抗ウイルス活性

SP-PROTACのin vivo有効性試験を、気道上皮においてヒトACE2受容体を発現し (McCray, P. B., Jr. et al. J Virol 81, 813-21 (2007)、Yan, R. et al. Science (2020))、SARS-CoV-2ウイルスに感染した (Netland, J., et al. J Virol 82, 7264-75 (2008)、Tseng, C. T. et al. J Virol 81, 1162-73 (2007)) トランスジェニックマウスにおいて行う。抗エボラウイルス治療薬の評価のために開発された方法を使用して、実験を行う (Pascal, K. E. et al. J Infect Dis 218, S612-S626 (2018)、Sakurai, Y. et al. Science 347, 995-8 (2015))。SP-PROTACを、まず、耐容性に関して試験する。3回の処置のそれぞれについて、10匹 (雄性5匹、雌性5匹) の群で20匹のマウスに、高用量または低用量のSP-PROTACを、1日2回で10日間、腹腔内投薬する。別の10匹のマウスの群には、対照として食塩水のみを受容させる。動物は、それぞれの用量の前に試験し、有害作用が観察された場合には、処置を中止する。10日間の投薬後に、高用量において耐容性が示されない場合、より低い用量を使用する。耐容性を示したSP-PROTACを、hACE2マウス疾患モデルにおいて有効性に関して試験する。K18-hACE2マウス (JAX、1アーム当たりn=20匹、雄性10匹、雌性10匹) に、1日目に、10⁴ PFUのウイルス投薬量を鼻内に接種し、続いて、SP-PROTAC (投薬量および頻度は、耐容性およびPKの結果に基づく) での腹腔内処置を10日間毎日行う (2日目~12日目)。1つの群には、対照としてビヒクルを受容させる。マウスを継続的にモニタリングして、体重および臨床徴候を記録する。4日目 (ウイルス血症のピーク) に、それぞれの群から4匹のマウスを、安楽死させ、細胞溶解液 (tissue lyzer) (Qiagen) を使用して、記載されるように (Bao, L. et al. Nature 583, 830-833 (2020)) 調製した肺ホモジネート上清からqPCRによって、ウイ

ルス負荷を定量する。もっとも有効な処置の用量を精緻化して、マウスを保護する最低量を決定する。同じ実験デザインを使用するが、3つの群に、4倍の増分でより低用量の処置を受容させる。それぞれの実験では、性別を生物学的変数として割り当て、雄性マウスおよび雌性マウスを同じ数で用いる。

【0254】

in vivo 耐容性について、10匹のマウス／用量／化合物、および食塩水対照の10匹のマウスを使用し、マウスを、10日目（または有害徴候の場合にはそれよりも早い時点）に安楽死させ、毒性について試験する。研究は、増加した毒性を検出する80%の検出力を有する（60% *v* 10%）、 $p = 0.10$ 。*in vivo* 有効性について、疾患進行は、10%を上回る体重減少、努力呼吸、または発育不良として定義し、SP-PROTACで処置した動物を、ビヒクルで処置した動物と比較した。1群当たり16匹の動物（に加えて4日目の評価のための4匹のマウス）により、処置したマウスの70%、対して対照マウスの22%の無増悪を検出する81%の検出力が得られるであろう、 $p = 0.05$ 。進行までの時間を、カプランおよびマイヤーの方法、ならびにログランク検定 *s* を使用した差についての検定を使用して評価する。

10

【0255】

（実施例13）

SP-PROTACを使用したウイルスNSP9タンパク質ユビキチン化

別のSARS-CoV-2ウイルスタンパク質と三元複合体を形成する代替的にデザインしたSP-PROTACの能力を測定するために、本発明者らは、(1) *i*, *i* + 4単一ステープル化NSP9結合性ペプチド（配列番号4）がN末端に配置され、SP-645（配列番号1）に連結されたものから構成される、SP-PROTAC-NSP9-1（配列番号54）と称されるもの、または(2) SP-645（配列番号1）がN末端に配置され、*i*, *i* + 4単一ステープル化NSP9結合性ペプチド（配列番号4）に連結されたものから構成される、SP-PROTAC-NSP9-2（配列番号55、図14A）と称されるもののいずれかのSP-PROTACを生成した。いずれの場合にも、SP-PROTACは、組換えHDM2、SP-PROTAC-NSP9、および組換えNSP9の間で三元複合体の核を形成して、ウイルス標的タンパク質NSP9のHDM2ユビキチン化を可能にすることに成功した。HDM2ユビキチンリガーゼキット（Boston Biochem）を使用して、*in vitro* ユビキチン化アッセイを行い、ウイルスタンパク質の分子量における対応するユビキチンシフトを、ウエスタンブロット分析によってモニタリングした。図14Bに示されるように、SP-PROTAC-NSP9-1および-2（10 μ M）は、*in vitro* でHDM2に媒介されるNSP9のユビキチン化を誘導した。これらの結果は、HDM2近接性を誘導することにより、分解のための標的化されるウイルスタンパク質（例えば、NSP9）のユビキチン化を達成することができることを示す。

20

30

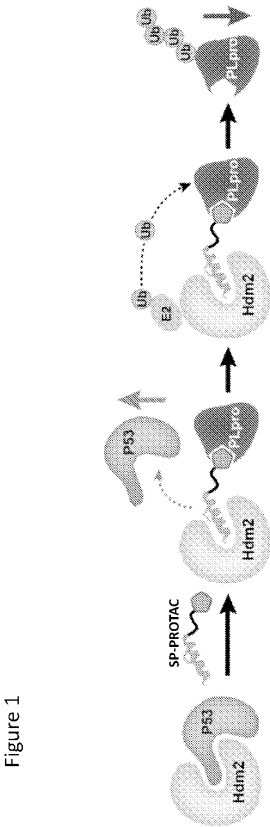
【0256】

他の実施形態

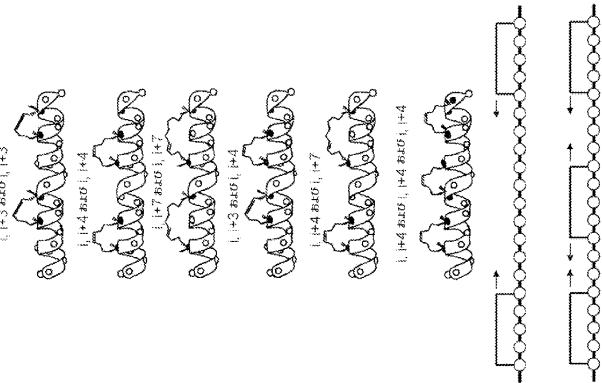
本発明をその詳細な説明とともに併記してきたが、前述の説明は例示することを意図し、添付の特許請求の範囲の範囲によって定義される本発明の範囲を限定するものではない。他の態様、利点、および改良は、以下の特許請求の範囲の範囲内である。

40

【図面】
【図 1】



【図 3】



【図 2】

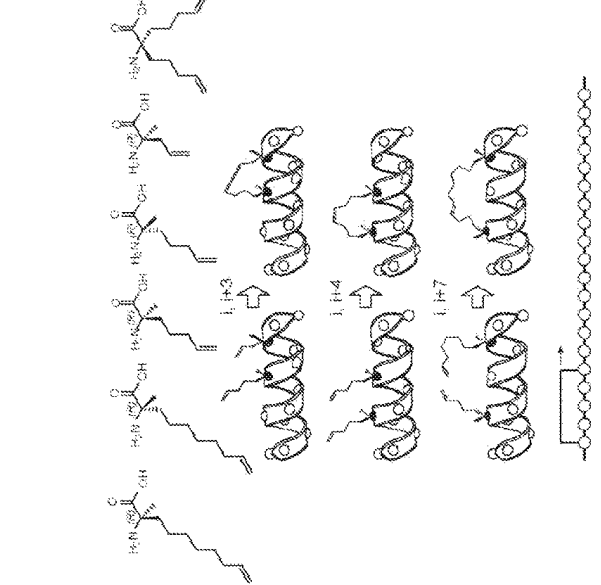


Figure 2

【図 4】

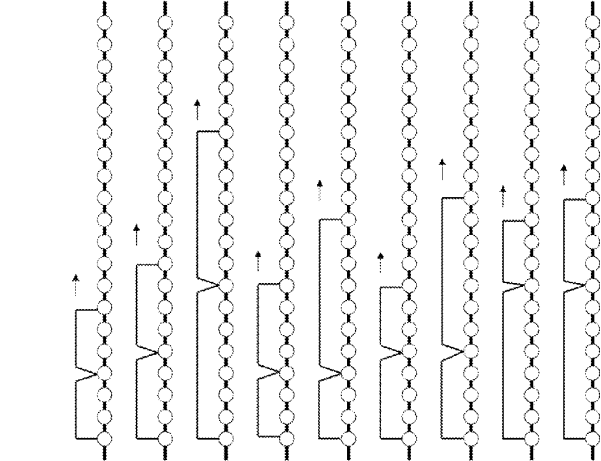


Figure 4

10

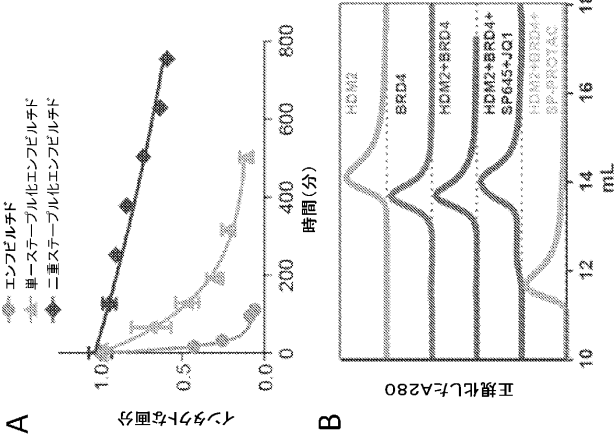
20

30

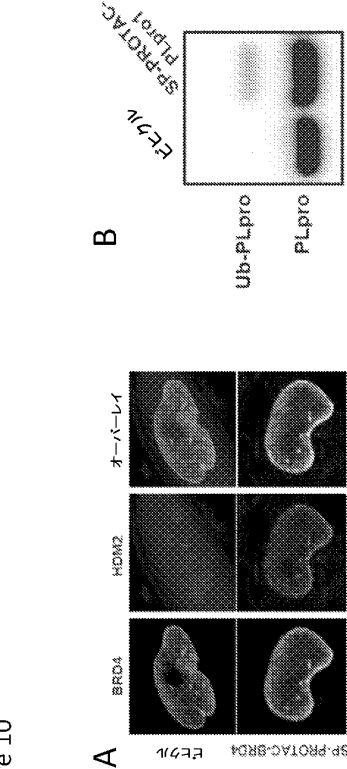
40

50

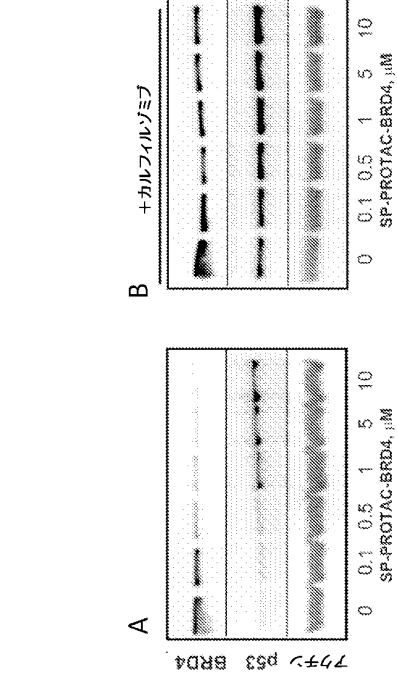
【図 9】



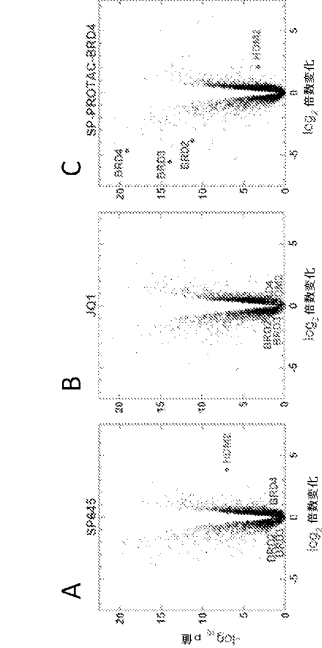
【図 10】



【図 11】



【図 12】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/054954

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K47/55 A61K47/64 C07K7/00 A61P31/14 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BING ZHOU ET AL: "Discovery of a Small-Molecule Degradator of Bromodomain and Extra-Terminal (BET) Proteins with Picomolar Cellular Potencies and Capable of Achieving Tumor Regression", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, 24 March 2017 (2017-03-24), XP055387473, US ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b01816	1-5, 12-14, 21-30, 48, 49
Y	whole document and in particular the introduction and Figure 1 ----- -/--	1-71
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 4 February 2022		Date of mailing of the international search report 14/02/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Birikaki, LEMONIA

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/054954

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIU YUZEI ET AL: "The development of Coronavirus 3C-Like protease (3CLpro) inhibitors from 2010 to 2020", EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 206, 6 August 2020 (2020-08-06), XP086299093, ISSN: 0223-5234, DOI: 10.1016/J.EJMECH.2020.112711 [retrieved on 2020-08-06]	1-5, 9, 10, 48-54, 56
Y	the whole document	1-71
X	WO 2019/118893 A1 (DANA FARBER CANCER INST INC [US]) 20 June 2019 (2019-06-20)	1-5, 12-14, 31-35, 48
Y	figure 23 page 2, under "Summary" to page 14, 3rd full paragraph page 18, 3rd and 4th full paragraphs example 9	1-71
X	CN 1 468 961 A (SHANGHAI INST OF PHARMACOLOGY [CN]) 21 January 2004 (2004-01-21) entry T10 of the table on page 12	57-59, 63
Y	MARTINEZ-ORTIZ WILNELLY ET AL: "Could PROTACs Protect Us From COVID-19?", DRUG DISCOVERY TODAY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 25, no. 11, 1 September 2020 (2020-09-01), pages 1894-1896, XP086342348, ISSN: 1359-6446, DOI: 10.1016/J.DRUDIS.2020.08.007 [retrieved on 2020-09-01] the whole document	1-71
Y	RATIA K. ET AL: "A noncovalent class of papain-like protease/deubiquitinase inhibitors blocks SARS virus replication", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 105, no. 42, 21 October 2008 (2008-10-21), pages 16119-16124, XP055887377, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.0805240105 the whole document	1-71
	----- -/--	

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

page 2 of 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/054954

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>FREITAS BRENDAN T. ET AL: "Characterization and Noncovalent Inhibition of the Deubiquitinase and deISGylase Activity of SARS-CoV-2 Papain-Like Protease", ACS INFECTIOUS DISEASES, vol. 6, no. 8, 19 May 2020 (2020-05-19), pages 2099-2109, XP055887379, US ISSN: 2373-8227, DOI: 10.1021/acsinfecdis.0c00168 the whole document</p> <p>-----</p>	1-71
Y	<p>WO 2016/049355 A1 (AILERON THERAPEUTICS INC [US]) 31 March 2016 (2016-03-31) page 95, entry SP645 first sentence of paragraph [00220]</p> <p>-----</p>	1-71

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/054954

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019118893 A1	20-06-2019	AU 2018385697 A1	30-04-2020
		CA 3078682 A1	20-06-2019
		CN 112119085 A	22-12-2020
		EP 3724216 A1	21-10-2020
		JP 2021506814 A	22-02-2021
		US 2020354413 A1	12-11-2020
		WO 2019118893 A1	20-06-2019

CN 1468961 A	21-01-2004	NONE	

WO 2016049355 A1	31-03-2016	AU 2015320545 A1	06-04-2017
		BR 112017005736 A2	12-12-2017
		CA 2961029 A1	31-03-2016
		CN 107106642 A	29-08-2017
		CN 112972378 A	18-06-2021
		EP 3197477 A1	02-08-2017
		IL 251122 A	30-01-2020
		JP 2018503595 A	08-02-2018
		JP 2021046436 A	25-03-2021
		KR 20170063798 A	08-06-2017
		SG 10201902598V A	29-04-2019
		SG 11201702175Y A	27-04-2017
		US 2016101145 A1	14-04-2016
		US 2021299211 A1	30-09-2021
		WO 2016049355 A1	31-03-2016

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	9/12 (2006.01)	C 1 2 N	9/12	
A 6 1 K	38/10 (2006.01)	A 6 1 K	38/10	
A 6 1 P	31/14 (2006.01)	A 6 1 P	31/14	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	31/4545(2006.01)	A 6 1 K	31/4545	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 K	31/427(2006.01)	A 6 1 K	31/427	
A 6 1 K	31/496(2006.01)	A 6 1 K	31/496	
A 6 1 K	38/05 (2006.01)	A 6 1 K	38/05	
A 6 1 K	47/64 (2017.01)	A 6 1 K	47/64	
A 6 1 K	47/65 (2017.01)	A 6 1 K	47/65	
A 6 1 K	47/54 (2017.01)	A 6 1 K	47/54	
A 6 1 K	47/55 (2017.01)	A 6 1 K	47/55	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ハース, ヘンリー ディー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 4 6, ブルックライン, マンモス ストリート 7 3

(72)発明者 ワレンスキー, ローレン ディー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 5 9, ニュートン, コモンウェルス アベニュー 8 1 1

F ターム (参考)

4C076 DD60 EE41 EE59 FF34

4C084 AA02 AA07 AA19 BA01 BA10 BA14 BA18 BA23 BA32 DC50

MA52 MA55 MA56 MA59 MA60 MA66 NA05 NA14 ZB072 ZB211 ZB331

ZC082 ZC202 ZC412

4C086 AA01 BC22 BC50 BC82 GA07 GA10 MA01 MA04 MA52 MA55

MA56 MA59 MA60 MA66 NA14 ZB21 ZB33

4H045 AA10 AA30 BA16 BA17 BA18 BA41 BA72 DA56 DA89 EA20

FA10