

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-514630
(P2025-514630A)

(43)公表日 令和7年5月9日(2025.5.9)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	A	4 C 0 7 6
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17		4 C 0 8 4
A 6 1 K	47/55 (2017.01)	A 6 1 K	47/55		4 H 0 4 5
A 6 1 P	31/14 (2006.01)	A 6 1 P	31/14		
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全37頁)					
(21)出願番号	特願2024-558035(P2024-558035)	(71)出願人	518294476	最終頁に続く	
(86)(22)出願日	令和5年3月31日(2023.3.31)		フライエ ユニヴェルジテート ベルリン		
(85)翻訳文提出日	令和6年11月29日(2024.11.29)		ドイツ連邦共和国 1 4 1 9 5 ベルリン		
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/058432		カイザーズヴェルター シュトラーセ 1		
(87)国際公開番号	WO2023/187142		6-18		
(87)国際公開日	令和5年10月5日(2023.10.5)	(71)出願人	502327850	最終頁に続く	
(31)優先権主張番号	22166380.0		フォルシュングスフェアブント ベルリン		
(32)優先日	令和4年4月1日(2022.4.1)		エー ファウ		
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		Forschungsverbund		
			Berlin e. V.		
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV		ドイツ連邦共和国 ベルリン ルドヴェア ショセー 17 Rudower Chaussee17 , D-12489 Berlin, Germany		
		最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 粘膜付着性とウイルス結合性を有する二官能性ペプチド

(57)【要約】

【課題】ウイルス病の予防的処置、理想的には、ウイルス感染回避に有用な、新規の物質を提供する。

【解決手段】本発明の二官能性ペプチドは、ウイルス結合部位2およびウイルス結合部位2と共有結合したムチン結合部位1を有する。ウイルス結合部位2は、SARS-CoV-2、はA型インフルエンザ、B型インフルエンザ、ライノウイルスやそれ以外にもエンテロウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルスおよび／またはメタニューウイルスに結合するペプチドから選択される。ムチン結合部位1は、トレフォイル因子3などのレクチン類から選択される。

【選択図】 図1A

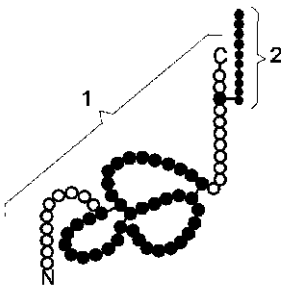


FIG 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ウイルス結合部位（２）および該ウイルス結合部位（２）と共有結合したムチン結合部位（１）を有するペプチドにおいて、

前記ウイルス結合部位（２）が、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 42、配列番号 43、配列番号 48、配列番号 49、配列番号 50、配列番号 51、配列番号 52、配列番号 53、配列番号 54、配列番号 55、配列番号 56、配列番号 57、配列番号 58、配列番号 59、配列番号 60、配列番号 61、配列番号 62 または配列番号 63 と 95 % 以上同一であるペプチドを含有するか、あるいは、該ペプチドであり、

10

前記ムチン結合部位（１）が、配列番号 1、配列番号 14、配列番号 20、配列番号 21 または配列番号 22 と 95 % 以上同一であるペプチドを含有しているか、あるいは、該ペプチドであることを特徴とする、ペプチド。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のペプチドにおいて、前記ムチン結合部位（１）が、配列番号 1 と 95 % 以上同一であるトレフォイル因子 3 ペプチドを含有しているか、あるいは、該トレフォイル因子 3 ペプチドであることを特徴とする、ペプチド。

20

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載のペプチドにおいて、当該ペプチドが、2 つ以上のウイルス結合部位（２）を有しており、前記ムチン結合部位（１）が、前記 2 つ以上のウイルス結合部位（２）のうちの少なくとも一つと共有結合していることを特徴とする、ペプチド。

【請求項 4】

請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のペプチドにおいて、前記ウイルス結合部位（２）が、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 42 または配列番号 43 と 95 % 以上同一であるペプチドを含有している、あるいは、該ペプチドであることを特徴とする、ペプチド。

30

【請求項 5】

請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載のペプチドにおいて、前記ウイルス結合部位（２）が、配列番号 2 と 95 % 以上同一であるペプチドであり、前記ムチン結合部位（１）が、配列番号 1 と 95 % 以上同一であるトレフォイル因子 3 ペプチドであることを特徴とする、ペプチド。

【請求項 6】

請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドにおいて、前記ウイルス結合部位（２）が、配列番号 3 と 95 % 以上同一であるペプチドであり、前記ムチン結合部位（１）が、配列番号 1 と 95 % 以上同一であるトレフォイル因子 3 ペプチドであることを特徴とする、ペプチド。

40

【請求項 7】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載のペプチドにおいて、当該ペプチドが、配列番号 18 と 95 % 以上同一であることを特徴とする、ペプチド。

【請求項 8】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載のペプチドにおいて、当該ペプチドが、配列番号 19 と 95 % 以上同一であることを特徴とする、ペプチド。

50

【請求項 9】

ウイルス感染の予防用または処置用の、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項 10】

前記ウイルス感染が SARS-CoV-2 への感染であることを特徴とする、請求項 9 に記載の用途のための、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項 11】

請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載のペプチドを医薬活性成分として含む医薬。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の医薬において、当該医薬が、点鼻薬としてまたは吸入薬として投与されるように設計かつ構成されていることを特徴とする、医薬。 10

【請求項 13】

請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載のペプチドの製造方法であって、以下の工程：

a) ウイルス結合部位前駆体に、前記ムチン結合部位 (1) の第 1 の部位を有する第 1 のムチン結合部位前駆体を反応させることで、ペプチド前駆体を得る工程と、

b) 前記ペプチド前駆体に、前記ムチン結合部位 (1) の第 2 の部位を有する第 2 のムチン結合部位前駆体を反応させる工程と、
を備える、方法。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の方法において、前記ウイルス結合部位前駆体が、ウイルス結合部位 (2) に共有結合した 4-ペンチノイル部位を有していることを特徴とする、方法。 20

【請求項 15】

請求項 13 または 14 に記載の方法において、前記第 1 のムチン結合部位前駆体が、前記ムチン結合部位 (1) の全アミノ酸の半分以上を有していることを特徴とする、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、請求項 1 の前提部に記載されているような二官能性ペプチド、請求項 9 の前提部に記載されているような該ペプチドの医療的使用、請求項 11 の前提部に記載されているような該ペプチドを含有する医薬、および請求項 13 の前提部に記載されているような該ペプチドの製造方法に関する。 30

【背景技術】

【0002】

現在進行中の SARS-CoV-2 パンデミックは、新たに出現し頻発するウイルス病原体が人類にとって常に存在する脅威であり、広域にわたるウイルスの蔓延を抑え込むには迅速かつ具体的な対策が求められることを例証した。ウイルス伝染を鈍化させるための衛生観念を迅速に推進するにしても、ワクチンや抗ウイルス療法が、感染症に対する主な対策となる。しかしながら、ワクチンの開発や試験には数年を要する場合もある。抗ウイルス療法は、既に感染した個人を処置するための素早い解決策を提供する。抗ウイルス剤のグループでは、タンパク質やペプチドなどの大型の分子ではなく、小型の有機化合物が主流を占めている。しかしながら、新規の小分子薬の開発は、化学的に複雑である場合が多く困難を極める。そのため、多種多様な異なる化合物アナログによるスクリーニングの用意が難しい。しかも、オセルタミビルやアマンタジンなどのインフルエンザに対する抗ウイルス薬で明らかのように、耐性の出現がますます大きな問題になっている。 40

【0003】

今のところ、SARS-CoV-2 パンデミックに対する追加対策としての予防的治療は運用されておらず、多くの利点を奏し得る機会が見逃されている。

【0004】

Werner Hoffmann (非特許文献 1) は、トレフォイル因子 (TFF3) と IgG-Fc 結合たんぱく質 (FCGBP) とのヘテロダイマーについて説明している。 50

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Hoffmann, Werner. "Trefoil factor family (TFF) peptides and their different roles in the mucosal innate immune defense and more: An update." *Current Medicinal Chemistry* 28.36 (2021): 7387-7399.

【非特許文献2】Bhatia, Sumati, et al. "Linear polysialoside outperforms dendritic analogs for inhibition of influenza virus infection in vitro and in vivo." *Biomaterials* 138 (2017): 22-34. 2. 10

【非特許文献3】Braga Emidio, Nayara, et al. "Chemical Synthesis of TFF3 Reveals Novel Mechanistic Insights and a Gut-Stable Metabolite." *Journal of Medicinal Chemistry* 64.13 (2021): 9484-9495.

【非特許文献4】Bui, Vuong N., et al. "Pathogenicity of an H5N1 avian influenza virus isolated in Vietnam in 2012 and reliability of conjunctival samples for diagnosis of infection." *Virus Research* 179 (2014): 125-132. 20

【非特許文献5】Caban, Madelyn, et al. "Cross-protective antibodies against common endemic respiratory viruses." *Nature Communications* 14.1 (2023): 798.

【非特許文献6】Han, Dong P., Adam Penn-Nicholson, and Michael W. Cho. "Identification of critical determinants on ACE2 for SARS-CoV entry and development of a potent entry inhibitor." *Virology* 350.1 (2006): 15-25. 30

【非特許文献7】Hoffmann, Markus, et al. "SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor." *Cell* 181.2 (2020): 271-280.

【非特許文献8】Hoffmann, Miriam, Nicole L. Snyder, and Laura Hartmann. "Polymers Inspired by Heparin and Heparan Sulfate for Viral Targeting." *Macromolecules* 55.18 (2022): 7957-7973. 40

【非特許文献9】Hoffmann, Werner. "Trefoil factor family (TFF) peptides and their different roles in the mucosal innate immune defense and more: An update." *Current Medicinal Chemistry* 28.36 (2021): 7387-7399.

【非特許文献10】Hrebik, Dominik, et al. "ICAM-1 induced rearrangements of capsid and gen 50

ome prime rhinovirus 14 for activation and uncoating.” Proceedings of the National Academy of Sciences 118.19 (2021): e2024251118.

【非特許文献11】Issmail, Leila, et al. “Prefusion-specific antibody-derived peptides trivalently presented on DNA-nanoscaffolds as an innovative strategy against RSV entry.” Frontiers in Virology 2 (2022).

【非特許文献12】Jarva, Michael A., et al. “Trefoil factors share a lectin activity that defines their role in mucus.” Nature Communications 11.1 (2020): 1-9. 10

【非特許文献13】Jerabek-Willemsen M., et al. “MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond.” Journal of Molecular Structure 1077 (2014): 101-113.

【非特許文献14】Khan, Abdul Ghafoor, et al. “Human rhinovirus type 54 infection via heparan sulfate is less efficient and strictly dependent on low endosomal pH.” Journal of Virology 81.9 (2007): 4625-4632. 20

【非特許文献15】Madsen, Anders, et al. “Human antibodies targeting influenza B virus neuraminidase active site are broadly protective.” Immunity 53.4 (2020): 852-863.

【非特許文献16】McLellan, Jason S., et al. “Structure-based design of a fusion glycoprotein vaccine for respiratory syncytial virus.” science 342.6158 (2013): 592-598. 30

【非特許文献17】Memczak, Henry, et al. “Anti-hemagglutinin antibody derived lead peptides for inhibitors of influenza virus binding.” PLoS One 11.7 (2016): e0159074.

【非特許文献18】Sarto, Carolina, et al. “Atomistic insight into the essential binding event of ACE2-derived peptides to the SARS-CoV-2 spike protein.” Biological Chemistry 403.5-6 (2022): 615-624.

【非特許文献19】Smith, Thomas J., et al. “Neutralizing antibody to human rhinovirus 14 penetrates the RECEPTOR-binding canyon.” Nature 383.6598 (1996): 350-354. 40

【非特許文献20】Thim, L., F. Madsen, and S. S. Poulsen. “Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels.” European Journal of Clinical Investigation 32.7 (2002): 519-527.

【非特許文献21】Zhu, Qing, et al. “A highly potent extended half-life antibody as a pote 50

ntial RSV vaccine surrogate for all infants.” Science Translational Medicine 9.388 (2017): eaaj1928.

【非特許文献22】Zuo, Teng, et al. “Comprehensive analysis of antibody recognition in convalescent humans from highly pathogenic avian influenza H5N1 infection.” Nature Communications 6.1 (2015): 8855.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の目的の一つは、ウイルス疾患の予防的処置、理想的には、ウイルス感染回避に有用な、新規の物質を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

この目的は、請求項1の請求された構成要素を備えたペプチドによって達成される。そのようなペプチドは、ウイルス結合部位および該ウイルス結合部位と共有結合したムチン結合部位を有する二官能性ペプチドである。これらウイルス結合部位とムチン結合部位との間の結合は、直接の共有結合であってもよいし、リンカーを介した結合であってもよい。

【0008】

前記ウイルス結合部位は、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62または配列番号63と95%以上同一、特に

【0009】

配列番号2～13および23～43は、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2（SARS-CoV-2）への結合に極めて適したウイルス結合部位に関するものである。配列番号2、3および23～41は、直鎖状のウイルス結合ペプチドに関するものであり、配列番号4～13、42および43は、部分的に環化したペプチド、いわゆるステーブル化ペプチドに関するものである。ステーブル化ペプチドは、直接連続していない（ただし、近隣の）2つのアミノ酸間の少なくとも1つの架橋を有する。同架橋部は、留め金のように作用してそれぞれのペプチドを安定化させる役割を果たす。該架橋部は、それぞれのアミノ酸残基における2つの側鎖によって確立するものであってもよいし、それぞれのアミノ酸残基の通常の側鎖に加えて、同残基に任意の化学的部位を共有結合している該化学的部位によって確立するものであってもよい。配列番号42および43の場合、前記架橋部は、2つのシステイン残基間に形成されたジスルフィド架橋である。

【0010】

配列番号48は、A型インフルエンザウイルス（特に、H1株、H3株、H7株）への結合に極めて適したペプチドを記述している。本ペプチドは、A型インフルエンザウイルスのヘマグルチニン（HAタンパク質）を標的とするものであり、Memczak達やMiriam Hoffmann達の論文に記載されている。

【0011】

配列番号49および50は、A型インフルエンザウイルス（特には、H5N1株クレード2.3.4、鳥株）への結合に極めて適したペプチドを記述している。本ペプチドは、A型インフルエンザウイルスのヘマグルチニン（HAタンパク質）を標的とするものであり、Zuo達の論文に記載された抗体65C6の配列から誘導したものである。

【0012】

配列番号51および52は、A型インフルエンザウイルス（特には、H5N1株クレード2.3.2.1、鳥株）への結合に極めて適したペプチドを記述している。本ペプチドは、例えば、Bui達の論文に記載されたHAタンパク質の配列等の、この株の変異種のHAタンパク質で一般的に見られるヘマグルチニン（HAタンパク質）の特定配列を標的とするものである。

10

【0013】

配列番号53および54は、B型インフルエンザウイルスへの結合に極めて適したペプチドを記述している。これらのペプチドは、B型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼを標的とするものであり、Madsen達の論文に記載されている。

【0014】

配列番号55および56は、ライノウイルス（RV）やそれ以外にもエンテロウイルス（EV）への結合に極めて適したペプチドを記述している。これらのペプチドは、Hrebik達、Khan達およびSmith達の論文に記載された抗RV抗体から誘導したものである。

【0015】

配列番号57は、ヒトパラインフルエンザウイルス（HPIV）（特には、HIPV1株やHIPV3株）への結合に極めて適したペプチドを記述している。このペプチドは、HPIVの融合タンパク質（Fタンパク質）を標的とするものであり、Caban達の論文に記載された抗HPIV抗体から誘導したものである。

20

【0016】

配列番号58、59および60は、メタニューウイルス（MPV）や呼吸器合胞体ウイルス（RSV）（特には、サブタイプAおよび／またはサブタイプB）への結合に極めて適したペプチドを記述している。これらのペプチドは、MPVやRSVの融合タンパク質（Fタンパク質）を標的とするものである。これらのペプチドは、抗HPIV抗体から誘導したものであり、Caban達の論文に記載されている。

30

【0017】

配列番号61、62および63は、RSV（特には、サブタイプAおよび／またはサブタイプB）への結合に極めて適したペプチドを記述している。これらのペプチドも、RSVの融合タンパク質（Fタンパク質）を標的とするものであり、Issmail達、Zhu達およびMcLellan達の論文に記載されている。

【0018】

前記ムチン結合部位は、配列番号1（修飾トレフォイル因子3、TFF3（C57K））、配列番号14（ネイティブTFF3）、配列番号20（ネイティブTFF1）、配列番号21（ネイティブTFF2）または配列番号22（ジャカリン）と95%以上同一、特には96%以上同一、特には97%以上同一、特には98%以上同一、特には99%以上同一、特には100%同一であるペプチドを含有しているか、あるいは、該ペプチドである。これらのレクチンは、患者の腸粘膜を標的とするのに極めて適している。TFF3は、気道にて天然で産生されるタンパク質である（Thim et al. 2002）。

40

【0019】

本願請求のペプチドは、呼吸器粘液の本来のバリア機能を増強することが可能である。呼吸器粘液は、呼吸器上皮のそれらの標的細胞に接近する呼吸器病原体が最初に遭遇する物理的バリアである。粘液は、高い粘度と菌結合性を有し、人間の身体の対菌防御システムの重要な一部となっており、繊毛運動を介して吸着された病原体を効果的に除去する。本願請求のペプチドを用いると、ウイルス病原体の結合部位の導入によって粘液の抗菌性を高めることで、粘液を増強することが可能である（粘液強化）。これにより、残留され

50

た病原体は、上皮細胞層に達する前に除去されるため、感染を防ぐことができる。つまり、本願のアプローチは、モジュラー生体模倣ペプチドによって、粘液の抗ウイルス効果を向上させて支援することである。

【0020】

粘液強化は、呼吸器感染から人間を守るための新しい概念である。本願アプローチをその他の（非）薬理的対策と併用することにより、未感染の個人の感染リスクや、既に感染した個人の伝染や病状悪化のリスクを低減することができる。

【0021】

本願請求のペプチドは、気道ムチンに付着してウイルスを特異的に吸収することが可能な分子による調整可能なペプチドベースのシステムの中核を構成する。同ペプチドの両部位は、急速に変化する状況に対応するように適応することができる。本願の生体模倣アプローチは、粘膜の本来の抗ウイルス性を補強するものであり、かつ、ペプチド成分がヒトタンパク質から誘導したものであるため、副作用も低いと考えられる。また、本二官能性ペプチドは、感染した細胞から放出されたウイルスも捕捉するので、ウイルス価や環境中への排出を低減することから、感染した患者に治療的に使用することができる。最後に、本願のアプローチは、確立された抗ウイルス対策と併用されることにより、協働で感染リスクの軽減や疾病リスクの抑制を支援することが可能である。

10

【0022】

本願請求のペプチドはモジュール型の組成なので、同ペプチドの双方の官能性部位を所望の用途に応じたものとすることができる。

20

【0023】

前記ムチン結合部位と前記ウイルス結合部位との間の共有結合を確立するリンカーとしては、ポリエチレングリコール（PEG）リンカー、あるいは、1～20個のアミノ酸、特に2～19個のアミノ酸、特に3～18個のアミノ酸、特に4～17個のアミノ酸、特に5～16個のアミノ酸、特に6～15個のアミノ酸、特に7～14個のアミノ酸、特に8～13個のアミノ酸、特に9～12個のアミノ酸、特に10～11個のアミノ酸を含むアミノ酸リンカーが適している。GTジペプチドなどのジペプチドが、極めて適したリンカーである。配列番号44、配列番号45、配列番号46または配列番号47と95%以上同一、特に96%以上同一、特に97%以上同一、特に98%以上同一、特に99%以上同一、特に100%同一であるアミノ酸配列を含有するか、あるいは、該アミノ酸配列のみで構成されたリンカーも、極めて適したリンカーである。配列番号44は、柔軟なリンカー（flexible linker）の一例である。配列番号45は、剛直なリンカー（rigid linker）の一例である。配列番号46は、ソルターゼAによる化学-酵素カップリング反応に由来する連結ペプチドを表したものである。配列番号47は、トランスグルタミナーゼによる化学-酵素カップリング反応に由来する連結ペプチドを表したものである。前記ウイルス結合部位又は前記ムチン結合部位のペプチドは、 γ -グルタミン酸- ϵ -リジンイソペプチド結合でグルタミン酸残基（Q7）に結合していることになる。

30

【0024】

一実施形態において、前記ムチン結合部位は、糖鎖エпитーブ（glycotope）結合ドメインを含み、N-アセチルグルコサミン- α -1,4-ガラクトース（GlcNAc- α -1,4-Gal）二糖に対して、150 μ M以上、特に100 μ M以上、特に75 μ M以上、特に50 μ M以上、特に25 μ M以上の親和性で、特に25 μ M～150 μ M、特に50 μ M～125 μ M、特に75 μ M～100 μ Mの範囲内の親和性で結合する。同GlcNAc- α -1,4-Gal二糖は、ムチン2（Muc2）、ムチン5AC（Muc5AC）、ムチン6（Muc6）などのムチンに特異的に存在する糖鎖エпитーブである。一例として、天然のトレフォイル因子3（TFF3）は、56 μ MのGlcNAc- α -1,4-Gal二糖への結合親和性を有する（Jarva et al 2020）。

40

【0025】

一実施形態において、前記ウイルス結合部位は、該ムチン結合部位のうちのアミノ酸5

50

7にて前記ムチン結合部分に対して共有結合している。一実施形態において、アミノ酸57は、システイン残基である。一実施形態において、アミノ酸57は、リジン残基である。一実施形態において、前記ウイルス結合部位は、該ムチン結合部位のうちのC末端で前記ムチン結合部分と共有結合している。特に、後者の実施形態では、前記ムチン結合部位の位置57に（又はそれ以外の任意の位置）にどのアミノ酸が存在しているのかが、前記ウイルス結合部位との結合能力にとって特に重要にならない。

【0026】

一実施形態において、本ペプチドは、2つ以上のウイルス結合部位を有する。このとき、前記ムチン結合部位は、前記2つ以上のウイルス結合部位のうちの少なくとも一つと直接又はリンカーを介して共有結合している。また、前記ムチン結合部位は、複数のウイルス結合部位と結合していてもよい。この目的のために、一実施形態では、分岐リンカーが極めて有用である。このような分岐リンカーは、単一のムチン結合部位と結合後にムチン結合部位からほぼ等距離に配置される複数のウイルス結合部位に結合するために使用することができる。

10

【0027】

一実施形態において、前記ウイルス結合部位は、ウイルススパイクタンパク質に結合するのに適した部位である。

【0028】

一実施形態において、前記ウイルス結合部位は、ペプチドである。一実施形態において、前記ウイルス結合部位は、ディフェンシンなどの抗菌ペプチドである。レトロサイクリンは、極めて適したディフェンシンである。別の実施形態において、前記ウイルス結合部位は、樹状又は直鎖状のポリスルフェートやポリ炭水化物のような非ペプチド抗ウイルス残基である。

20

【0029】

一実施形態において、前記ウイルス結合部位は、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42または配列番号43と95%以上同一、特に96%以上同一、特に97%以上同一、特に98%以上同一、特に99%以上同一、特に100%同一であるペプチドを含有しているか、あるいは、該ペプチドである。これらの配列は、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2（SARS-CoV-2）への結合に極めて適したウイルス結合部位に関するものである。

30

【0030】

一実施形態において、前記ウイルス結合部位は、このペプチドの少なくとも1つの残基が置換基を有するペプチドである。一実施形態において、同ペプチドのC末端は、アミノ基で置換されている。一実施形態において、同ペプチドのN末端は、アセチル基で置換されている。一実施形態において、同ペプチドのC末端がアミノ基で置換されており、同ペプチドのN末端がアセチル基で置換されている。

40

【0031】

一実施形態において、前記ウイルス結合部位は、配列番号2と95%以上同一、特に96%以上同一、特に97%以上同一、特に98%以上同一、特に99%以上同一、特に100%同一であるペプチドであり、前記ムチン結合部位（1）は、配列番号1と95%以上同一、特に96%以上同一、特に97%以上同一、特に98%以上同一、特に99%以上同一、特に100%同一であるトレフォイル因子3ペプチドである。配列番号2は、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス1（SARS-CoV-1）と高い親和性で結合することが過去に既に確認されているp4と表記されるペプチドを記述している（Han et al., 2006）。SARS-CoV-1とSARS-CoV-2との

50

間の構造的な違いにかかわらず、驚くべきことに、p 4 ペプチドは S A R S - C o V - 2 への結合にも極めて適していることが判明した。

【0032】

一実施形態において、前記ウイルス結合部位は、配列番号3と95%以上同一、特には96%以上同一、特には97%以上同一、特には98%以上同一、特には99%以上同一、特には100%同一であるペプチドであり、前記ムチン結合部位(1)は、配列番号1と95%以上同一、特には96%以上同一、特には97%以上同一、特には98%以上同一、特には99%以上同一、特には100%同一であるトレフォイル因子3ペプチドである。配列番号3は、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス1(SARS-CoV-1)と高い親和性で結合することが過去に既に確認されているp6と表記されるペプチドを記述している(Han et al., 2006)。SARS-CoV-1とSARS-CoV-2との間の構造的な違いにかかわらず、驚くべきことに、p6ペプチドはSARS-CoV-2への結合にも極めて適していることが判明した。これにより、p6ペプチドは、SARS-CoV-2に対する結合親和性が、p4ペプチドの親和性の約2倍となっている。興味深いことに、p6は、さらに、SARS-CoV-2のアルファ変異株およびデルタ変異株に対し、SARS-CoV-2の武漢野生型よりもなおいっそう高い親和性で結合することが可能である(表1を参照のこと)。

10

【0033】

直鎖状のp6ペプチドのSARS-CoV-2への親和性よりもなおいっそう高い親和性が、p6ペプチドのステーブル化変異体に対して観察された。一実施形態において、前記ウイルス結合部位は、配列番号10と95%以上同一、特には96%以上同一、特には97%以上同一、特には98%以上同一、特には99%以上同一、特には100%同一であるペプチドである。同ペプチドは、p6ペプチドのステーブル化変異体である。以降では、p6-cycやp6(R8)₁₅(S5)₂₂とも称する。

20

【0034】

以下の表1に、SARS-CoV-2への異なるウイルス結合部位の結合親和性(解離定数K_dとして記載する)をまとめた。これについては、マイクロスケール熱泳動(MST)法で測定した。p4ペプチドおよびp6ペプチド(後者については直鎖形態と環化形態の双方)は、現在流行しているSARS-CoV-2変異株の複数の受容体結合ドメインに対し、ナノモル級の結合定数で結合することが十分見て取れる。

30

【0035】

40

50

【表 1】

表 1：異なるウイルス結合部位の特性

ペプチド名	配列 *1	配列番号	SARS-CoV-2 対象株	Kd/ μ M	(PBS*2 中の)ヘリシ ティ(%)	(PBS:TFE*3 1:1 中での) ヘリシティ
p4	EEQAKTFLDKFNHEAED LFYQSS	2	2019-nCov	0.93 $\pm$ 0.21	0	100
p6	EEQAKTFLDKFNHEAED LFYQSSGLGKGDFR	3	2019-nCov	0.45 $\pm$ 0.10	0	39
p6-cyc	EEQAKTFLDKFNHEXED LFYQXSGLGKGDFR	10	2019-nCov	0.27 $\pm$ 0.14	25	43
p6	上記のとおり	3	B.1.1.7 (アル ファ)	0.32 $\pm$ 0.06	0	39
p6	上記のとおり	3	B.1.617.2 (デ ルタ)	0.19 $\pm$ 0.09	0	39
p6	上記のとおり	3	B.1.1.529 (オ ミクロン)	0.28	0	39

* 1 p 6 - c y c の位置 1 5 の X (X_{15}) は、アルケニル化 (R) - A l a 残基であり、p 6 - c y c の位置 2 2 の X (X_{22}) は、アルケニル化 (S) - A l a 残基であり、同ペプチドの X_{15} と X_{22} との間は、7 - ウンデセニル残基で環化されている。

* 2 P B S とは、リン酸緩衝生理食塩水のことである。

* 3 T F E とは、トリフルオロエタノールのことである。

【0036】

一実施形態において、本ペプチドは、配列番号 18 または配列番号 19 と 95% 以上同一、特には 96% 以上同一、特には 97% 以上同一、特には 98% 以上同一、特には 99% 以上同一、特には 100% 同一である。これらの配列番号は、本件の課題の解決に極めて適した特性を有することが明らかになった合成 T F F 3 - p 6 ペプチドおよび遺伝子組換え T F F 3 - p 6 ペプチドに関するものである。

【0037】

一態様において、本発明は、医薬としての前述したペプチドの使用に関する。

【0038】

一態様において、本発明は、ウイルス感染の予防または処置での前述したペプチドの医療的使用に関する。

【0039】

一実施形態において、処置または予防する前記ウイルス感染は、SARS-CoV-2 への感染である。

【0040】

10

20

30

40

50

一態様において、本発明は、そのような処置を必要とする患者のウイルス感染を処置または予防する医療的方法に関する。本明細書中で用いる「患者」とは、ヒト又は動物の患者に関するものである。哺乳類は、極めて適した動物の患者である。同方法は、前記患者に前述したペプチドを（例えば、本ペプチドを含有する医薬の形態で）投与する過程を備える。一実施形態において、同投与は、前記患者の鼻または口に本ペプチドを与えることによって行われる。このことは、スプレー剤の投与形態で本ペプチドを与えることによって極めて容易に達成することができる。つまり、本ペプチドは、例えば、点鼻薬や吸入薬のようなエアゾール剤として投与され得る。投与された本ペプチドは、前記患者の粘膜と接触して、前記ムチン結合部位を介して該粘膜に結合することができる。その後、本ペプチドは、前記患者の粘膜に結合した形態で維持され、自身のウイルス結合部位により、前記患者が吸い込んだ空気からウイルスを「フィルタリング」することができる。

10

【0041】

一態様において、本発明は、処置を必要とする患者の粘膜強化を行う医療的方法に関する。同方法は、前記患者に前述したペプチドを（例えば、本ペプチドを含有する医薬の形態で）投与する過程を備える。

【0042】

一態様において、本発明は、前述したペプチドを医薬活性成分とする医薬に関する。同医薬は、その他の医薬活性成分を含有していてもよい。一実施形態において、本ペプチドは、唯一の医薬活性成分である。

【0043】

一実施形態において、前記医薬は、点鼻薬や吸入薬のようなエアゾール剤として投与可能であるように製剤化されている。つまり、前記医薬は（医薬活性成分としての本ペプチドとともに）、投与されて鼻咽頭領域の粘膜に直接接触する。これにより、前述の粘膜強化がもたらされる。結果として、前記患者の粘膜は、該患者が（体外からの吸気や該患者の身体のウイルス感染細胞由来の呼気で）遭遇するウイルスと結合して除去する準備が十分整った状態になる。

20

【0044】

一態様において、本発明は、前述したペプチドの製造方法に関する。同方法は、次に述べるような工程を備える。まず、ウイルス結合部位前駆体に、第1のムチン結合部位前駆体を反応させる。このとき、該第1のムチン結合部位前駆体は、最終的なムチン結合部位における第1の部位を有している。この反応により、ペプチド前駆体が形成される。

30

【0045】

その後、前記ペプチド前駆体に、第2のムチン結合部位前駆体を反応させる。該第2のムチン結合部位前駆体は、前記ムチン結合部位における第2の部位を有している。この第2の反応工程の結果として、最終的なペプチドが形成される。当然ながら、それ以外の中間反応工程が実施されてもよい。一例として、前記ムチン結合部位を3つ以上のムチン結合部位前駆体に分けることが可能である。そして、個々のムチン結合部位前駆体を、既に形成済みのペプチド前駆体と次々と反応させることで、最終的に、本ペプチドが得られる。

【0046】

一実施形態において、前記ウイルス結合部位前駆体は、最終的なペプチドにおける前記ムチン結合部位との共有結合を確立する4-ペンチノイル部位を有している。該4-ペンチノイル部位は、最終的なペプチドに（全体または一部が）残り得る。一実施形態において、同4-ペンチノイル部位は、前記ウイルス結合部位と前記ムチン結合部位との間のリンカーとして機能し得る。

40

【0047】

一実施形態において、本ペプチドは、前記ウイルス結合部位と前記ムチン結合部位との間のリンカーとして機能するトリアゾール残基を有する。一実施形態において、本ペプチドは、前記ウイルス結合部位と前記ムチン結合部位との間のリンカーとして機能するポリエチレングリコール残基を有する。一実施形態では、このようなポリエチレングリコール

50

残基とトリアゾール残基とが組み合わされてリンカーを形成している。

【0048】

一実施形態において、前記第1のムチン結合部位前駆体は、前記ムチン結合部位の全アミノ酸の半分以上を有している。2つだけのムチン結合部位前駆体を使用される場合、前記第2のムチン結合部位前駆体は前記ムチン結合部位の全アミノ酸の半分以上を有している。具体的な一例として、前記第1のムチン結合部位前駆体は、同実施形態にてトレフォイル因子3ペプチドとされる前記ムチン結合部位のうちのアミノ酸36～59を有している。加えて、前記第2のムチン結合部位前駆体は、同ムチン結合部位のうちのアミノ酸1～35を有している。（前記ムチン結合部位のC末端部分に相当する）前記第1のムチン結合部位前駆体を前記ウイルス結合部位と反応させた後、これら第1のムチン結合部位前駆体とウイルス結合部位とで既に形成された構築物（すなわち、ペプチド前駆体）に、（前記ムチン結合部位のN末端部分に相当する）前記第2のムチン結合部位前駆体を反応させる。結果として、最終的なペプチドが形成される。

10

【0049】

本ペプチドのどの実施形態も、任意の所望の様式で互いに組み合わされることが可能であり、かつ、それぞれ又は無作為的に、前記使用や前記医薬や異なる方法に援用されることが可能である。同様に、異なる使用のどの実施形態も、任意の所望の様式で互いに組み合わされることが可能であり、かつ、それぞれ又は無作為的に、本ペプチドやその他の各使用、前記医薬や異なる方法に援用されることが可能である。同様に、前記医薬のどの実施形態も、任意の所望の様式で互いに組み合わされることが可能であり、かつ、それぞれ又は無作為的に、本ペプチドや異なる使用、異なる方法に援用されることが可能である。さらに、異なる方法のどの実施形態も、任意の所望の様式で互いに組み合わされることが可能であり、かつ、それぞれ又は無作為的に、本ペプチドや各使用、その他の各方法に援用されることが可能である。

20

【0050】

以下では、本発明の各態様のさらなる詳細について、例示的な実施形態および添付の図面を参照しながら説明する。

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図1A】二官能性ペプチドの第1の実施形態の構造を示す模式図である。

30

【図1B】二官能性ペプチドの第2の実施形態の構造を示す模式図である。

【図2A】配列番号15に相当する第1のムチン結合部位前駆体の一実施形態の一次構造を示す図である。

【図2B】配列番号16に相当する第2のムチン結合部位前駆体の一実施形態の一次構造を示す図である。

【図2C】配列番号17に相当するウイルス結合部位前駆体の一実施形態の一次構造を示す図である。

【図3】図2A及び図2Bの第1および第2のムチン結合部位前駆体から作製されたムチン結合部位と、図2Cのウイルス結合部位前駆体から作製されたウイルス結合部位とを有する、配列番号18に相当するペプチドの一実施形態の一次構造を示す図である。

40

【図4】配列番号4に相当するウイルス結合部位の一実施形態の一次構造を示す図である。

【図5】配列番号5に相当するウイルス結合部位の一実施形態の一次構造を示す図である。

【図6】配列番号6に相当するウイルス結合部位の一実施形態の一次構造を示す図である。

【図7】配列番号7に相当するウイルス結合部位の一実施形態の一次構造を示す図である。

【図8】配列番号8に相当するウイルス結合部位の一実施形態の一次構造を示す図である。

50

【図 9】 配列番号 9 に相当するウイルス結合部位の一実施形態の一次構造を示す図である。

【図 10】 配列番号 10 に相当するウイルス結合部位の一実施形態の一次構造を示す図である。

【図 11】 配列番号 11 に相当するウイルス結合部位の一実施形態の一次構造を示す図である。

【図 12】 配列番号 12 に相当するウイルス結合部位の一実施形態の一次構造を示す図である。

【図 13】 配列番号 13 に相当するウイルス結合部位の一実施形態の一次構造を示す図である。

【図 14】 p 6 ペプチドと各 SARS-CoV-2 変異株との間の結合親和性を示すプロットである。

【図 15】 配列番号 18 に相当する合成二官能性 TFF3-p 6 ペプチドと各 SARS-CoV-2 変異株との結合親和性を示すプロットである。

【図 16】 配列番号 23 に相当する p 4 ペプチド変異体と SARS-CoV-2 (2019-nCoV) の受容体結合ドメインとの間の結合親和性を示すプロットである。

【図 17】 配列番号 24 に相当する p 4 ペプチド変異体と SARS-CoV-2 (2019-nCoV) の受容体結合ドメインとの間の結合親和性を示すプロットである。

【図 18】 配列番号 25 に相当する p 4 ペプチド変異体と SARS-CoV-2 (2019-nCoV) の受容体結合ドメインとの間の結合親和性を示すプロットである。

【図 19】 配列番号 26 に相当する p 4 ペプチド変異体と SARS-CoV-2 (2019-nCoV) の受容体結合ドメインとの間の結合親和性を示すプロットである。

【図 20】 配列番号 28 に相当する p 4 ペプチド変異体と SARS-CoV-2 (2019-nCoV) の受容体結合ドメインとの間の結合親和性を示すプロットである。

【図 21】 配列番号 29 に相当する p 4 ペプチド変異体と SARS-CoV-2 (2019-nCoV) の受容体結合ドメインとの間の結合親和性を示すプロットである。

【図 22】 配列番号 30 に相当する p 4 ペプチド変異体と SARS-CoV-2 (2019-nCoV) の受容体結合ドメインとの間の結合親和性を示すプロットである。

【図 23】 配列番号 31 に相当する p 4 ペプチド変異体と SARS-CoV-2 (2019-nCoV) の受容体結合ドメインとの間の結合親和性を示すプロットである。

【図 24】 配列番号 32 に相当する p 4 ペプチド変異体と SARS-CoV-2 (2019-nCoV) の受容体結合ドメインとの間の結合親和性を示すプロットである。

【図 25】 配列番号 33 に相当する p 4 ペプチド変異体と SARS-CoV-2 (2019-nCoV) の受容体結合ドメインとの間の結合親和性を示すプロットである。

【図 26】 配列番号 34 に相当する p 4 ペプチド変異体と SARS-CoV-2 (2019-nCoV) の受容体結合ドメインとの間の結合親和性を示すプロットである。

【図 27】 配列番号 35 に相当する p 4 ペプチド変異体と SARS-CoV-2 (2019-nCoV) の受容体結合ドメインとの間の結合親和性を示すプロットである。

【図 28】 配列番号 36 に相当する p 4 ペプチド変異体と SARS-CoV-2 (2019-nCoV) の受容体結合ドメインとの間の結合親和性を示すプロットである。

【図 29】 配列番号 37 に相当する p 4 ペプチド変異体と SARS-CoV-2 (2019-nCoV) の受容体結合ドメインとの間の結合親和性を示すプロットである。

【図 30】 配列番号 38 に相当する p 4 ペプチド変異体と SARS-CoV-2 (2019-nCoV) の受容体結合ドメインとの間の結合親和性を示すプロットである。

【図 31】 配列番号 39 に相当する p 4 ペプチド変異体と SARS-CoV-2 (2019-nCoV) の受容体結合ドメインとの間の結合親和性を示すプロットである。

【図 32】 配列番号 40 に相当する p 4 ペプチド変異体と SARS-CoV-2 (2019-nCoV) の受容体結合ドメインとの間の結合親和性を示すプロットである。

【図 33】 配列番号 41 に相当する p 6 ペプチド変異体と SARS-CoV-2 (2019-nCoV) の受容体結合ドメインとの間の結合親和性を示すプロットである。

10

20

30

40

50

【図34】配列番号42に相当するp6ペプチド変異体とSARS-CoV-2(2019-nCoV)の受容体結合ドメインとの間の結合親和性を示すプロットである。

【図35】配列番号43に相当するp6ペプチド変異体とSARS-CoV-2(2019-nCoV)の受容体結合ドメインとの間の結合親和性を示すプロットである。

【図36】配列番号19に相当する遺伝子組換え二官能性TFF3-p6ペプチドと各SARS-CoV-2変異株との間の結合親和性を示すプロットである。

【発明を実施するための形態】

【0052】

図1Aは、二官能性ペプチド、つまり、TFF3-p6の、第1の実施形態の構造を示す模式図である。これは、トレフォイル因子3(TFF3)ペプチド1が、ムチン結合部位であってp6ペプチド2がウイルス結合部位となっているペプチドである。TFF3ペプチド1は、配列番号1に相当する一次配列を有する。p6ペプチド2は、配列番号3に相当する一次配列を有する。p6ペプチド2は、TFF3ペプチドのリジン57に共有結合している。

【0053】

図1Bは、二官能性ペプチドの別の実施形態を示した図である。同図および以降の図では、同様の構成／構成要素に同様の参照符号を付している。ここでは、p6ペプチド2が、TFF3ペプチド1のC末端に共有結合している。

【0054】

TFF3-p6の合成について、以下に詳細に説明する。

【0055】

TFF3の調製には、Braga Emidio et al. 2021のプロトコルに従った。Braga Emidio達が公表した合成経路とは異なり、TFF3の位置57のシステインをアジドリジンに代えて導入した。

【0056】

第1のムチン結合部位前駆体の一実施形態を示すTFF3(36~59)(C57AzK)を、位置57のアジドリジン(AzK)に対応する構築ブロックを使って、リンクアミドレジン上にてSPPS法で総合調製した(TFF3(36~59)C57AzK[M+H]⁺=2825.31g/mol、[M+2H]³⁺/3=943.7g/mol)。図2Aに、その一次構造を示す。

【0057】

第2のムチン結合部位前駆体の一実施形態を示すTFF3(1~35)-Nbzを、リンクアミドレジン上で合成し、これは、最初に通常のカップリング方法(3-Fmoc-4-ジアミノ安息香酸(Fmoc-Dbz)に関して0.2Mの溶液を作るのに十分な量のジメチルホルムアミド(DMF)中の、5当量(eq)のFmoc-Dbz、4.9当量のヘキサフルオロリン酸アザベンゾトリアゾールテトラメチルウロニウム(HATU)、10当量のN,N-ジイソプロピルエチルアミン(Dipea))によって、3-フルオレニルメトキシカルボニル-4-ジアミノ安息香酸(Fmoc-Dbz)で官能化された。その後、一般的なペプチド固相合成(SPPS)法を実施した。最後の残基を、Boc保護アミノ酸として付加した。前記レジンでの同ペプチドの組立後に、C末端をp-ニトロフェニルクロロホルメート(5eqのCH₂Cl₂;45分)を用いたアシル化によって活性化した後、塩基(Dipea(0.5M)のDMF溶液;20分)を添加してアニリドの分子内攻撃を促進することにより、樹脂結合ベンズイミダゾリノン形成した。トリフルオロ酢酸(TFA):1,2-エタンジチオール(EDT):H₂O:トリイソプロピルシラン(TIPS)(94:2.5:2.5:1.0)により、前記レジンからの切断を行い、この反応粗物を、0.1%TFAを含む3mLの30%アセトニトリル(MeCN)/H₂Oに溶解させて濾過し、分取高速液体クロマトグラフィ(HPLC)系に注入して精製した(TFF3(1~35)-Nbz.3980.4:M⁺,996.1:(M+4H)⁴⁺/4)。図2Bに、その一次構造を示す。

【0058】

10

20

30

40

50

ウイルス結合部位の一実施形態を示すペンチノイル酸-(PEG)₂-p6を、リンクアミドレジン上にて2つのPEG単位まで、SPPS法によって作製した。その後、4-ペンチン酸(5 eqの4-ペンチン酸、4.9 eqのHATU、10 eqのDipea、および4-ペンチン酸の0.2 M溶液を調製するのに十分なDMF中で)を手動でカップリングさせた。カップリングを、1.5時間かけて二回実施した。次に、TFA:H₂O:TIPS(95:2.5:2.5)で同ペプチドを切断し、分取HPLCで精製した(ペンチノイル-p6 [M+H]⁺=3975.90 g/mol、[M+2H]³⁺/3=994.9 g/mol)。図2Cに、その一次構造を示す。

【0059】

小瓶に、1 mM溶液のCuSO₄(10 eq)を投入し、THPTA(50 eq)と混合した。残りの試薬の混合を行う間に、それらは有機金属錯体を形成した。

【0060】

アジドリジン57とペンチノイル-(PEG)₂-p6のアルキン基との間のクリックケミストリー法によってペプチド前駆体を形成させるために、1.5 mLのエッペンドルフチューブ内の反応緩衝液(10 mMのNH₄HCO₃)に、ペンチノイル-(PEG)₂-p6(1.5 eq)とTFF3(36~59)(C57AzK)(1.0 eq)を溶解した。次に、200 mM原液からアミノグアニジン(100 eq)を添加した。この後、CuSO₄とTHPTAとの混合物を、その反応混合液に添加した。最後に、この反応液にアスコルビン酸ナトリウム(100 eq)を添加し、HCl/KOHでpHを8.0に調節した。同反応管に窒素を流入させた後、該反応管を直ちに密封すると共に、37°Cで攪拌しながら12時間静置した。20 µLの30% MeCN/H₂O中で1 µLの反応粗液を溶解し、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)を30 mM濃度に達するまで添加した。37°Cで5分間静置した後、HPLC-質量分析(HPLC-MS)法で試料の分析を行った。

【0061】

TFF3(1~35)-NbzとTFF3(36~59)(C57K-ペンチノイルp6)との間のネイティブケミカルライゲーションを行うために、反応緩衝液(6 M塩酸グアニジニウム、100 mMのNa₂HPO₄および30 mMのTCEP; pHをHCl/NaOHで7.0に調節済み)中で、TFF3(1~35)-Nbz(1.0 eq)とTFF3(36~59)(C57K-ペンチノイルp6)(0.8 eq)を溶解した。次に、2-メルカプトエタンスルホン酸塩(MeSNa)(100 eq)を添加し、同反応液を室温で4時間攪拌し続けた。1 µLの反応粗液を20 µLの30%アセトニトリル(MeCN)/H₂Oに溶解した後、TCEPを30 mM濃度に達するまで添加した。37°Cで5分間静置した後、HPLC-MS法で試料の分析を行った。チオエステルが痕跡量以下になることで、0.1% TFAを含む30% MeCN/H₂Oを添加して反応液の量を3 mLに増やして濾過し、分取HPLC系に注入して精製することで、TFF3-C57K(ペンチノイル-p6) ([M+H]⁺=10600.96 g/mol、[M+8H]⁸⁺/8=1326.1 g/mol、[M+9H]⁹⁺/9=1178.8 g/mol [M+10H]¹⁰⁺/10=1061.1 g/mol)を得た。図3に、その一次構造を示す。

【0062】

さらに、ネイティブTFF3を、遺伝子組換えによって調製した。Jarva et al., 2020のプロトコルを準拠・調節して、これを実施した。

【0063】

つまり、TFF3配列の5'末端を延長して精製タグを導入した。この後、その産物を、シーケンス・ライゲーション非依存性クローニング(SLIC)を用いて細菌発現用のプラスミドpET28bに組み込んだ。最終的なプラスミドをシーケンシングで確認し、細菌発現用のBL21 Codon Plus(DE3)RIPL(R=アルギニン、I=イソロイシン(Ile)、P=プロリン、L=ロイシン)細胞を形質転換させた。この点については、次で詳しく説明する。

10

20

30

40

50

【0064】

(形質転換済み大腸菌 BL21 Codon Plus (DE3) RIPL の指数関数的増殖保存培養物の調製)

そのようなプラスミドで、大腸菌 BL21 Codon Plus (DE3) RIPL 細胞を形質転換させた。これらの細胞を、 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシン、 $25 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ クロラムフェニコール及び $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ カナマイシンを含む溶原培地 (LB) 寒天平板上に塗り拡げて、培養器にて 37°C で一晚培養した。コロニーを一つ取り出し、 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシン、 $25 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ クロラムフェニコール及び $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ カナマイシンを含む LB 培地に接種し、回転振とう培養器にて 250rpm かつ 37°C で一晚培養した。 600nm での開始光学密度 (OD_{600}) が 0.02 の LB 培養物をテ

10

【0065】

(タンパク質の発現および洗浄)

上記の前培養物を、TB 培地に $\text{OD}_{600} = 0.04$ で接種した。同培養物を、回転振とう培養器にて 24 時間かけて 250rpm かつ 26°C で培養した。24 時間後、細菌培養物を氷上で 15 分間冷却し、遠心機にて 15 分かけて 3000g で遠心分離した。上清を除去し、細胞を洗浄用緩衝液 (HEPES ベース; $\text{pH} = 7$) + DNase I + フェニ

20

【0066】

目的のタンパク質を、His タグと (ストレプトアビジンの結合モチーフである) Streptag 精製によるタンデムアフィニティ精製法で精製した。プロテアーゼ切断箇所により、タンパク質がカラムから溶出する。溶出したタンパク質を透析し、SDS-PAGE 法により確認した。

【0067】

(ラクタム型ステーブル化ペプチドの調製)

全てのラクタム型ステーブル化ペプチドを、リンクアミドレジン上にて調製した。イソペプチド結合形成用の構築ブロックは、 $\text{N}-\alpha\text{-Fmoc}-\text{N}-\epsilon\text{-4-メチルトリチル-L-リジン}$ (以降、MttK と称する) と ($\text{N}-\alpha\text{-Fmoc}-\text{L-アスパラギン酸}$) $\beta\text{-2-フェニルイソプロピルエステル}$ (以降、PhiPr と称する) とした。SPPS 法を経て前記レジンに結合したペプチドを、2% TFA のジクロロメタン (DCM) 溶液で処理することにより、4-メチルトリチルと 2-フェニルイソプロピルの脱保護を行った。そして、イソペプチド結合を形成させた後、DMF 中で 0.9 当量の HATU 及び 2 当量の DIPEA 溶液を添加した。DMF と DCM で入念に洗浄してから、後続のカップリングカクテルの投入を行った。TFA : H_2O : TIPS ($95 : 2.5 : 2.5$) によって同ペプチドを前記レジンから切断し、低温のエーテルで沈殿させた。この後、同ペプチドを濾過・乾燥し、最終的な量が 3mL になるまで 0.1% TFA を含む 30% Me

30

40

【0068】

図 4 ~ 図 9 に、得られたラクタム型ステーブル化ペプチドの構造を示す。

【0069】

以下の表 2 に、SARS-CoV-2 に対する各環式ウイルス結合部位の結合親和性 (解離定数 K_d として記載) をまとめた。これについては、マイクロスケール熱泳動 (MST) 法で測定した。各環式 p6 ペプチドは、SARS-CoV-2 に対し、マイクロモル級の結合定数で結合することが十分見て取れる。

【0070】

50

【表 2】

表 2：各環式ウイルス結合部位の特性

ペプチド名	配列	配列 番号	置換基	ヘリシテ イ (%)	Kd / μM
p6(K) ₄ (D) ₈	EEQ(K ₄)KTF(D ₈)DKFNHE AEDLFYQSSGLGKGDFR	4	A4K, L8D	2	n.d.
p6(K) ₈ (D) ₁₂	EEQAKTF(K ₈)DKF(D ₁₂)HE AEDLFYQSSGLGKGDFR	5	L8K, N12D	10	5 $\pm$ 3
p6(K) ₁₁ (D) ₁₅	EEQAKTFLDK(K ₁₁)NHE(D ₁₅)EDLFYQSSGLGKGDF R	6	F11K, A15D	n.d.	n.d.
p6(K) ₁₅ (D) ₁₉	EEQAKTFLDKFNHE (K ₁₅)EDL(D ₁₉)YQSSGLGK GDFR	7	A15K, F19D	n.d.	n.d.
p6(K) ₁₈ (D) ₂₂	EEQAKTFLDKFNHEAED(K ₁₈)FYQ(D ₂₂)SGLGKGDF R	8	L18K, S22D	8	n.d.
p6(K) _{8,18} (D) _{12,22}	EEQAKTF(K ₈)DKF(D ₁₂)HE AED(K ₁₈)FYQ(D ₂₂)SGLGK GDFR	9	A4K, L8D, L18K, S22D	28	10 $\pm$ 1

n. d. 測定せず

【0071】

(閉環メタセシス (RCM) によるステーブル化ウイルス結合部位の調製)

RCM 反応では、次の非標準 (non-canonical) アミノ酸を使用した：

S5Fmoc = Fmoc - (S) - 2 - (4-ペンテニル) Ala - OH

R8Fmoc = Fmoc - (R) - 2 - (7-オクテニル) Ala - OH

【0072】

これらのアミノ酸 (AA) については、3.0 当量の AA、2.9 eq の HATU、および 6 eq の DIPEA を、カップリング条件とした。DMF を、AA に対して 0.2 M 濃度に達するまで添加した。

【0073】

天然のアミノ酸については、いずれも、5.0 当量の AA、4.9 eq の HATU、および 10 eq の DIPEA を、カップリング条件とした。DMF を、AA に対して 0.2 M 濃度に達するまで添加した。

【0074】

試験的切断によってステーブル化前のペプチドの質量を確認した後、RCM を実施した。レジン を、1 mL の DCM (3 回 $\times$ 1 分) の後、1 mL の 1, 2-ジクロロエタン (DCE) (3 回 $\times$ 1 分) で洗浄した。同レジン (50 μmol) を、1 mL のグラブス第 1 世代触媒 (6 mM) を含む DCM 溶液で処理した (レジン置換率 = 20 mol %)。得られた懸濁液を、20 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ で窒素の気泡を連続して 2 時間導入しながら攪拌した。その後、溶媒を除去した。次に、グラブス触媒を二重で添加した。続いて、同レジン を、1 mL の DCM (3 回 $\times$ 1 分) の後、1 mL の DCE (3 回 $\times$ 1 分) で洗浄してから、窒素流で乾燥させた。TFA : H₂O : TIPS (95 : 2.5 : 2.5) により、同レジン からペプチドを切断した。この反応粗物を低温のエーテルで沈殿させて濾過し、乾燥させた

。同生成物を、最終的な量が3 mLになるまで0.1% TFAを含む30% MeCN / H₂O中に再溶解させた。濾過した後、試料を分取HPLC系に注入して精製を行った。

【0075】

RCM生成物のアセチル化については、Fmoc脱保護状態の前記レジンに対して1 mLのN-メチル-2-ピロリドン(NMP)による10分間の膨潤を行い、同溶媒を除去した後、無水酢酸とDIPEAとの2 mLのNMP溶液(体積比=85:315:1, 600)を調製して同レジンに添加した。この混合液を、窒素の気泡を導入しながら45分間優しく攪拌したのち溶媒を除去した。そして、DCMとDMFで入念に洗浄した。最後に、上記のような切断と精製を行った。

【0076】

脱保護の後、ペプチドは：i) S5残基(アルケニル化S-アラニン)とR8残基(アルケニル化R-アラニン)；あるいは、ii) 2つのS5残基；を有していた。i) S5残基とR8残基との間、あるいは、ii) 2つのS5残基間に、アルケニル架橋部が形成された。S5残基とR8残基の場合、このアルケニル架橋部は、7-ウンデセニル残基である。また、2つのS5残基の場合、このアルケニル架橋部は、4-オクテニル残基である。

【0077】

図10～図13に、RCMで調製したステーブル化ペプチドの得られる構造を示す。

【0078】

以下の表3に、SARS-CoV-2に対する結合親和性(解離定数K_dとして記載)を含む各環式ウイルス結合部位の各特性をまとめた。結合親和性については、マイクロスケール熱泳動(MST)法で測定した。各環式p6ペプチドp6(R8)₁₅(S5)₂₂は、ナノモル級の結合定数でSARS-CoV-2に結合することが十分見て取れる。

【0079】

【表3】

表3：各環式ウイルス結合部位の特性

ペプチド名	配列	配列番号	置換基	ヘリシティ (%)	K _d / μM
p6(R8) ₁₅ (S5) ₂₂	EEQAKTFLDKFNHE (R8)EDLFYQ(S5)SGLGKG DFR	10	A15(R8), S22(S5)	28	0.275 ± 0.142
Ac-p6(R8) ₁₅ (S5) ₂₂	Ac-EEQAKTFLDKFNHE (R8)EDLFYQ(S5)SGLGKG DFR	11	A15(R8), S22(S5)	25	n.d
p6(S5) ₁₈ (S5) ₂₂	EEQAKTFLDKFNHEAED(S5)FYQ(S5)SGLGKGDFR	12	L18(S5), S22(S5)	4	n.d.
Ac-p6(S5) ₁₈ (S5) ₂₂	Ac- EEQAKTFLDKFNHEAED(S5)FYQ(S5)SGLGKGDFR	13	L18(S5), S22(S5)	10	n.d.

n. d. 測定せず

【0080】

(ペプチドの結合親和性の測定)

親和性を、マイクロスケール熱泳動(MST)法により測定した。同法では、結合リガンド(本例ではペプチド)の数に応じた化学拡散と熱拡散の比(ソーレ効果)が、標識付き化合物(本例ではRBD)の移動性に影響を与える。MST法では、赤外線レーザーで局

所的に熱スポットを生じさせ、続いて温度勾配が発生する。分子は、水-タンパク質界面で自身の特性に応じてこの勾配に沿って移動する。結合したリガンドは、観察されたタンパク質の秩序化された水構造 (ordered water shell) の変化を引き起こすとともに、その実効表面電位に変化や付加を生じさせ得る。これにより、熱泳動振幅の増加または減少による熱泳動挙動の変化が起きる。リガンド濃度が異なるものを加えることで、リガンド濃度に対する蛍光の変化を (y 軸に) プロットすることが可能となる。蛍光の半値変化 (half-maximum change) (飽和曲線からの変曲点) から、質量作用の法則を適用し、タンパク質-リガンド相互作用の K_d を導き出すことができる (Jerabek-Willemsen et al. 2014)。

【0081】

10

第2世代のNHS-Red標識化キット (NanoTemper社) により、RBDの標識と精製を実施した。RBD溶液を、 $10\mu\text{M}$ になるまで水で希釈し、炭酸ナトリウム水溶液で $\text{pH}=8.0$ に再緩衝化し、 $300\mu\text{M}$ の赤色染料を加えて暗所に静置した。サイズ排除クロマトグラフィにより、未反応の染料を含まない標識付きRBDが得られた。分光測定から、標識効率は約1:1 (タンパク質:染料) と分析された。親和性の測定については、 0.05% (v/v) Tween 20を含むダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (DPBS) (Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 不含) 溶液を高品質キャピラリー (NanoTemper社) に入れて実施した。

【0082】

20

次に、各ペプチドの1:1希釈液を16回連続して作製し、 $\text{PBS}+0.05\%$ Tween 20を希釈液として使用して、最終容量をそれぞれ $10\mu\text{L}$ となるようにMSTを同測定した。次に、希釈済みの各試料を $10\mu\text{L}$ の標識付きRBD (10nM) 原液とともに静置した。つまり、各試料では、標識付きの目的タンパク質の濃度がいずれも 5nM に保たれていた。

【0083】

そして、Monolith NT. 115 Pico機器 (NanoTemper Technologies社) で、励起出力20%かつMST出力40%にてMST信号を取得した。IRレーザの開始後1.5秒で信号分析が行われ、得られたデータのフィッティングについては、過去の論文 (Bhatia et al. 2017) どおりに行った。これらの条件は、測定されたいずれの試料に対しても同様の内容とした。

30

【0084】

(RBD (SARS-CoV-2、オミクロンB. 1. 1. 529) に対するp6の親和性の測定)

さらに、化学合成した (配列番号3による) p6ペプチドを、SARS-CoV-2のオミクロン変異株 (B. 1. 1. 529株) の蛍光標識付きRBDの一定濃度 (5nM) に対して滴定した。解離定数 (K_d) は、 280nM と測定された。つまり、p6ペプチドについては、SARS-CoV-2のオミクロン変異株に対する高い結合親和性も確認された。

【0085】

図14は、SARS-CoV-2の野生型 (塗りつぶし円)、アルファ変異株 (空白円)、デルタ変異株 (三角形) 及びオミクロン変異株 (四角形) 由来の蛍光標識付きの受容体結合ドメイン (RBD) に対するMST法を用いた (配列番号3の) p6ペプチドの前述した親和性特性評価の結果を示したものである (野生型、アルファ変異株およびデルタ変異株: ($N=3$)、エラーバーはSEMを示す)。p6ペプチドは、全てのSARS-CoV-2の変異株/株に対し、高い親和性で結合することが十分見て取れる (これらの実験の定量的結果については表1も参照のこと)。

40

【0086】

(p4およびp6誘導体)

ほかにも、複数の付加的なp4およびp6誘導体を合成し、受容体結合ドメインに対するこれらp4およびp6誘導体の、親和性を、p6ペプチドについて前述したMST実験

50

で試験した。

【0087】

p4の各誘導体は、Sarto et al. 2022に記載のように合成した。p6誘導体として、TFA塩であるp6-rigid、p6-disおよびp6-rigid-disをPSL (Peptide Specialty Laboratories GmbH社(ハイデルベルク))に発注した。到着後、各ペプチドをPBSに再構成し、液体窒素で急速凍結して今後使用するまで-80℃で保存した。

【0088】

表4に、試験された各p4誘導体と、親和性測定から得られた解離定数を挙げた。各ペプチドのシステイン残基は、それらの通常の還元状態にある。各親和性測定の結果を図16～図32にも示す。

10

【0089】

【表4】

表4：各p4誘導体（ウイルス結合部位）の特性

ペプチド名	配列	配列 番号	SARS-CoV-2 対象株	Kd/ μ M	95 % CI / μ M ^{*4}
p4C2	ECQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSS	23	2019-nCov	0.034	[0.02, 0.056]
p4C3	EECAKTFLDKFNHEAEDLFYQSS	24	2019-nCov	0.042	[0.024, 0.071]
p4C4	EEQCKTFLDKFNHEAEDLFYQSS	25	2019-nCov	1.298	[0.31, 6.241]
p4C5	EEQACTFLDKFNHEAEDLFYQSS	26	2019-nCov	2.141	[0.557, 7.241]
p4C6	EEQAKCFLDKFNHEAEDLFYQSS	27	2019-nCov	n.d.	n.d.
p4C7	EEQAKTCLDKFNHEAEDLFYQSS	28	2019-nCov	1.941	[0.791, 5.117]
p4C8	EEQAKTFCDKFNHEAEDLFYQSS	29	2019-nCov	0.281	[0.179, 0.432]
p4C9	EEQAKTFLCKFNHEAEDLFYQSS	30	2019-nCov	3.226	[1.901, 5.501]
p4C10	EEQAKTFLDCFNHEAEDLFYQSS	31	2019-nCov	0.331	[0.11, 0.958]
p4C11	EEQAKTFLDKCNHEAEDLFYQSS	32	2019-nCov	0.012	[0.006, 0.021]
p4C12	EEQAKTFLDKFCHEAEDLFYQSS	33	2019-nCov	2.048	[1.026, 4.409]
p4C13	EEQAKTFLDKFNCEAEDLFYQSS	34	2019-nCov	0.028	[-0.012, 2.55]
p4C4,8	EEQCKTFCDKFNHEAEDLFYQSS	35	2019-nCov	0.059	[0.04, 0.085]
p4C8,12	EEQAKTFCDKFCHEAEDLFYQSS	36	2019-nCov	0.047	[0.007, 0.348]
p4C11,15	EEQAKTFLDKCNHECEDLFYQSS	37	2019-nCov	0.068	[0.047, 0.099]
p4C15,19	EEQAKTFLDKFNHECEDLCYQSS	38	2019-nCov	0.238	[0.155, 0.371]
p4C18,22	EEQAKTFLDKFNHEAEDCFYQCS	39	2019-nCov	0.218	[0.156, 0.302]
p4C4,8,18,22	EEQCKTFCDKFNHEAEDCFYQCS	40	2019-nCov	0.400	[0.156, 0.302]

20

30

40

*4 CIとは、信頼区間のことである。

n. d. 測定せず

【0090】

SARS-CoV-2のRBDに対する解離定数が0.3未満、特に0.2未満、特に0.1未満、特に0.05未満、特に0.04未満、特に0.03未満、特に0.02未満の各p4誘導体が、極めて適したウイルス結合部位である。

【0091】

表5に、試験された各p6誘導体と、親和性測定から得られた解離定数を挙げた。各ペ

50

プチドのシステイン残基は、それらの酸化状態で分子内ジスルフィド結合を形成している。各親和性測定の結果を、図 3 3 ～ 図 3 5 にも示している。

【 0 0 9 2 】

【 表 5 】

表 5：各 p 6 誘導体（ウイルス結合部位）の特性

ペプチド名	配列	配列 番号	SARS-CoV-2 対象株	Kd/ μ M	95 % CI / μ M
p6-rigid	EAAAKEEQAKTFLDKFNHEAED LFYQSSGLGKGDFR	41	2019-nCov	4.531	[0.954, 21.4]
p6-dis	EEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQS CGLGKGDFRC	42	2019-nCov	2.596	[1.174, 5.771]
p6-rigid-dis	EAAAKEEQAKTFLDKFNHEAED LFYQSCGLGKGDFRC	43	2019-nCov	5.135	[1.487, 16.9]

10

【 0 0 9 3 】

（ T F F 3 - p 6 の 遺 伝 子 組 換 え 調 製 ）

T F F 3 - p 6 を、遺伝子組換えでも調製した。これを達成するために、Jarva et al ., 2020 のプロトコルに従い、調整した。

【 0 0 9 4 】

その後、5'末端に精製タグと T E V（タバコエッチウイルス）のプロテアーゼ切断箇所を、3'末端に p 6 を導入するようにして、T F F 3 配列を伸長した。この後、その生成物を、シーケンス・ライゲーション非依存性クローニング（S L I C）を用いて細菌発現用のプラスミド p E T 2 8 b に組み込んだ。最終的なプラスミドをシーケンシングで確認し、細菌発現用の B L 2 1 C o d o n P l u s（D E 3）R I P L 細胞中で形質転換させた。この点については、「形質転換済み大腸菌 B L 2 1 C o d o n P l u s（D E 3）R I P L の指数関数的増殖保存培養物の調製」の欄で詳細に前述したとおりに実行した。

30

【 0 0 9 5 】

（タンパク質の発現および洗浄）

それによる前培養物を、T B 培地に O D₆₀₀ = 0.04 で接種した。同培養物を、回転振とう培養器にて 24 時間かけて 250 r p m かつ 26 °C で培養した。24 時間後、細菌培養物を氷上で 15 分間冷却し、遠心機にて 15 分かけて 3000 g で遠心分離した。上清を除去し、細胞を洗浄用緩衝液（H E P E S ベース；p H = 8）で再懸濁させた。懸濁液を 15 分かけて 3000 g で遠心分離し、上清を除去した。この洗浄過程を繰返し行った。同細菌細胞を、溶解緩衝液（H E P E S ベース；p H = 8）中で、超音波処理で溶解させた。溶解液を 45 分かけて 12.000 g で遠心分離し、ペレットを除去し、上清を 0.2 μ m フィルタで濾過した。

40

【 0 0 9 6 】

（タンパク質の精製）

目的のタンパク質を、H i s タグと（ストレプトアビジンの結合モチーフである）S t r e p タグ精製によるタンデムアフィニティ精製法で精製した。イミダゾール（I m H）を、濾過済みの細胞溶解液に最終的な濃度が 40 m M になるまで添加した。同溶解液を、高速タンパク質液体クロマトグラフィ（F P L C）装置（A k t a P u r e 2 5（C y t i v a 社））を用いて、H i s T r a p カラム（C y t i v a 社）に適用した。同カラムを洗浄緩衝液（300 m M の N a C l、50 m M の トリスベース、40 m M の I m H；p H = 7.5）で洗浄し、タンパク質を溶出緩衝液（300 m M の N a C l、50 m M の トリスベース、400 m M の I m H；p H = 7.5）で溶出し、溶出物を分画採取した。

50

目的の生成物を含んだ画分を SDS-PAGE 法により同定して収集した。

【0097】

収集済みの画分を、AktaPure 25を用いてStrep-Tactin XT 4 Flowカラム (IBA Lifesciences 社) に適用した。同カラムを洗浄緩衝液 (100mMのトリスHCl、150mMのNaCl、1mMのETDA; pH=8) で洗浄し、タンパク質を溶出緩衝液 (100mMのトリスHCl、150mMのNaCl、1mMのETDM、50mMのビオチン; pH=8) で溶出し、溶出物を分画採取した。目的の生成物を含んだ画分を、SDS-PAGE 法により同定して収集した後、PBS (pH=7.4) で透析した。タンパク質の含有量を、NanoDrop 2000 分光光度計 (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて280nmの吸光スペクトルで求めた。

10

【0098】

タンデムアフィニティ精製タグを外すために、精製済み生成物を、製造元の推奨に従い、精製済み生成物15µgあたり1UのProTEV Plusを用いて、ProTEV Plus (Promega 社) を、30℃にて一晩静置した。

【0099】

この反応混合液に対し、最終的な濃度が40mMになるまでImHを添加した後、同混合液を、AktaPure 25を用いてHisTrapカラムに適用し、同カラムを洗浄緩衝液 (300mMのNaCl、50mMのトリスベース、40mMのImH; pH=7.5) で洗浄した。切断された精製タグや (Hisタグも含有した) ProTEV Plusはカラム内に残る一方で、最終生成物 (TFF3-p6) を含んだフロースルー (flow-through) を分画採取した。最終生成物を含んだ画分を、SDS-PAGE 法により同定して収集し、PBS (pH=7.4) で透析した。ビバスピンプES遠心濃縮器 (Sartorius 社) により、容量を、NanoDrop 2000で測定した最終的なタンパク質濃度が1mg/mL~3mg/mLになるまで減少させた。この溶液を液体窒素で急速凍結し、今後使用するまで-20℃で保管した。正確な最終生成物とその純度を、SDS-PAGE 法と超高速液体クロマトグラフィ質量分析 (UPLC/MS) 法で管理した。

20

【0100】

(SARS-CoV-2のRBDに対するTFF-p6の親和性の測定)

30

これらの実験では、化学合成したTFF3-p6 (TFF3-C57K (ペンチノイル p6)、すなわち、TFF3-p6 syn (その一次構造は図3にされ、配列番号18に再現されている) と遺伝子組換えTFF3-p6 (TFF3-p6 rec; 配列番号19) を、野生型SARS-CoV2 (nCov2019とも称する) やSARS-CoV2のデルタ変異株 (Delta (B.1.617.2) とも称する) の一定濃度 (5nM) の蛍光標識付きRBDに対して滴定した。表6に、結果的な解離定数 (Kd) を挙げた。図15は、TFF3-p6 synについての本アフィニティ測定の結果を示したものであり、図36は、TFF3-p6 recについての本アフィニティ測定の結果を示したものである。

【0101】

40

【表 6】

表 6：SARS-CoV-2 の RBD に対する TFF-p6 の親和性測定の解離定数

ペプチド名	配列番号	対象 SARS-CoV-2 株	Kd / μ M	95% CI / μ M
TFF3-p6 rec	19	2019-nCov	0.141	[0.109, 0.182]
TFF3-p6 rec	19	Delta (B.1.617.2)	0.243	[0.117, 0.495]
TFF3-p6 syn	18	2019-nCov	12.69	[6.87, 23.8]
TFF3-p6 syn	18	Delta (B.1.617.2)	2.672	[1.263, 5.67]

10

【0102】

(細胞毒性アッセイ)

細胞生存度を、生細胞数キット (HY-K0301 (Hycultec 社)) を用いて製造元の説明書にならって測定した。

【0103】

10% (v/v) FBS、100 U/mL のペニシリン及び 100 μ g/mL のストレプトマイシンを追加した DMEM で、A549 細胞、HBE 細胞および Calu-3 細胞を培養した。96 ウェルプレートに対し、1 ウェルあたり 90 μ L の DMEM 培地で 5×10^4 細胞/mL の濃度になるように細胞を 37℃ かつ 5% CO₂ で一晩播種した。

20

【0104】

脱イオン水に溶解した 10 μ L の遺伝子組換え TFF3-p6 または (親和性タグを残した) タグ-TFF3-p6 を、段階希釈 (6.6×10^{-6} M ~ 6.6×10^{-10} M) で陽性対照 (1% SDS) や陰性対照 (液体賦形剤; 中性、H₂O) を含めて添加し、37℃ かつ 5% CO₂ でさらに 48 時間培養した。バックグラウンド減算のために、細胞を含まずに試料だけを含んだウェルも使用した。48 時間の培養後、CKK8 溶液 (10 μ L/ウェル) を添加し、染料と共に約 3 時間静置した後、テカンプレートリーダー (SPARK、TECAN-reader (Tecan Group 社)) を用いて吸光測定 (450 nm / 650 nm) した。バックグラウンド信号を減算した後、未処置の対照を 100% として細胞生存度を算出した。

30

【0105】

遺伝子組換え TFF3-p6 とタグ-TFF3-p6 のいずれも、陰性対照との有意差を示さなかった。むしろ、細胞生存度は、いずれの場合も約 100% であった。対照的に、陽性対照は 0% 又は 0% に近い細胞生存度を示した。

【0106】

(抗ウイルス効果)

TFF3-p6 の抗ウイルス効果を確かめるために、疑似ウイルス感染系を使用した。同系は、VSV 外被タンパク質に代えて eGFP や SARS-CoV-2 スパイクタンパク質を含ませた水疱性口内炎ウイルス (VSV) に基づいたものである (VSVΔG-CoV-2; Markus Hoffmann 達の論文)。

40

【0107】

TFF3-p6 や PSB (対照) を、VSVΔG-CoV-2 とともに、最終濃度が TFF3-p6 = 50 μ M かつ ウイルス = 2.625×10^4 ffu/mL の 100 μ L 溶液となるように 30 分培養した。この混合液を VeroE6 細胞に与えて、細胞培養インキュベータにて 37℃ で 24 時間培養した。蛍光顕微鏡で撮像し、感染細胞数を求めた。

【0108】

TFF3-p6 は、VSVΔG-CoV2 疑似ウイルスによる VeroE6 細胞の感染

50

を、PBS 対照に比べて約 40% 減少させることができた。

【図面】

【図 1 A】

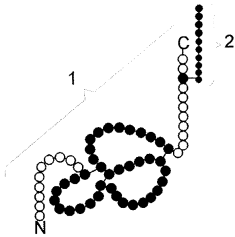


FIG 1A

【図 1 B】

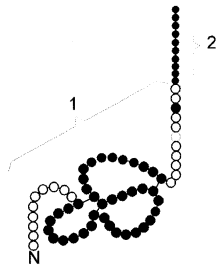


FIG 1B

【図 2 A】

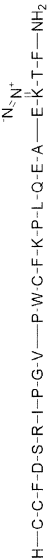


FIG 2A

【図 2 B】

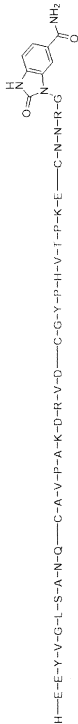


FIG 2B

10

20

30

40

50

【図 2 C】



FIG 2C

【図 3】

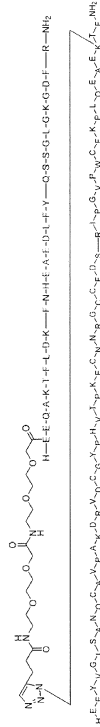


FIG 3

【図 4】

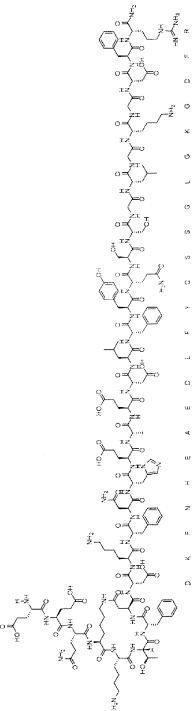


FIG 4

【図 5】

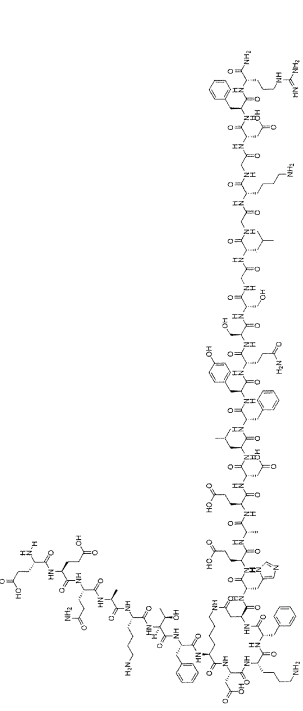


FIG 5

10

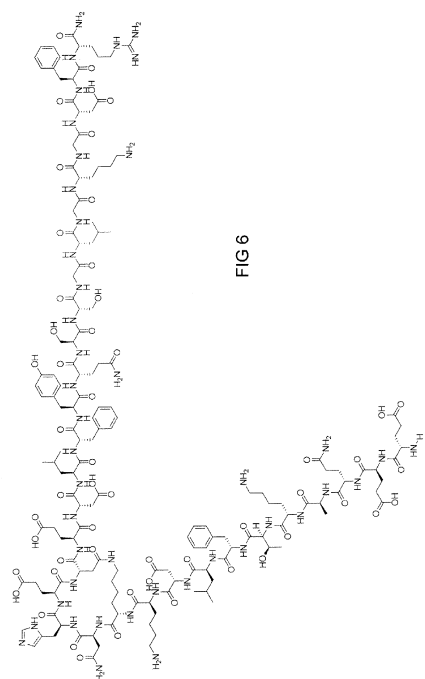
20

30

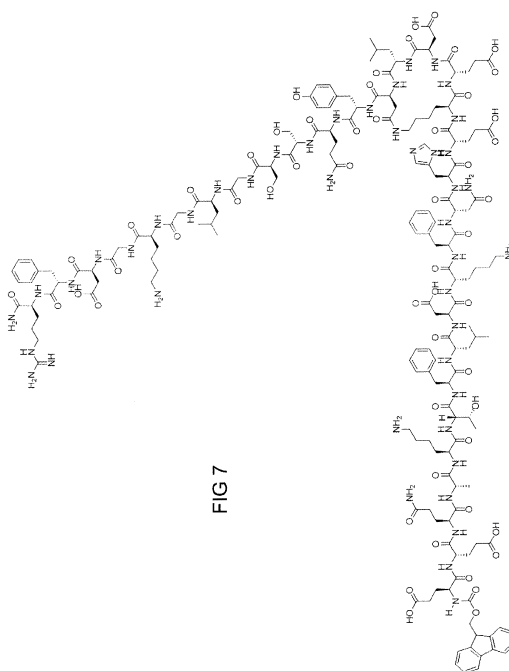
40

50

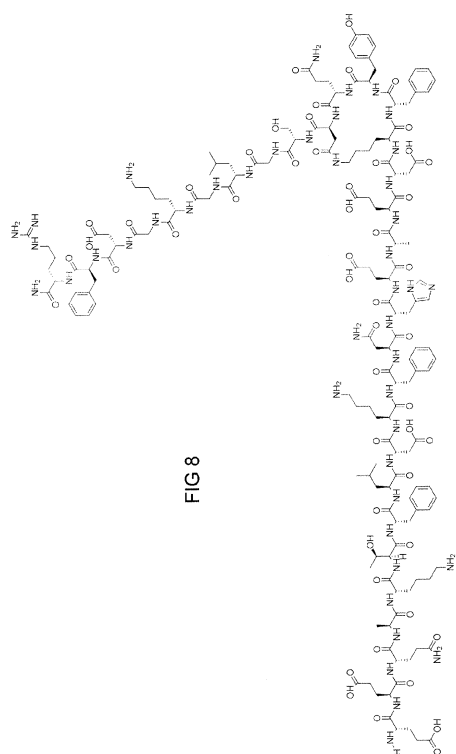
【図 6】



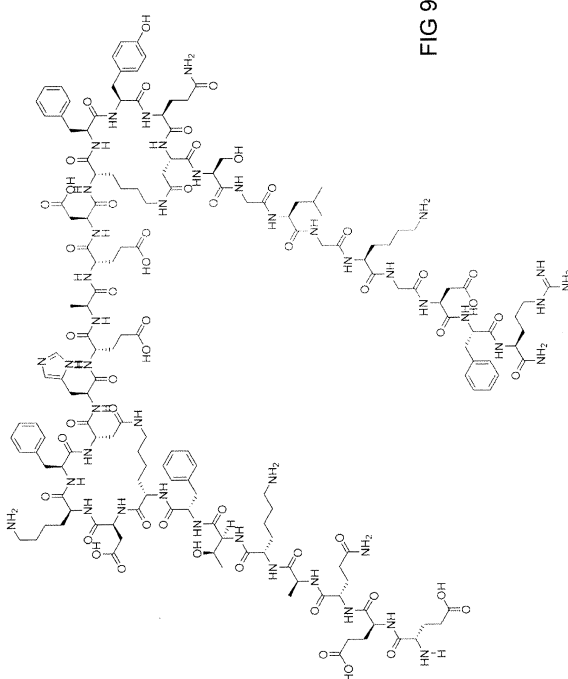
【圖 7】



【圖 8】



【圖 9】



【図 1 0】

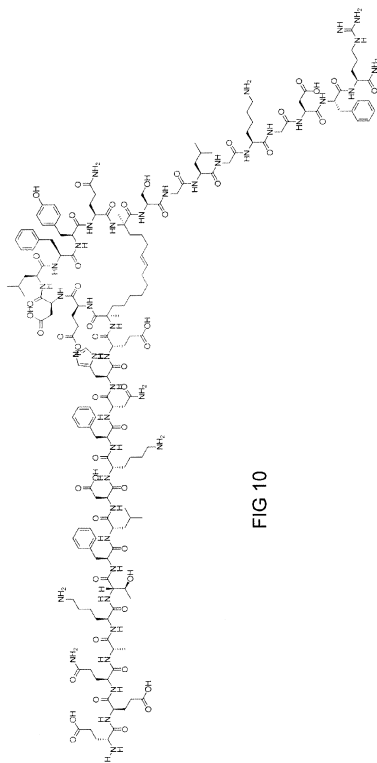


FIG 10

【図 1 1】

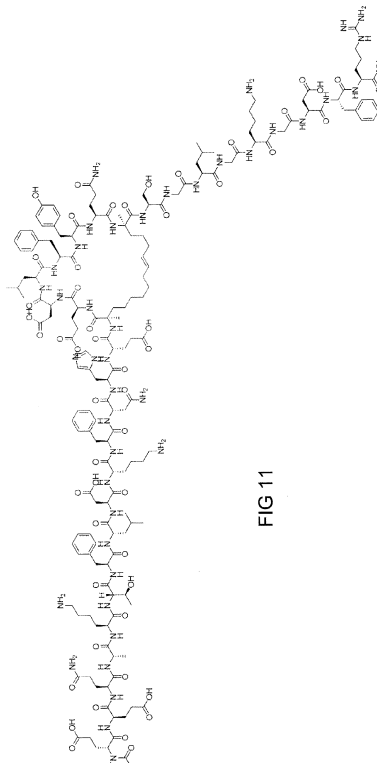


FIG 11

10

20

【図 1 2】

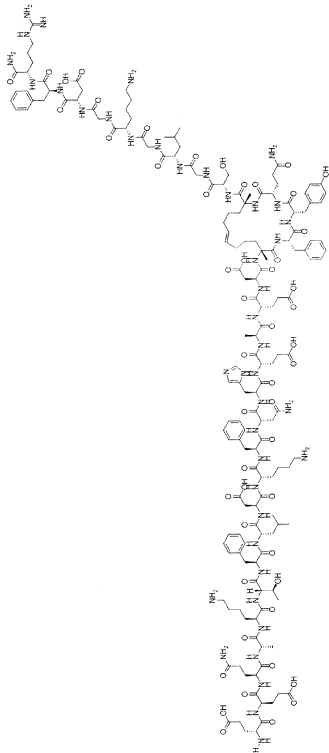


FIG 12

【図 1 3】

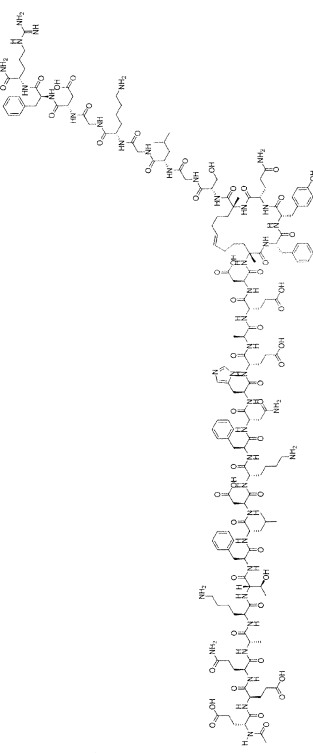


FIG 13

30

40

50

【図 14】

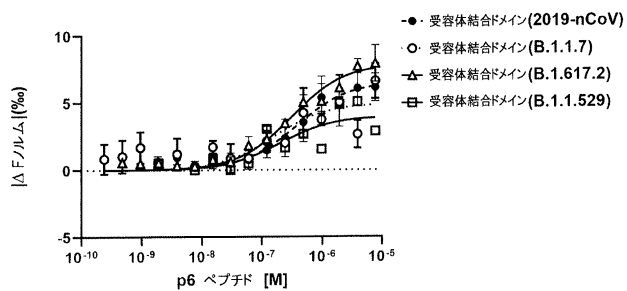


FIG 14

【図 15】

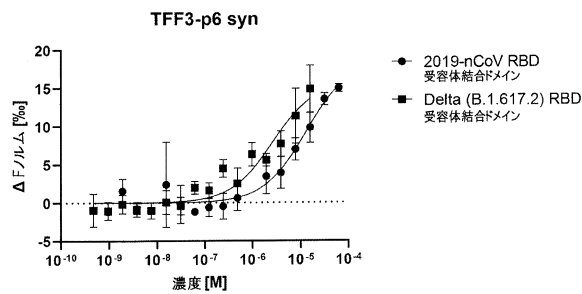


FIG 15

10

【図 16】

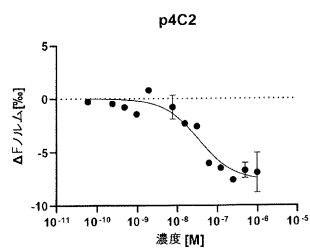


FIG 16

【図 17】

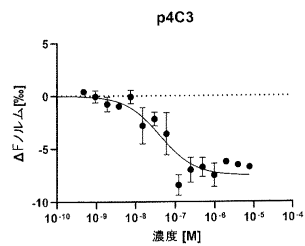


FIG 17

20

【図 18】

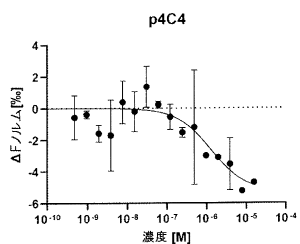


FIG 18

【図 19】

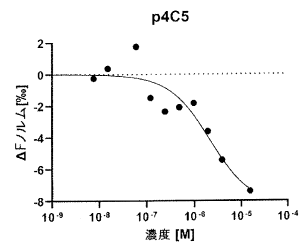


FIG 19

30

40

50

【図 2 0】

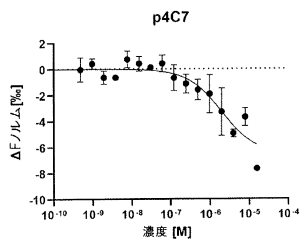


FIG 20

【図 2 1】

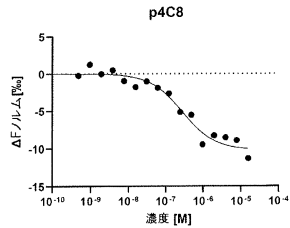


FIG 21

10

【図 2 2】

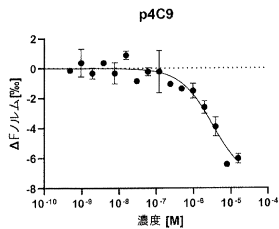


FIG 22

【図 2 3】

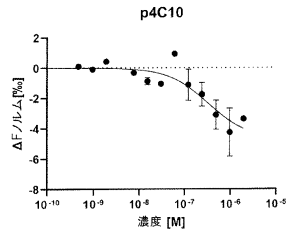


FIG 23

20

【図 2 4】

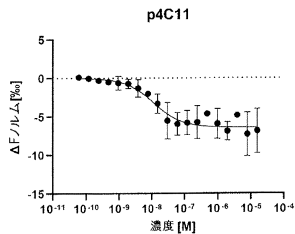


FIG 24

【図 2 5】

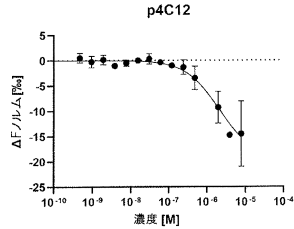


FIG 25

30

40

50

【図 2 6】

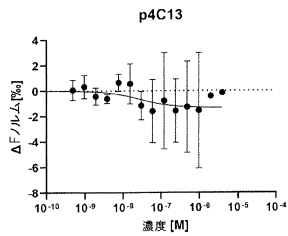


FIG 26

【図 2 7】

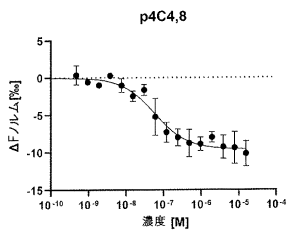


FIG 27

10

【図 2 8】

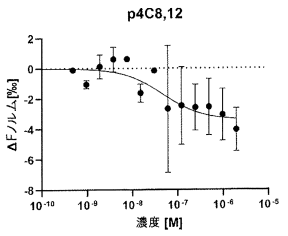


FIG 28

【図 2 9】

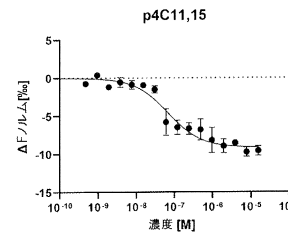


FIG 29

20

【図 3 0】

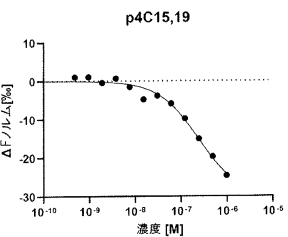


FIG 30

【図 3 1】

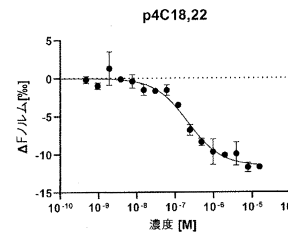


FIG 31

30

40

50

【図 3 2】

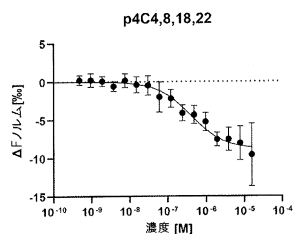


FIG 32

【図 3 3】

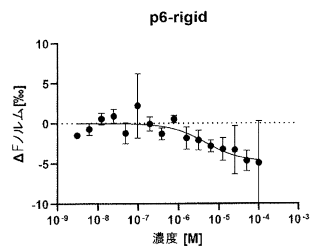


FIG 33

10

【図 3 4】

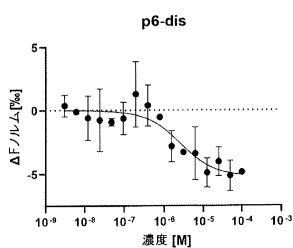


FIG 34

【図 3 5】

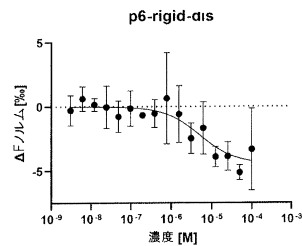


FIG 35

20

【図 3 6】

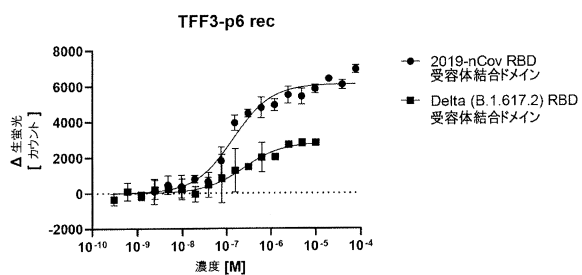


FIG 36

30

【配列表】

2025514630000001.xml

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/058432

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	A61P31/14 C07K14/435 A61K38/05 A61K38/16	
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) A61P C07K 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, BIOSIS, EMBASE, 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	HOFFMANN WERNER: "Trefoil Factor Family (TFF) Peptides and their Different Roles in the Mucosal Innate Immune Defense and More: An Update", CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY , vol. 28, no. 36 1 November 2021 (2021-11-01), pages 7387-7399, XP055968311, NL ISSN: 0929-8673, DOI: 10.2174/0929867328666210215114140 Retrieved from the Internet: URL:https://www.eurekaselect.com/191403/ar ticle figures 1, 2 first sentence of section 2.3; page 7391, right-hand column page 7393, right-hand column -/-	1-4, 9-15
☒ 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 15 June 2023		Date of mailing of the international search report 27/07/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schmitz, Till

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/058432

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	page 7394, left-hand column -----	
A	WO 2021/257781 A1 (VAST SEA BIOTECHNOLOGY INC [US]) 23 December 2021 (2021-12-23) sequence 41 examples 1-12 -----	1-15
A	WO 2021/190980 A1 (QUADRUCCEPT BIO LTD [GB]) 30 September 2021 (2021-09-30) sequence 501 -----	1-15
A	HAN D P ET AL: "Identification of critical determinants on ACE2 for SARS-CoV entry and development of a potent entry inhibitor", VIROLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 350, no. 1, 20 June 2006 (2006-06-20), pages 15-25, XP024896563, ISSN: 0042-6822, DOI: 10.1016/J.VIROL.2006.01.029 [retrieved on 2006-06-20] cited in the application page 19, last paragraph - page 20, paragraph 1 figures 4, 5 -----	1-15
A	MUSKETT FREDERICK W. ET AL: "Solution Structure of the Disulfide-Linked Dimer of Human Intestinal Trefoil Factor (TFF3):? The Intermolecular Orientation and Interactions Are Markedly Different from Those of Other Dimeric Trefoil Proteins", BIOCHEMISTRY, vol. 42, no. 51, 1 December 2003 (2003-12-01), pages 15139-15147, XP055968359, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/bi030182k the whole document -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2023/058432

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2023/058432

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2021257781 A1	23-12-2021	US 2021395744 A1 US 2022127614 A1 WO 2021257781 A1	23-12-2021 28-04-2022 23-12-2021
WO 2021190980 A1	30-09-2021	NONE	

フロントページの続き

,MC,ME,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,NE,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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

- (74)代理人 100087941
弁理士 杉本 修司
- (74)代理人 100112829
弁理士 堤 健郎
- (74)代理人 100155963
弁理士 金子 大輔
- (74)代理人 100150566
弁理士 谷口 洋樹
- (74)代理人 100213470
弁理士 中尾 真二
- (74)代理人 100220489
弁理士 笹沼 崇
- (74)代理人 100225026
弁理士 古後 亜紀
- (74)代理人 100230248
弁理士 杉本 圭二
- (72)発明者 ラウスター・ダニエル
ドイツ国, 1 0 1 7 9 ベルリン, メルキッシェス・ウーファー 5 0
- (72)発明者 ディーン・ロビン
ドイツ国, 2 1 4 4 2 トッペンシュテット, オーヴェーク 2 2
- (72)発明者 ボヴォロツキー・タチアナ
ドイツ国, 1 2 5 2 4 ベルリン, ルドヴェアシュトラッセ 3 4
- (72)発明者 バルドゥア・マルクス
ドイツ国, 1 0 4 3 9 ベルリン, ヴィーハートシュトラッセ 3
- (72)発明者 ハッケンベルガー・クリスティアン
ドイツ国, 1 0 7 7 7 ベルリン, ヴィンターフェルトシュトラッセ 8 6
- (72)発明者 フロレス・セバスチャン
ドイツ国, 1 0 4 0 7 ベルリン, ダンツィガーシュトラッセ 1 2 8
- (72)発明者 マリー・ヤン
チェコ国, 2 5 1 6 6 フルシツェ, ナーヴェス 1 5 6
- (72)発明者 ヘルマン・アンドレアス
ドイツ国, 1 4 4 6 7 ポツダム, ヘルムホルツシュトラッセ 2 1
- F ターム (参考) 4B064 AG01 CA19 CC24 CE12 DA01
4C076 AA95 BB25 BB27 CC35 EE59
4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA17 BA18 BA19 BA20 BA23 BA41
CA53 CA59 MA56 MA59 NA14 ZB331 ZB332
4H045 AA10 AA20 AA30 BA09 BA18 BA41 EA20 FA33 FA74 GA15
GA21 GA26