(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120118207 A
(43)申请公布日 2025.06.10

(21)申请号 202510303424.3

(22)申请日 2018.12.14

(30)优先权数据
62/599,608 2017.12.15 US

(62)分案原申请数据
201880088640.9 2018.12.14

(71)申请人 丹娜-法伯癌症研究院有限公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 R·穆尔塔达 H·D·埃尔塞
L·D·瓦伦斯基 G·H·博德
A·M·摩根 J·E·布拉德纳

(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127
专利代理师 肖轶 庞东成

(51)Int.Cl.
C07K 19/00(2006.01)
C07K 7/06(2006.01)
C07K 14/00(2006.01)
C07K 1/107(2006.01)
C07K 14/435(2006.01)
A61K 47/55(2017.01)
A61K 47/64(2017.01)
A61K 47/54(2017.01)
A61K 38/08(2019.01)
A61K 38/07(2006.01)
A61K 38/17(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书45页
序列表（电子公布） 附图29页

(54)发明名称

稳定肽-介导的靶向蛋白降解

(57)摘要

本申请涉及稳定肽-介导的靶向蛋白降解。具体地,本申请涉及嵌合体,更具体地涉及钉合肽降解决定子嵌合体,其通过使结合疾病相关蛋白的钉合肽结合小分子降解决定子(例如作为降解决定子的cereblon-或VHL-结合小分子)或多肽序列降解决定子(例如作为降解决定子的Copl-结合Trib肽)从而充当蛋白降解诱导部分;或通过使钉合肽降解决定子结合肽(例如钉合肽)或与疾病相关蛋白结合的小分子从而充当蛋白降解诱导部分。本申请还涉及通过使用钉合肽降解决定子嵌合体体使内源性蛋白发生靶向降解的方法,钉合肽降解决定子嵌合体可用于治疗增生性疾病或其他病况,其中消除引起疾病的或疾病相关蛋白可具有治疗益处。本申请还提供了制备本申请化合物及其中间体的方法。

#QWAREIGAQLRXBADXLNAQYERR%	(例) N-term Ac, C-term (%) Lys-降解决定子	PUMA
#FSSNRIXIXLXRTQILNQEWKQRRIQPV%	(例) N-term Ac, C-term (%) Lys-降解决定子	EZH2
#RFFGIXLTNIXLKTEEGN%	(例) N-term Ac, C-term (%) Lys-降解决定子	SOS
#RKALETLRRVGDGVXRNHXTAF%	(例) N-term Ac, C-term (%) Lys-降解决定子	MCL1
#LSQECLEHRERSLXTLRXQRBLF%	(例) N-term Ac, C-term (%) Lys-降解决定子	BCL9
#LTFSEYWAQ#XSAA%	(例) N-term Ac, C-term (%) Lys-降解决定子	P53
#DIRNIARHLAXVGDXBDRSI%	(例) N-term Ac, C-term (%) Lys-降解决定子	BID
#WIAQELRXIGDXFNAYYARR%	(例) N-term Ac, C-term (%) Lys-降解决定子	BIM
#NLWAAQRYGRELRXBDDXFVDSFKK%	(例) N-term Ac, C-term (%) Lys-降解决定子	BAD-S153D
#NLWAAQRYGRELRXBSDXFVDSFKK%	(例) N-term Ac, C-term (%) Lys-降解决定子	BAD
#QLTAARLXXLGDXLHQRTBWR%	(例) N-term Ac, C-term (%) Lys-降解决定子	HRK
#AELEVESATQLRXFGDXLNFRQKLL%	(例) N-term Ac, C-term (%) Lys-降解决定子	NOXA
#QWAREIGAQLRXBADXLNAQYERR%	(例) N-term降解决定子-Ahx, C-term (%) Lys-hDde	PUMA
#FSSNRIXIXLXRTQILNQEWKQRRIQPV%	(例) N-term降解决定子-Ahx, C-term (%) Lys-hDde	EZH2
#RFFGIXLTNIXLKTEEGN%	(例) N-term降解决定子-Ahx, C-term (%) Lys-hDde	SOS
#RKALETLRRVGDGVXRNHXTAF%	(例) N-term降解决定子-Ahx, C-term (%) Lys-hDde	MCL1
#LSQECLEHRERSLXTLRXQRBLF%	(例) N-term降解决定子-Ahx, C-term (%) Lys-hDde	BCL9
#LTFSEYWAQ#XSAA%	(例) N-term降解决定子-Ahx, C-term (%) Lys-hDde	P53
#DIRNIARHLAXVGDXBDRSI%	(例) N-term降解决定子-Ahx, C-term (%) Lys-hDde	BID
#WIAQELRXIGDXFNAYYARR%	(例) N-term降解决定子-Ahx, C-term (%) Lys-hDde	BIM
#NLWAAQRYGRELRXBDDXFVDSFKK%	(例) N-term降解决定子-Ahx, C-term (%) Lys-hDde	BAD-S153D
#NLWAAQRYGRELRXBSDXFVDSFKK%	(例) N-term降解决定子-Ahx, C-term (%) Lys-hDde	BAD
#QLTAARLXXLGDXLHQRTBWR%	(例) N-term降解决定子-Ahx, C-term (%) Lys-hDde	HRK
#AELEVESATQLRXFGDXLNFRQKLL%	(例) N-term降解决定子-Ahx, C-term (%) Lys-hDde	NOXA

CN 120118207 A

1.一种嵌合体,其包含:

与第二部分结合的第一部分;

其中所述第一部分结合被靶向降解的第一蛋白;并且

所述第二部分结合第二蛋白,其中所述第二蛋白是蛋白降解剂。

2.一种在有需要的受试者中治疗由病理性肽或蛋白驱动的疾病或病症的方法,该方法包括向所述受试者施用治疗有效量的权利要求1所述的嵌合体。

3.一种嵌合多肽,其包含钉合肽和结合WD40重复蛋白的肽,所述WD40重复蛋白是E3泛素连接酶的底物衔接子,其中所述肽包含结合WD40重复蛋白的氨基酸的天然结合序列或天然结合共有序列的修饰形式,其中所述修饰形式在天然结合共有序列内包含至少一个氨基酸取代、至少一个氨基酸缺失、至少一个氨基酸插入或其任意组合。

4.一种包含结构无序区的第一蛋白的修饰蛋白,其中所述修饰蛋白与第一蛋白的不同之处在于所述结构无序区包含结合WD40重复蛋白的肽,WD40重复蛋白是E3泛素连接酶的底物衔接子,所述肽包含天然结合序列或天然结合共有序列的修饰形式,其中所述修饰形式在天然结合共有序列内包含至少一个氨基酸取代、至少一个氨基酸缺失、至少一个氨基酸插入或其任意组合。

5.一种在有需要的受试者中治疗由病理性肽或蛋白驱动的疾病或病症的方法,该方法包括向所述受试者施用治疗有效量的权利要求3所述的嵌合融合多肽。

6.一种肽小分子融合物,其包含蛋白靶向性钉合肽和沙利度胺降解决定子部分。

7.一种在有需要的受试者中治疗由病理性肽或蛋白驱动的疾病或病症的方法,该方法包括向所述受试者施用治疗有效量的权利要求6所述的肽小分子融合物。

8.一种肽小分子融合物,其包含蛋白靶向性钉合肽和Von Hippel-Lindau(VHL)降解决定子部分。

9.一种在有需要的受试者中治疗由病理性肽或蛋白驱动的疾病或病症的方法,该方法包括向所述受试者施用治疗有效量的权利要求8所述的肽小分子融合物。

10.一种结合组成型光形态发生1(Cop1)蛋白的肽,其中所述肽包含氨基酸序列DQIVPEY(SEQ ID NO:25)的修饰形式,其中所述修饰形式包含SEQ ID NO:25中的至少一个氨基酸取代、至少一个氨基酸缺失、至少一个氨基酸插入或它们的任何组合,但是如果所述修饰形式由单个氨基酸取代组成,则该氨基酸取代不是在SEQ ID NO:25的1至7位中的任何位置的A或R,或在SEQ ID NO:25的4位的V。

11.一种嵌合融合多肽,其包含蛋白靶向性钉合肽和权利要求10所述的肽。

12.一种在有需要的受试者中治疗由病理性肽或蛋白驱动的疾病或病症的方法,该方法包括向所述受试者施用治疗有效量的权利要求11的嵌合融合多肽。

稳定肽-介导的靶向蛋白降解

[0001] 本申请是分案申请,其原申请的国际申请号是PCT/US2018/065784,国际申请日是2018年12月14日,中国国家申请号为201880088640.9,进入中国的日期为2020年08月05日,发明名称为“稳定肽-介导的靶向蛋白降解”。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2017年12月15日提交的美国临时申请第62/599,608号的优先权,通过引用将其全部内容合并于此。

技术领域

[0004] 本公开涉及稳定肽和小分子嵌合化合物,称为钉合肽-降解决定子嵌合体,其充当结合的蛋白靶向部分(通过钉合肽或分子部分)和诱导蛋白降解的部分(通过另一钉合肽或分子部分)。嵌合体包括与以下任何一种融合的钉合肽:(i)小分子降解决定子(例如,作为降解决定子的cereblon-或VHL-结合小分子)、(ii)多肽序列降解决定子、(iii)作为降解决定子的钉合肽、或(iv)作为蛋白靶向化合物的小分子(以钉合肽作为降解决定子),及它们的使用方法。

背景技术

[0005] 降解决定子(degron)是蛋白的一部分,在其降解中起主要作用。降解决定子通常是短氨基酸序列,可以位于蛋白序列中的任何位置(Cho等,Genes&Development,24(5):438-442(2010);Fortmann等,Journal of Molecular Biology,427(17):2748-2756(2015);Dohmen等,Science,263(5151):1273-1276(1994);Varshavsky,Proceedings of National Academy of Sciences,93(22):12142-12149(1996))。实际上,一些蛋白具有多个降解决定子。在原核生物和真核生物中都鉴定出了降解决定子。虽然存在若干类型的降解决定子,并且尽管事实上这些群体之间存在高度的变异性,但降解决定子在调节蛋白降解速率方面都非常相似。降解可能涉及泛素或可能不依赖泛素。泛素依赖性的降解决定子含有被同源泛素E3连接酶识别的特定序列。

[0006] 泛素-蛋白酶体途径(UPP)是调节关键调节蛋白并降解错误折叠或异常蛋白的主要途径。泛素与特定蛋白底物的共价连接通过E3泛素连接酶的作用实现。例如,Cereblon(CRBN)与受损的DNA结合蛋白1(DDB1)相互作用,并与Cullin 4(CUL4A)形成E3泛素连接酶复合物,然后它作为底物受体起作用,从而使CRBN识别的蛋白可以被泛素化并由蛋白酶体降解。还已确定CRBN可以结合免疫调节药物(IMiD),例如沙利度胺(thalidomide)。此类结合与致畸性的机制以及IMiD(例如来那度胺)的细胞毒性有关,后者用于治疗多发性骨髓瘤。

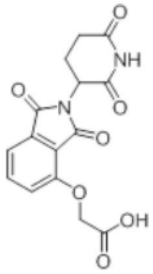
发明内容

[0007] 本公开涉及合成和表征可以用于靶向任何目标蛋白的双功能稳定肽-小分子(例如,沙利度胺降解决定子)缀合物,稳定肽-肽(例如,一级降解决定子序列)缀合物,稳定肽-

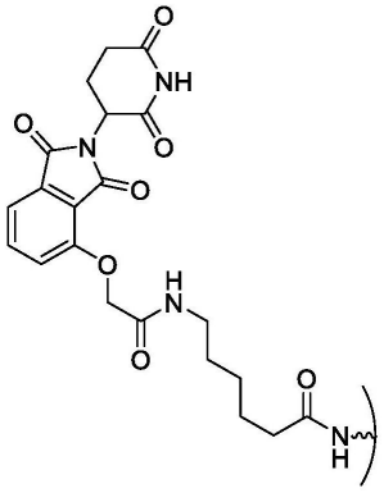
稳定肽(例如,一级降解决定子序列)缀合物,以及小分子-稳定肽(例如一级降解决定子序列)缀合物(这些缀合物也称为“嵌合体(chimera)”)。例如,这些缀合物可用于靶向涉及疾病或引起疾病的蛋白。靶向蛋白可以是病毒、细菌、动物或人来源的。在某些情况下,缀合物可用于靶向引起疾病或与疾病相关的蛋白。此类稳定肽缀合物可用于治疗由此类病理蛋白驱动的疾病。钉合肽(stapled peptide)靶向大的且通常不可药物治疗的蛋白相互作用表面的能力,这与降解决定子功能相结合,使降解决定子技术的应用范围扩展超出小分子所达到的范围,并可以增强钉合肽的生物活性。

[0008] 在第一方面,本公开特征在于肽-小分子融合体,其包含蛋白靶向性钉合肽和小分子降解决定子部分(例如,沙利度胺部分或Von Hippel-Lindau(VHL)部分)。

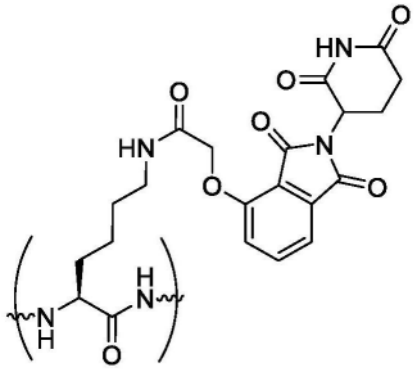
[0009] 在一些实施方式中,小分子降解决定子(例如,沙利度胺部分或VHL部分)缀合至蛋白靶向性钉合肽的N末端。在一些情况下,小分子降解决定子(例如,沙利度胺部分或VHL部分)缀合至蛋白靶向性钉合肽的C末端。在某些情况下,所述蛋白片段性钉合肽的N-和C末端之间的肽序列中插入的非天然氨基酸中包含小分子降解决定子(例如,沙利度胺部分或VHL部分)。在一些情况下,钉合肽结合引起疾病的蛋白。在一些情况下,钉合肽结合细胞内蛋白。在一些情况下,钉合肽结合细胞外蛋白。在一些情况下,钉合肽结合细胞表面蛋白(例如,受体)。在一些情况下,钉合肽结合杀手蛋白(例如,BAX、BAK)或对细胞有害或引起神经变性的蛋白(例如,IgG、β淀粉样蛋白、tau、α-突触核蛋白、TDP-43、血红蛋白(镰状细胞)、超氧化物歧化酶、Notch3、FUS、GFAP)。在一些情况下,钉合肽结合蛋白选自由以下组成的组:BCL2、$BCLX_L$、MCL-1、BFL-1、BCL-w、BCL-B、EZH2、HDM2/HDMX、KRAS/NRAS/HRAS、MYC、b-连环蛋白、PI3K、PTEN、TSC、AKT、BRCA1/2、EWS-FLI、MLL融合蛋白、受体酪氨酸激酶、HOX同源物、JUN、Cyclin D、Cyclin E、BRAF、CRAF、CDK4、CDK2、HPV-E6/E7、Aurora激酶、MITF、Wnt1、PD-1、BCR和CCR5。在一些情况下,钉合肽结合细菌蛋白。在一些情况下,钉合肽结合病毒蛋白。在某些情况下,沙利度胺部分包含以下提供的结构:

[0010] 

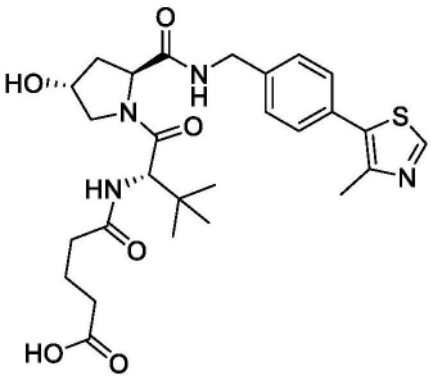
[0011] 在一些情况下,沙利度胺部分,在缀合于稳定肽的N末端时,包含以下提供的结构:

[0012] 

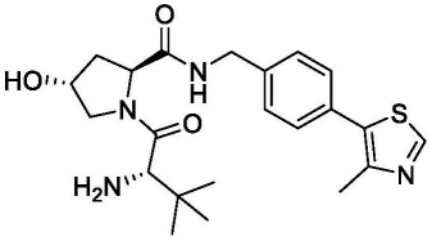
[0013] 在一些情况下,沙利度胺部分,在缀合于稳定肽的C末端时,包含以下提供的结构:

[0014] 

[0015] 在一些情况下,VHL部分包含以下结构:

[0016] 

[0017] 在一些情况下,VHL部分包含以下结构:

[0018] 

[0019] 在第二方面,本公开的特征在于在有需要的人类受试者中治疗由病理性肽或蛋白驱动的疾病或病症的方法。该方法包括向人类受试者施用治疗有效量的本文所述的肽小分子融合体。

[0020] 在第三方面,本发明的特征在于结合WD40重复蛋白的肽降解决定子,其中所述WD40重复蛋白是E3泛素连接酶的底物衔接子。该肽包含与WD40重复蛋白结合的氨基酸序列的天然结合序列或天然结合共有序列的修饰形式。该修饰形式在与WD40重复蛋白结合的氨基酸序列的天然结合共有序列内包含至少一个氨基酸取代、至少一个氨基酸缺失、至少一个氨基酸插入或其任意组合。在SEQ ID NO:26-30和106-118中提供了包含与WD40重复蛋白结合的氨基酸序列的天然结合序列或天然结合共有序列的修饰形式的示例性肽。在一个说明性实例中,本公开提供了结合组成型光形态发生1(Constitutive Photomorphogenic 1)(Cop1)蛋白的肽。该肽包含氨基酸序列DQIVPEY(SEQ ID NO:25)的修饰形式。所述修饰形式在SEQ ID NO:25中包含至少一个氨基酸取代、至少一个氨基酸缺失、至少一个氨基酸插入或其任何组合。如果该修饰形式由单个氨基酸取代组成,则该氨基酸取代该氨基酸取代不是在SEQ ID NO:25的1至7中的任何位置的A或R,或在SEQ ID NO:25的4位的V。

[0021] 在一些实施方式中,肽包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列,不同之处在于具有至少一个氨基酸取代。在一些情况下,肽包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列,不同之处在于具有至少一个氨基酸缺失。在一些情况下,肽包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列,不同之处在于具有至少一个氨基酸取代和至少一个氨基酸缺失。在某些情况下,肽包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列,不同之处在于具有1至6个氨基酸取代。在一些情况下,SEQ ID NO:25的4位(V)和/或5位(P)未取代。在一些情况下,SEQ ID NO:25的1位(D)、2位(Q)、3位(I)和6位(E)中的一个或多个被取代。在一些情况下,肽包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列,不同之处在于具有1个氨基酸缺失。在某些情况下,SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的7位(Y)缺失。在一些情况下,肽包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列,不同之处在于具有1至6个氨基酸取代和至少一个氨基酸缺失。在一些情况下,所述肽具有选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO.:26至30。在一个情况下,所述肽具有SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列。

[0022] 在某些实施方式中,肽的长度为4至10个氨基酸。

[0023] 在一些情况下,肽结合Cop1,结合亲和力为1nM至300nM。在一些情况下,肽结合Cop1,结合亲和力为1nM至1000nM。在一些情况下,肽结合Cop1,结合亲和力为10nM至300nM。在一些情况下,肽结合Cop1,结合亲和力为100nM至300nM。在一些情况下,肽结合Cop1,结合亲和力为200nM至300nM。在一些情况下,肽结合Cop1,结合亲和力为200nM至1000nM。

[0024] 在第四方面,本公开涉及包含蛋白靶向性钉合肽和Trib1肽降解决定子或其变体的嵌合融合多肽。

[0025] 在一些实施方式中,钉合肽结合细胞内蛋白。在一些实施方式中,钉合肽结合细胞外蛋白。在一些实施方式中,钉合肽结合细胞表面蛋白(例如,受体)。在一些实施方式中,钉合肽结合引起疾病的或疾病相关蛋白。在一些实施方式中,钉合肽结合杀手蛋白(例如,BAX、BAK)或对细胞有害或引起神经变性的蛋白(例如,IgG、β淀粉样蛋白、tau、α-突触核蛋白、TDP-43、HbS、超氧化物歧化酶、Notch3、FUS、GFAP)。在一些实施方式中,钉合肽结合蛋白选自由以下组成的组:BCL2、BCLXL、MCL-1、BFL-1、BCL-w、BCL-B、EZH2、HDM2/HDMX、KRAS/NRAS/HRAS、MYC、β-连环蛋白、PI3K、PTEN、TSC、AKT、BRCA1/2、EWS-FLI融合蛋白、MLL融合蛋白、受体酪氨酸激酶、HOX同源物、JUN、Cyclin D、Cyclin E、BRAF、CRAF、CDK4、CDK2、HPV-E6/E7、Aurora激酶、MITF、Wnt1、PD-1、BCR和CCR5。在一些实施方式中,钉合肽结合细菌蛋白。在

一些实施方式中,钉合肽结合病毒蛋白。

[0026] 在第五方面,本公开特征在于包含钉合肽和结合WD40重复蛋白的肽的嵌合多肽,其中WD40重复蛋白是E3泛素连接酶的底物衔接子。所述肽包含结合WD40重复蛋白的氨基酸的天然结合序列或天然结合共有序列的修饰形式。该修饰形式在结合WD40重复蛋白的氨基酸的天然结合共有序列内包含至少一个氨基酸取代、至少一个氨基酸缺失、至少一个氨基酸插入或其任意组合。

[0027] 在一些实施方式中,作为E3泛素连接酶的底物衔接子的所述WD40重复蛋白选自由以下组成的组:MDM2、SKP2-CKS1、FBXW1、FBXW2、FBXW4、FBXW5、FBXW7、FBXW8、FBXW9、FBXW10、FBXW11、FBXW12、SPOP、VHL、ITCH、KEAP1、KLHL2、KLHL3、KLHL7、KLHL12、KLHL13、KLHL15、KLHL20、KLHL21、KLHL24、KLHL40、KLHL42、COP1、TRAF7、RFWD3、DCAF1、DCAF2、DCAF3、DCAF4、DCAF5、DCAF6、DCAF7、DCAF8、DCAF9、DCAF10、DCAF11、DCAF12、DCAF13、DCAF14、DCAF15、DCAF16、DCAF17、DCAF19、SIAH1、TRPC4AC、DET1、WSB1、WSB2、HERC1、DDB2、CSA、CBL、CDC20和FZR1。

[0028] 在一些实施方式中,天然结合序列或天然结合共有序列是选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO.:25、31-46和65-105。在一些情况下,天然结合共有序列是SEQ ID NO:25。在其他情况下,天然结合共有序列是SEQ ID NO:46。

[0029] 在一些实施方式中,肽包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列,不同之处在于具有至少一个氨基酸取代。在一些情况下,肽包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列,不同之处在于具有至少一个氨基酸缺失。在一些情况下,肽包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列,不同之处在于具有至少一个氨基酸取代和至少一个氨基酸缺失。在某些情况下,肽包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列,不同之处在于具有1至6个氨基酸取代。在一些情况下,SEQ ID NO:25的4位(V)和/或5位(P)未取代。在一些情况下,SEQ ID NO:25的1位(D)、2位(Q)、3位(I)和6位(E)中的一个或多个被取代。在一些情况下,肽包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列,不同之处在于具有1个氨基酸缺失。在某些情况下,SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的7位(Y)缺失。在一些情况下,肽包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列,不同之处在于具有1至6个氨基酸取代和至少一个氨基酸缺失。在一些情况下,所述肽具有选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO.:26至30。在一个情况下,所述肽具有SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列。

[0030] 在某些实施方式中,肽的长度为4至30个氨基酸。在某些实施方式中,肽长度为4至20个氨基酸。在某些实施方式中,肽长度为4至15个氨基酸。在某些实施方式中,肽长度为5至20个氨基酸。

[0031] 在某些实施方式中,肽结合Cop1,结合亲和力为1nM至300nM;10nM至300nM;100nM至300nM;或200nM至300nM。在某些实施方式中,肽结合Cop1,结合亲和力为1nM至1000nM。在某些实施方式中,肽结合Cop1,结合亲和力为200nM至1000nM。

[0032] 在一些实施方式中,钉合肽结合细胞内蛋白。在一些实施方式中,钉合肽结合细胞外蛋白。在一些实施方式中,钉合肽结合细胞表面蛋白(例如,受体)。在一些实施方式中,钉合肽结合引起疾病的或疾病相关蛋白。在一些实施方式中,钉合肽结合杀手蛋白(例如,BAX、BAK)或对细胞有害或引起神经变性的蛋白(例如,IgG、β淀粉样蛋白、tau、α-突触核蛋白、TDP-43、HbS(血红蛋白-镰状细胞)、超氧化物歧化酶、Notch3、FUS、GFAP)。在一些实施方

式中,钉合肽结合蛋白选自由以下组成的组:BCL2、BCLXL、MCL-1、BFL-1、BCL-w、BCL-B、EZH2、HDM2/HDMX、KRAS/NRAS/HRAS、MYC、β-连环蛋白、PI3K、PTEN、TSC、AKT、BRCA1/2、EWS-FLI融合蛋白、MLL融合蛋白、受体酪氨酸激酶、HOX同源物、JUN、Cyclin D、Cyclin E、BRAF、CRAF、CDK4、CDK2、HPV-E6/E7、Aurora激酶、MITF、Wnt1、PD-1、BCR和CCR5。在一些实施方式中,钉合肽结合细菌蛋白。在一些实施方式中,钉合肽结合病毒蛋白。在某些情况下,钉合肽靶向引起神经变性的蛋白聚集体(例如,β淀粉样蛋白)。

[0033] 在第六方面,本公开特征在于包含结构无序区的第一蛋白的修饰蛋白。修饰蛋白与第一蛋白的不同之处在于,所述结构无序区包含结合WD40重复蛋白的肽,WD40重复蛋白是E3泛素连接酶的底物衔接子。所述肽包含天然结合共有序列的修饰形式,其中修饰形式在天然结合共有序列内包含至少一个氨基酸取代、至少一个氨基酸缺失、至少一个氨基酸插入或其任意组合。

[0034] 在某些实施方式中,作为的E3泛素连接酶的底物衔接子的WD40重复蛋白选自由以下组成的组:MDM2、SKP2-CKS1、FBXW1、FBXW2、FBXW4、FBXW5、FBXW7、FBXW8、FBXW9、FBXW10、FBXW11、FBXW12、SPOP、VHL、ITCH、KEAP1、KLHL2、KLHL3、KLHL7、KLHL12、KLHL13、KLHL15、KLHL20、KLHL21、KLHL24、KLHL40、KLHL42、COP1、TRAF7、RFWD3、DCAF1、DCAF2、DCAF3、DCAF4、DCAF5、DCAF6、DCAF7、DCAF8、DCAF9、DCAF10、DCAF11、DCAF12、DCAF13、DCAF14、DCAF15、DCAF16、DCAF17、DCAF19、SIAH1、TRPC4AC、DET1、WSB1、WSB2、HERC1、DDB2、CSA、CBL、CDC20和FZR1。在一些情况下,天然结合共有序列是选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO.:25、31-46和65-105。在一些情况下,天然结合共有序列是SEQ ID NO:25。在一些情况下,天然结合共有序列是SEQ ID NO:46。

[0035] 在一些实施方式中,肽包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列,不同之处在于具有至少一个氨基酸取代。在一些情况下,肽包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列,不同之处在于具有至少一个氨基酸缺失。在一些情况下,肽包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列,不同之处在于具有至少一个氨基酸取代和至少一个氨基酸缺失。在某些情况下,肽包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列,不同之处在于具有1至6个氨基酸取代。在一些情况下,SEQ ID NO:25的4位(V)和/或5位(P)未取代。在一些情况下,SEQ ID NO:25的1位(D)、2位(Q)、3位(I)和6位(E)中的一个或多个被取代。在一些情况下,肽包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列,不同之处在于具有1个氨基酸缺失。在某些情况下,SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的7位(Y)缺失。在一些情况下,肽包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列,不同之处在于具有1至6个氨基酸取代和至少一个氨基酸缺失。在一些情况下,所述肽具有选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO.:26至30。在一个情况下,所述肽具有SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列。

[0036] 在某些实施方式中,肽长度为4至10个氨基酸。

[0037] 在某些实施方式中,肽结合Cop1,结合亲和力为1nM至300nM;10nM至300nM;100nM至300nM;或200nM至300nM。在某些实施方式中,肽结合Cop1,结合亲和力为1nM至1000nM。在某些实施方式中,肽结合Cop1,结合亲和力为200nM至1000nM。

[0038] 在第七方面,本公开特征在于在有需要的人受试者中治疗由病理性肽或蛋白驱动的疾病或病症的方法。该方法包括向所述人受试者施用治疗有效量的本文所述的嵌合融合多肽。

[0039] 在第八方面,本公开特征在于选自由以下组成的组的肽降解决定子:SEQ ID NO.:106至118。

[0040] 在一些实施方式中,这些肽链接到稳定肽。

[0041] 在第九方面,本公开提供了稳定肽-肽降解决定子嵌合体,其选自由以下组成的组:SEQ ID NO.:119至126。

[0042] 在所有上述方面的某些实施方式中,稳定肽-降解决定子嵌合体用于靶向一种或多种以下物质的降解:BCL2、$BCLX_L$、BCL_W、MCL-1、BFL-1、BAX、MDM2或MDMX。

[0043] 在第十方面,本公开提供稳定肽-稳定肽降解决定子嵌合体,其包含2个稳定肽—第一稳定肽和第二稳定肽,其中第一稳定肽结合作为待降解的蛋白靶标的第一蛋白,第二稳定肽结合作为降解剂蛋白的第二蛋白。在某些实施方式中,第一稳定肽结合作为降解靶标的疾病相关蛋白,并且第二稳定肽结合降解剂蛋白,如E3连接酶(例如MDM2)。

[0044] 在一些实施方式中,第一蛋白是细胞内蛋白。在一些实施方式中,第一蛋白是细胞外蛋白。在一些实施方式中,第一蛋白是细胞表面蛋白(例如,受体)。在一些实施方式中,第一蛋白是引起疾病的或疾病相关蛋白。在一些实施方式中,第一蛋白是杀手蛋白(例如,BAX、BAK)或对细胞有害或引起神经变性的蛋白(例如,IgG、β淀粉样蛋白、tau、α-突触核蛋白、TDP-43、HbS(血红蛋白-镰状细胞)、超氧化物歧化酶、Notch3、FUS、GFAP)。在一些实施方式中,第一蛋白是选自由以下组成的组的蛋白:BCL2、BCLXL、MCL-1、BFL-1、BCL-w、BCL-B、EZH2、HDM2/HDMX、KRAS/NRAS/HRAS、MYC、β-连环蛋白、PI3K、PTEN、TSC、AKT、BRCA1/2、EWS-FLI融合蛋白、MLL融合蛋白、受体酪氨酸激酶、HOX同源物、JUN、Cyclin D、Cyclin E、BRAF、CRAF、CDK4、CDK2、HPV-E6/E7、Aurora激酶、MITF、Wnt1、PD-1、BCR和CCR5。在一些实施方式中,第一蛋白是细菌蛋白。在一些实施方式中,第一蛋白是病毒蛋白。在某些情况下,第一蛋白是引起神经变性的蛋白聚集体(例如,β淀粉样蛋白)。

[0045] 在某些实施方式中,第一稳定所述肽具有SEQ ID NO.:1-24和134中任一个或其变体所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,第二稳定所述肽具有以下所示的氨基酸序列:SEQ ID NO:6或其变体。在某些实施方式中,第二稳定所述肽具有以下所示的氨基酸序列:SEQ ID NO:18或其变体。

[0046] 在某些实施方式中,第二蛋白是降解剂蛋白,例如E3泛素连接酶或E3泛素连接酶的底物衔接子。在某些实施方式中,第二蛋白是E3泛素连接酶。在一些实施方式中,第二蛋白结合至E3连接酶(例如,MDM2)或与E3连接酶复合的蛋白,例如结合MDM2的MDMX。在某些实施方式中,E3泛素连接酶是RING E3泛素连接酶(例如,Mdm2-MdmX、TRIM5α、c-CBL、cIAP、RNF4、BIRC7、IDOL、BRCA1-BARD1、RING1B-Bmi1、E4B、CHIP、Prp19)。在某些实施方式中,E3泛素连接酶是HECT E3泛素连接酶(例如,Smurf1、Smurf2、Itch、E6AP)。在某些实施方式中,E3泛素连接酶是RBR E3泛素连接酶(例如,Parkin,Parc,RNF144(A/B),HOIP,HHARI)。例如,E3泛素连接酶的非限制性实例见Morreale和Walden,Cell 165,2016DOI http:/dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.003。

[0047] 在某些实施方式中,嵌合体的第二稳定肽部分具有以下所示的氨基酸序列:SEQ ID NO:134或其变体。在某些实施方式中,第二稳定所述肽具有以下所示的氨基酸序列:SEQ ID NO:6或其变体。在某些实施方式中,第二稳定所述肽具有以下所示的氨基酸序列:SEQ ID NO:18或其变体。

[0048] 在第十一方面,本公开提供小分子-稳定肽降解决定子嵌合体,其包含:小分子和稳定肽,其中小分子结合作为要降解的蛋白靶标的第一蛋白;且稳定肽结合作为降解剂蛋白的第二蛋白。在某些实施方式中,稳定肽结合并募集降解剂蛋白,如E3连接酶(例如MDM2)或降解剂蛋白复合物,例如MDM2/MDMX复合物。

[0049] 在一些实施方式中,第一蛋白是细胞内蛋白。在一些实施方式中,第一蛋白是细胞外蛋白。在一些实施方式中,第一蛋白是细胞表面蛋白(例如,受体)。在一些实施方式中,第一蛋白是引起疾病的或疾病相关蛋白。在一些实施方式中,第一蛋白是杀手蛋白(例如,BAX,BAK)或对细胞有害或引起神经变性的蛋白(例如,IgG、β淀粉样蛋白、tau、α-突触核蛋白、TDP-43、HbS(血红蛋白-镰状细胞)、超氧化物歧化酶、Notch3、FUS、GFAP)。在一些实施方式中,第一蛋白是选自由以下组成的组的蛋白:BCL2、BCLXL、MCL-1、BFL-1、BCL-w、BCL-B、EZH2、HDM2/HDMX、KRAS/NRAS/HRAS、MYC、β-连环蛋白、PI3K、PTEN、TSC、AKT、BRCA1/2、EWS-FLI融合蛋白、MLL融合蛋白、受体酪氨酸激酶、HOX同源物、JUN、Cyclin D、Cyclin E、BRAF、CRAF、CDK4、CDK2、HPV-E6/E7、Aurora激酶、MITF、Wnt1、PD-1、BCR和CCR5。在一些实施方式中,第一蛋白是细菌蛋白。在一些实施方式中,第一蛋白是病毒蛋白。在某些情况下,第一蛋白是蛋白聚集体(例如,β淀粉样蛋白)。

[0050] 在某些实施方式中,第二蛋白是降解剂蛋白,例如E3泛素连接酶或E3泛素连接酶的底物衔接子。在某些实施方式中,第二蛋白是E3泛素连接酶。在一些实施方式中,第二蛋白结合至E3连接酶(例如,MDM2)或与E3连接酶复合的蛋白,例如结合MDM2的MDMX。在某些实施方式中,E3泛素连接酶是RING E3泛素连接酶(例如,Mdm2-MdmX、TRIM5α、c-CBL、cIAP、RNF4、BIRC7、IDOL、BRCA1-BARD1、RING1B-Bmi1、E4B、CHIP、Prp19)。在某些实施方式中,E3泛素连接酶是HECT E3泛素连接酶(例如,Smurf1、Smurf2、Itch、E6AP)。在某些实施方式中,E3泛素连接酶是RBR E3泛素连接酶(例如,Parkin、Parc、RNF144(A/B)、HOIP、HHARI)。例如,E3泛素连接酶的非限制性实例见Morreale和Walden,Cell 165,2016DOI http:/dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.003。

[0051] 在第十二方面,本公开提供嵌合体,其包含:与第二部分结合的第一部分;其中第一部分结合被靶向以降解的第一蛋白,并且第二部分结合第二蛋白;其中第二蛋白是蛋白降解剂。

[0052] 在某些方面,第一部分和第二部分相互共价连接。在某些方面,第一部分和第二部分通过接头相互连接。

[0053] 在一些实施方式中,第一蛋白是细胞内蛋白。在一些实施方式中,第一蛋白是细胞外蛋白。在一些实施方式中,第一蛋白是细胞表面蛋白(例如,受体)。在一些实施方式中,第一蛋白是引起疾病的或疾病相关蛋白。在一些实施方式中,第一蛋白是杀手蛋白(例如,BAX、BAK)或对细胞有害或引起神经变性的蛋白(例如,IgG、β淀粉样蛋白、tau、α-突触核蛋白、TDP-43、HbS(血红蛋白-镰状细胞)、超氧化物歧化酶、Notch3、FUS、GFAP)。在一些实施方式中,第一蛋白是选自由以下组成的组的蛋白:BCL2、BCLXL、MCL-1、BFL-1、BCL-w、BCL-B、EZH2、HDM2/HDMX、KRAS/NRAS/HRAS、MYC、β-连环蛋白、PI3K、PTEN、TSC、AKT、BRCA1/2、EWS-FLI融合蛋白、MLL融合蛋白、受体酪氨酸激酶、HOX同源物、JUN、Cyclin D、Cyclin E、BRAF、CRAF、CDK4、CDK2、HPV-E6/E7、Aurora激酶、MITF、Wnt1、PD-1、BCR和CCR5。在一些实施方式中,第一蛋白是细菌蛋白。在一些实施方式中,第一蛋白是病毒蛋白。在某些情况下,第一蛋

白是蛋白聚集体(例如,β淀粉样蛋白)。

[0054] 在某些情况下,第一部分包含第一钉合肽,第一钉合肽结合被靶向降解的第一蛋白。在某些情况下,第一部分包含小分子,小分子结合被靶向降解的第一蛋白。在某些情况下,第二部分包含第二钉合肽,第二钉合肽结合第二蛋白,例如蛋白降解剂。在某些情况下,第二部分包含小分子,小分子结合第二蛋白,例如蛋白降解剂。在某些情况下,第二部分包含结合蛋白降解剂的肽降解决定子。在某些情况下,第一部分包含结合第一蛋白的第一钉合肽,并且第二部分包含结合第二蛋白的第二钉合肽。在某些情况下,第一部分包含结合第一蛋白的第一钉合肽,并且第二部分包含结合第二蛋白的小分子。在某些情况下,第一部分包含结合第一蛋白的第一钉合肽,并且第二部分包含结合蛋白降解剂的肽降解决定子。在某些情况下,第一部分包含结合第一蛋白的小分子,并且第二部分包含结合第二蛋白的钉合肽。

[0055] 在第一部分是钉合肽的某些情况下,钉合肽不包括Bcl-2同源3(BH3)结构域多肽。在第一部分是钉合肽的某些情况下,钉合肽不包括:(a)MCL-1的Bcl-2同源3结构域、(b)BCL2结构域的MCL-1稳定的α螺旋、或(c)MCL-1SAHBD。

[0056] 在第一部分是钉合肽的某些情况下,第二部分结合第一部分的N末端。在第一部分是钉合肽的某些情况下,第二部分结合第一部分的C末端。在第一部分是第一钉合肽的某些情况下,第二部分结合第一部分的内部氨基酸位置。

[0057] 在第二部分是钉合肽的某些情况下,第一部分结合第二部分的N末端。在第二部分是钉合肽的某些情况下,第一部分结合第二部分的C末端。在第二部分是钉合肽的某些情况下,第一部分结合第二部分的内部氨基酸位置。

[0058] 在一些方面,蛋白降解剂降解被靶向降解的第一蛋白。

[0059] 在第十三方面,本公开提供在有需要的受试者中治疗由病理性肽或蛋白驱动的疾病或病症的方法,该方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所述的嵌合体。

[0060] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。虽然与本文描述的那些类似或等同的方法和材料可以用于本发明的实践或测试中,但是下文描述了示例性的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用整体并入本文。在发生冲突的情况下,以本申请(包括定义)为准。材料、方法和示例仅是说明性的,而无意于限制。

[0061] 通过下文的详细描述和权利要求,本发明的其他特征和优点将变得显而易见。

附图说明

[0062] 图1提供了一系列代表性的钉合肽序列上的肽序列和降解决定子类型/位置。第1栏中的氨基酸序列命名为SEQ ID NO.:1-24。#=N末端Ac或降解决定子Ahx,如所示;%=C末端Lys(ivdde)或Lys(降解决定子),如所示;X=S-戊烯基丙氨酸;8=R-辛烯基丙氨酸;B=正亮氨酸;*(在氨基酸序列内)=环丁丙氨酸(ivdde=1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己-1-基)-3-甲基丁基)

[0063] 图2显示了羧基降解决定子沙利度胺部分与树脂结合的伯胺偶联生成图1所示的钉合肽降解决定子。

[0064] 图3显示了含C-末端降解决定子的部分,其是与肽连接的侧链缀合赖氨酸。

[0065] 图4显示了含N-末端降解决定子的部分,其是肽连接的氨基己酸。

[0066] 图5显示了二氨基丁酸("DAB")的结构以及用于与酸或胺偶联的THAL和VHL配体的化学结构。

[0067] 图6显示了各种接头(Gly、βAla和接头1-8)的结构。

[0068] 图7显示了一系列钉合肽降解决定子嵌合体,其中将二氨基丁酸掺入钉合肽中以连接小分子降解决定子,并且安装了各种组成和长度的接头,以将钉合肽与小分子或肽降解决定子(THAL、TRIB或VHL)分离。图7所示的钉合肽序列为:IWIA%ELRXIGDXFNAYYARR(SEQ ID NO:127)、IWIAQELRXIGDXFN%YYARR(SEQ ID NO:128)、LTF8%YWAQLXSAA(SEQ ID NO:129)、LTF8EYWAQLX%AA(SEQ ID NO:130);和%TF8EYWAQLXSAA(SEQ ID NO:131),其中%如图所示,8是(R)-2-(7-辛烯基)丙氨酸,X是(S)-2-(4-戊烯基)丙氨酸。

[0069] 图8显示由连接至沙利度胺降解决定子的钉合肽组成的钉合肽降解决定子嵌合体保持与重组cereblon结合的能力,由竞争性荧光偏振测定法监测。来那度胺为该实验的阳性对照。序列:#QLTAARLKXLGDXLHQRTBWR%(SEQ ID NO:11);#AELEVESATQLRXFGDXLNFRQKLL%(SEQ ID NO:12);和#RRFFGIXLTNXLKTEEGN%(SEQ ID NO:3),其中X是(S)-2-(4-戊烯基)丙氨酸,并且#和%如附图中所述。"N末端Ac"=N末端乙酰化;Lys(ivDde)=N-α-Fmoc-N-ε-1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己-1-基)-3-甲基丁基-L-赖氨酸;"Lys-降解决定子"=图3所示的结构;"N末端降解决定子Ahx"=图4所示的结构。

[0070] 图9A-9I显示,钉合肽降解决定子嵌合体可进入细胞以与dBET6竞争与cereblon的相互作用并抑制GFP-BRD4的诱导降解。序列:

[0071] #RRFFGIXLTNXLKTEEGN%(SEQ ID NO:3);

[0072] #FSSNRXKILXRTQILNQEWKQRRIQPV%(SEQ ID NO:2);

[0073] #NLWAAQRYGRELRXBSDXFVDSFKK%(SEQ ID NO:10);

[0074] #LSQEQLEHRERSLXTLRXIQRBLF%(SEQ ID NO:5);和

[0075] #NLWAAQRYGRELRXBDDXFVDSFKK%(SEQ ID NO:9),其中X是(S)-2-(4-戊烯基)丙氨酸,并且#和%如附图中所述。"N末端Ac"=N末端乙酰化;Lys(ivDde)=N-α-Fmoc-N-ε-1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己-1-基)-3-甲基丁基-L-赖氨酸;"Lys-降解决定子"=图3所示的结构;"N末端降解决定子Ahx"=图4所示的结构。

[0076] 图10显示,当以10μM的浓度将BIM-C末端降解决定子加入A375P黑色素瘤细胞系时会诱导MCL-1降解。BIM-C末端降解决定子是#IWIAQELRXIGDXFNAYYARR%(SEQ ID NO:134;#=N末端Ac;%=Lys-降解决定子(Lys-降解决定子的结构参见图3))。

[0077] 图11显示,用一组由MDM2/MDMX靶向钉合肽("ATSP")和沙利度胺降解决定子部分组成的钉合肽降解决定子(1μM)嵌合体处理的SJSA-1细胞与单独用ATSP-7041处理的细胞相比在癌细胞中显示出具有更低的MDM2水平,如通过抗MDM2蛋白印记分析所评估。肌动蛋白代表加载对照。序列:LTF8EYWAQLX%AA(SEQ ID NO:130)和LTF8EYWAQ#XSAA(SEQ ID NO:6)。接头1、2、3和5如图6所示。

[0078] 图12显示,用一组由MDM2/MDMX靶向钉合肽(ATSP)、不同的接头和沙利度胺降解决定子组成的钉合肽降解决定子嵌合体对SJSA-1细胞的处理会不同程度地损害癌细胞的细胞活力,其中"5-L5"(LTF8EYWAQLX%AA(SEQ ID NO:130),其中%为DAB/LINKER5/THAL)显示出最强的细胞毒活性(左)。带有不同接头的某些组合物显示无细胞活性(右)。接头器1-5

如图5所示。

[0079] 图13在293T细胞中利用Myc标签的MDM2 p60嵌合体构建体的表达显示了来自Trib1的序列对MDM2 p60同工型进行的遗传修饰如何导致Cop1介导的降解。MDM2中的天然肽序列GFDVPD(SEQ ID NO:26)被指示的序列取代(泳道3:SEQ ID NO:27;泳道4:SEQ ID NO:28;泳道5:SEQ ID NO:29;和泳道6:SEQ ID NO:30)。用突变序列DQIVPD(SEQ ID NO:30)替换天然序列引起Cop1蛋白对p60嵌合蛋白的破坏。下图:Cop1加载对照。

[0080] 图14显示了通过293T细胞的共免疫沉淀法所评估的Myc标记的MDM2 p60突变体构建体与Cop1的结合。序列:GFDVPD(SEQ ID NO:26);GFDAAD(SEQ ID NO:27);GNDVPD(SEQ ID NO:28);PQTVPD(SEQ ID NO:29);和DQIVPD(SEQ ID NO:30)。

[0081] 图15提供了用于评估靶向的Trib-降解决定子介导的蛋白降解的活性的SAH+Trib肽序列;钉合肽嵌合体序列被指定为SEQ ID NO.:119-126。

[0082] 图16显示了按照TRIB序列和其中掺入的用于与胺或酸偶联的相关部分建模的肽降解决定子的结构。

[0083] 图17显示,通过抗MDM2蛋白印记分析评估,用一组由MDM2/MDMX靶向钉合肽(例如ATSP-7041样钉合的p53肽)和TRIB降解决定子部分(20μM)组成的钉合肽降解决定子嵌合体处理SJSA-1或SJSA-X细胞,与单独使用ATSP-7041(1μM)处理的癌细胞相比,表现出癌细胞中MDM2水平的不同程度的降低。肌动蛋白代表加载对照。序列:LTF8EYWAQ#XSAA(SEQ ID NO:6)和LTF8%YWAQLXSAA(SEQ ID NO:129)。

[0084] 图18显示,用一组由MDM2/MDMX靶向钉合肽(例如ATSP-7041样钉合的p53肽)和TRIB降解决定子组成的钉合肽降解决定子嵌合体处理SJSA-1或SJSA-X细胞,可变地损害癌细胞的细胞活力。序列:LTF8%YWAQLXSAA(SEQ ID NO:129)。

[0085] 图19显示,通过抗MDM2蛋白印记分析评估,一组由MDM2/MDMX靶向钉合肽(例如ATSP-7041样钉合的p53肽)和VHL降解决定子部分组成的钉合肽降解决定子嵌合体(1μM)处理SJSA-1或SJSA-X细胞,与单独使用ATSP-7041处理的癌细胞相比,表现出癌细胞中MDM2水平的不同程度的降低。肌动蛋白代表加载对照。序列:LTF8EYWAQ#XSAA(SEQ ID NO:6)和LTF8EYWAQLX%AA(SEQ ID NO:130)。

[0086] 图20显示,一组由MDM2/MDMX靶向钉合肽(例如ATSP-7041样钉合的p53肽)和VHL降解决定子部分组成的钉合肽降解决定子嵌合体(1μM)处理SJSA-1或SJSA-X细胞,不同程度地损害癌细胞的细胞活力。序列:%TF8EYWAQLXSAA(SEQ ID NO:131)和LTF8EYWAQLX%AA(SEQ ID NO:130)。

[0087] 图21显示示例性钉合肽降解决定子嵌合体的结构,其包含一种钉合肽和第二钉合肽。一种钉合肽靶向感兴趣的蛋白(例如,疾病相关感兴趣的蛋白)并且第二钉合肽结合降解剂蛋白(例如,钉合肽ATSP-7041(SEQ ID NO:6,用于结合MDM2)。还描述了包含两个相同钉合肽的钉合肽降解决定子嵌合体的实例,其中钉合肽靶向作为降解剂蛋白的目标蛋白(例如,疾病相关目标蛋白),从而所引发的蛋白二聚化和自降解能够确保钉合肽降解决定子嵌合体与靶标蛋白的结合。在每个所示的实例中,2个钉合肽通过可变长度的接头连接(例如,示例性接头见图6)。左栏(从上到下):SEQ ID NO:1-5、132、7-10、133和12。右栏:SEQ ID NO:134。

[0088] 图22显示,将泛素化机构(包括E1、E2和重组MDM2)与重组MCL-1以及与MDM2和MCL-

1结合的钉合肽降解决定子嵌合体一起温育会诱导MDM2对MCL-1的泛素化(氨基酸1-327)。

[0089] 图23显示钉合肽降解决定子嵌合体的结构。引入钉合肽(ATSP-7041(LTF8EYWAQ#XSAA(SEQ ID NO:6))以结合和募集降解剂蛋白(MDM2),并包含小分子(JQ1)以结合疾病相关蛋白(BRD4)。

[0090] 图24显示,将泛素化机构(包括E1、E2和MDM2)与重组BRD4物种(例如,氨基酸342-460;氨基酸49-170)以及结合(例如,钉合p53肽ATSP-7041)和BRD4(例如小分子JQ1)的钉合肽降解决定子嵌合体的温育会诱导可通过MDM2诱导BRD4在两个不同区域中的泛素化,其中所述接头由两个β-丙氨酸氨基酸组成。

[0091] 图25显示了用引入结合MDM2的钉合肽和结合BRD4的小分子,例如JQ1,以及图23所示由两个β-丙氨酸组成的接头的钉合肽降解决定子嵌合体对U2OS细胞处理导致天然BRD4的时间依赖性降解。肌动蛋白代表加载对照。

[0092] 图26顶图显示了产生用于插入肽中的各种钉合肽的示例性非天然氨基酸的化学结构。

[0093] 图26中图显示了带有各种长度钉合肽的肽。

[0094] 图26底部图显示了沿肽序列的钉合肽行走。

[0095] 图27是示出了各种双重和三重钉合策略以及用于产生钉合肽的示例性钉合肽行走的示意图。

[0096] 图28是显示了使用各种长度的产生钉合肽的分支双钉合部分的钉合肽行走的示意图。

[0097] 图29是显示用于产生钉合肽的示例性化学改变的示意图。

具体实施方式

[0098] 本公开特征在于充当蛋白降解诱导部分的稳定肽降解决定子嵌合体,其结合靶向疾病相关蛋白的稳定肽与作为“降解决定子”的cereblon-结合小分子沙利度胺,例如或更通常替代性小分子降解决定子或多肽序列“降解决定子”,包括稳定多肽序列“降解决定子”。稳定肽降解决定子嵌合体还包括结合并募集降解剂蛋白的稳定肽与为靶向疾病相关蛋白而引入的小分子或肽结合。通过将稳定肽有效靶向广泛的细胞内蛋白(以前是小分子无法接近的)的能力与能够募集降解所结合的蛋白的降解剂蛋白的小分子或肽降解决定子部分相结合,或通过将有效结合并募集降解剂蛋白的稳定肽与靶向疾病相关蛋白的小分子或肽相结合,这种新型的钉合肽降解决定子嵌合体扩展了钉合肽的生物活性的效力和广度。本公开内容还涉及通过使用钉合肽降解决定子嵌合体体来使内源性蛋白发生靶向降解的方法,所述钉合肽降解决定子嵌合体能够用于治疗由疾病相关蛋白的存在引起的疾病(例如,增殖性疾病)。本申请还提供了制备本申请的化合物及其中间体的方法。

[0099] 稳定肽

[0100] 肽螺旋是调节许多重要生物学过程(例如,细胞凋亡)的关键蛋白-蛋白相互作用的重要介体;然而,当从其所处的蛋白环境中分离出这种螺旋并分离制备时,它可以解折叠并采用随机的螺旋构象,从而导致生物活性急剧降低,因而降低了治疗潜力。为了避免这个问题,可以使用结构稳定的肽。在某些情况下,结构稳定肽包含通过内部(分子内)交联(或钉合钉)连接的至少两个修饰氨基酸。如本文所述的稳定肽包括钉合肽、缝合肽、包含多个

缝合(stitch)的肽、包含多个钉合钉(staple)的肽、或包含钉合钉和缝合的混合物的肽,以及通过其他化学策略在结构上增强的肽(例如见,Balaram P.Cur.Opin.Struct.Biol.1992;2:845;Kemp DS等,J.Am.Chem.Soc.1996;118:4240;Orner BP,等,J.Am.Chem.Soc.2001;123:5382;Chin JW等,Int.Ed.2001;40:3806;Chapman RN,等,J.Am.Chem.Soc.2004;126:12252;Horne WS等,Chem.,Int.Ed.2008;47:2853;Madden等,Chem Commun(Camb).2009Oct 7;(37):5588-5590;Lau等,Chem.Soc.Rev.,2015,44:91-102;和Gunnoo等,Org.Biomol.Chem.,2016,14:8002-8013;所有这些均通过引用整体并入本文)。

[0101] 在某些实施方式中,可以通过肽钉合来稳定多肽(例如见,Walensky,J.Med.Chem.,57:6275-6288(2014),其内容通过引用整体并入本文)。肽是"稳定的",因为它保持其天然的二级结构。例如,钉合允许倾向于具有α-螺旋二级结构的多肽维持其天然α-螺旋构象。该二级结构增加了多肽对蛋白水解切割和加热的抗性,并且还可以增加靶标结合亲和力、疏水性和细胞渗透性。因此,本文描述的钉合(交联)多肽相对于相应的非钉合(未交联)多肽具有改善的生物学活性。

[0102] "肽钉合(peptide stapling)"是由合成方法创造的术语,其中使用闭环复分解(RCM)反应将存在于多肽链中的两个含烯烃的侧链(例如,可交联的侧链)共价连接(例如,"钉合在一起")形成交联环(例如,见Blackwell等,J.Org.Chem.,66:5291-5302,2001;Angew等,Chem.Int.Ed.37:3281,1994)。如本文所用,术语"肽钉合"包括可以存在于多肽链中的两个(例如,至少一对)含双键的侧链、含三键的侧链或含双键和含三键的侧链的接合,使用任何数量的反应条件和/或催化剂促进这种反应,以提供单一的"钉合(stapled)"的多肽。术语"多重钉合"多肽是指含有超过一个单个钉合钉的那些多肽,并且可以包含两个、三个或更多个具有不同间隔的独立钉合钉。另外,如本文所用,术语"肽缝合(peptide stitching)"是指单个多肽链中的多个串联的"钉合"事件,以提供"缝合(stitched)"(例如,串联或多重钉合)的多肽,其中例如两个钉合钉与一个共有残基相连。肽缝合例如在WO 2008/121767和WO 2010/068684中公开,其均通过引用整体并入本文。在一些情况下,如本文所用,钉合钉可以保留不饱和键或可以被还原。

[0103] 在某些实施方式中,可以通过例如烃钉合来稳定多肽。在某些情况下,所述钉合肽包含至少两个(例如2、3、4、5、6)个氨基酸取代,其中所述取代的氨基酸被两个、三个或六个氨基酸隔开,并且其中所述取代的氨基酸酸是具有烯烃侧链的非天然氨基酸。有许多已知的非天然或不天然氨基酸,它们中的任何一种都可以包含在钉合肽中。非天然氨基酸的一些实例是4-羟基脯氨酸、锁链素、γ-氨基丁酸,β-氰基丙氨酸、正缬氨酸、4-(E)-丁烯基-4(R)-甲基-N-甲基-L-苏氨酸、N-甲基-L-亮氨酸、1-氨基-环丙烷甲酸、1-氨基-2-苯基-环丙烷甲酸、1-氨基-环丁烷甲酸、4-氨基-环戊烯甲酸、3-氨基-环己烷甲酸、4-哌啶基乙酸、4-氨基-1-甲基吡咯-2-甲酸、2,4-二氨基丁酸、2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸、2-氨基庚二酸、4-(氨基甲基)苯甲酸、4-氨基苯甲酸、邻位、间位和对位取代的苯丙氨酸(例如,被-C(=O)C_6H_5;-CF_3;-CN;-卤素;-NO_2;CH_3取代)、二取代的苯丙氨酸、取代的酪氨酸(例如,进一步被-C=O)C_6H_5;-CF_3;-CN;-卤素;-NO_2;CH_3取代)和他汀。另外,氨基酸可被衍生化以包括被羟基化、磷酸化、磺化、酰化或糖基化的氨基酸残基。

[0104] 烃钉合的多肽在两个非天然氨基酸之间包含一个或多个系链(tether)(链接),这

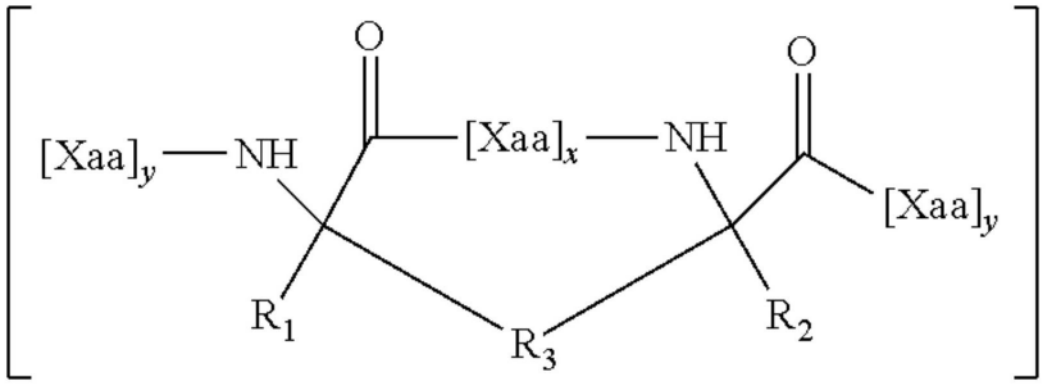
些系链显著增强了多肽的α-螺旋二级结构。通常,系链跨过一或两个螺旋圈的长度(即,约3.4或约7个氨基酸)延伸。因此,位于i和i+3;i和i+4;或i和i+7的氨基酸是化学修饰和交联的理想候选对象。因此,例如,在肽具有序列...X1,X2,X3,X4,X5,X6,X7,X8,X9...的情况下,X1和X4之间、或X1和X5之间、或X1和X8之间的交联是该肽的有用的烃钉合形式,如同X2和X5之间、X2和X6之间或X2和X9之间等等的交联。也可以考虑使用多个交联(例如2、3、4或更多)。多个交联的使用在稳定和优化肽方面非常有效,尤其是随着肽长度的增加。因此,本公开内容涵盖在多肽序列中并入超过一个交联以进一步稳定序列或促进较长多肽延伸的结构稳定、蛋白水解抗性、酸稳定性、热稳定性、细胞通透性和/或生物活性增强。可以在例如美国专利公开号2012/0172285、2010/0286057和2005/0250680中找到关于制备和使用烃钉合多肽的额外描述,其全部内容通过引用整体并入本文。

[0105] 在某些实施方式中,当钉合钉在i和i+3残基处时,R-丙烯基丙氨酸和S-戊烯基丙氨酸;或R-戊烯基丙氨酸和S-戊烯基丙氨酸取代那些位置上的氨基酸。在某些实施方式中,当钉合钉在i和i+4残基处时,S-戊烯基丙氨酸取代那些位置上的氨基酸。在某些实施方式中,当钉合钉在i和i+7残基处时,S-戊烯基丙氨酸和R-辛烯基丙氨酸取代那些位置上的氨基酸。在一些情况下,当肽经缝合时,将要参与“缝合”的肽的氨基酸用双戊烯基甘氨酸、S-戊烯基丙氨酸和R-辛烯基丙氨酸;或双戊烯基甘氨酸、S-辛烯基丙氨酸和R-辛烯基丙氨酸取代。

[0106] 可以通过在钉合钉行走(staple walk)中测试不同的钉合钉位置来更改钉合钉或缝合位置。

[0107] 图26(顶部)显示了可用于生成各种交联化合物的非天然氨基酸的示例性化学结构。图26(中)说明在位置i和i+3;i和i+4;或i和i+7残基之间具有烃交联的肽。图26(底部)显示了沿着肽序列的钉合行走。图27显示了具有双重和三重钉合策略的各种肽序列,以及示例性的钉合行走。图28示出了使用各种长度的分支缝合部分的示例性钉合针行走。

[0108] 在一个方面,稳定多肽具有式(I),

[0109] 

[0110] 其中:

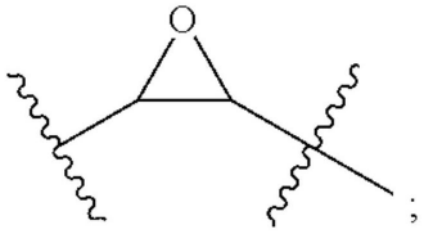
[0111] R_1和R_2各自独立为H或C_1至C_{10}烷基、烯基、炔基、芳烷基、环烷基烷基、杂芳烷基或杂环烷基;

[0112] R_3是烷基、烯基、炔基;$[R_4—K—R_4]_n$;其中的每一个取代有0-6个R_5;

[0113] R_4是烷基、烯基或炔基;

[0114] R_5是卤素、烷基、OR_6、$N(R_6)_2$、SR_6、SOR_6、SO_2R_6、CO_2R_6、R_6、荧光部分或放射性同位素;

[0115] K是O、S、SO、SO_2、CO、CO_2、$CONR_6$、或

[0116] 

[0117] R_6是H、烷基或治疗剂；

[0118] n是整数1-4；

[0119] x是整数2-10；

[0120] 各个y独立为整数0-100；

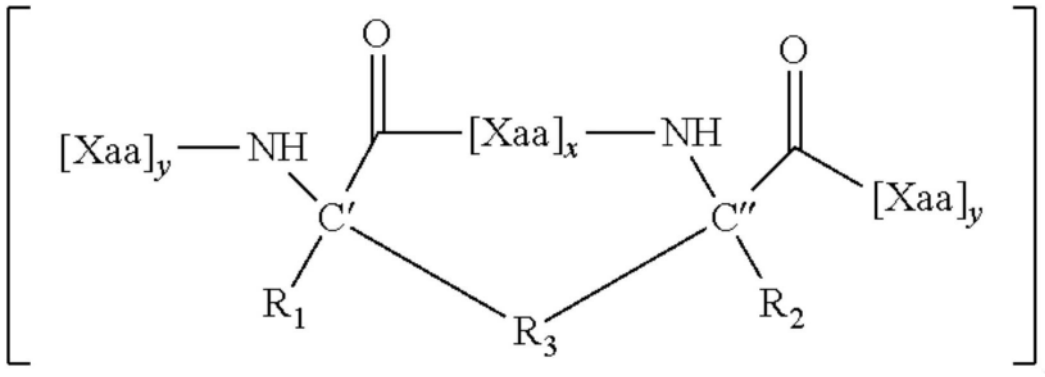
[0121] z是整数1-10(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10)；

[0122] 并且各个Xaa独立地是氨基酸。

[0123] 系链可包括烷基、烯基或炔基部分(例如,C_5、C_8或C_{11}烷基、C_5、C_8或C_{11}烯基或C_5、C_8或C_{11}炔基)。系链的氨基酸可以为α双取代(例如,C_1-C_3或甲基)。

[0124] 在一些情况下,x是2、3或6。在一些情况下,各个y独立为整数1至15或3至15。在一些情况下,R_1和R_2各自独立为H或C_1-C_6烷基。在一些情况下,R_1和R_2各自独立为C_1-C_3烷基。在一些情况下,R_1和R_2中至少一个是甲基。例如,R_1和R_2可同时为甲基。在一些情况下,R_3是烷基(例如,C_8烷基)且x是3。在一些情况下,R_3是C_{11}烷基,并且x是6。在一些情况下,R_3是烯基(例如,C_8烯基)并且x是3。在一些情况下,x是6并且R_3是C_{11}烯基。在一些情况下,R_3是直链烷基、烯基或炔基。在一些情况下,R_3是—CH_2—CH_2—CH_2—CH＝CH—CH_2—CH_2—CH_2—。

[0125] 在另一方面,两个α,α二取代的立体中心都处于R构型或S构型(例如,i,i+4交联),或者一个立体中心是R,另一个立体中心是S(例如,i,i+7交叉链接)。因此,如果式I表示为:

[0126] 

[0127] C′和C″双取代的立体中心可以都为R构型,或者它们都可以为S构型,例如,当x为3时。当x为6时,C′双取代的立体中心为R构型,C″二取代的立体中心处于S构型。R_3双键可以处于E或Z立体化学构型。

[0128] 在一些情况下,R_3是$[R_4—K—R_4]_n$;并且R_4是直链烷基、烯基或炔基。

[0129] 在一些实施方式中,本公开内容特征在于内部交联(“钉合”或“缝合”)肽,其中被两个、三个或六个氨基酸分隔的两个氨基酸的侧链被内部钉合钉取代;三个氨基酸的侧链被内部缝合取代;四个氨基酸的侧链被两个内部钉合钉取代,或者五个氨基酸的侧链被内部钉合钉和内部缝合的组合取代。钉合/缝合的肽的长度可以是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或50个氨基酸。

[0130] 在某些情况下,稳定肽是细胞内蛋白的肽。在某些情况下,稳定肽是引起疾病或疾病相关蛋白的肽。在某些情况下,稳定肽是细菌蛋白的肽。在某些情况下,稳定肽是人蛋白的肽。在某些情况下,稳定肽是致癌蛋白的肽。致癌蛋白的非限制性实例包括BCL2、$BCLX_L$、MCL-1、BFL-1、BCL-w、BCL-B、EZH2、HDM2/HDMX、KRAS/NRAS/HRAS、MYC、β-连环蛋白、PI3K、PTEN、TSC、AKT、BRCA1/2、EWS-FLI融合蛋白、MLL融合蛋白、受体酪氨酸激酶、HOX同源物、JUN、Cyclin D、Cyclin E、BRAF、CRAF、CDK4、CDK2、HPV-E6/E7、Aurora激酶、MITF、Wnt1、PD-1、BCR和CCR5。

[0131] 钉合肽的非限制性实例如以下所列:

[0132] QWAREIGAQLRX_1BADX_2LNAQYERR(SEQ ID NO:1)-PUMA

[0133] FSSNRX_1KILX$_2$RTQILNQEWKQRRIQPV(SEQ ID NO:2)-EZH2

[0134] RRFFGIX_1LTNX$_2$LKTEEGN(SEQ ID NO:3)-SOS

[0135] RKALETLRRVGDGVX_1RNHX$_2$TAF(SEQ ID NO:4)-MCL-1

[0136] LSQEQLEHRERSLX$_1$TLRX$_2$IQRBLF(SEQ ID NO:5)-BCL9

[0137] LTF8EYWAQ#XSAA(SEQ ID NO:6)-p53

[0138] DIIRNIARHLAX$_1$VGDX$_2$BDRSI(SEQ ID NO:7)-BID

[0139] IWIAQELRX$_1$IGDX$_2$FNAYYARR(SEQ ID NO:8)-BIM

[0140] NLWAAQRYGRELRX$_1$BDDX$_2$FVDSFKK(SEQ ID NO:9)-BAD S153D

[0141] NLWAAQRYGRELRX$_1$BSDX$_2$FVDSFKK(SEQ ID NO:10)-BAD

[0142] QLTAARLKX$_1$LGDX$_2$LHQRTBWR(SEQ ID NO:11)-HRK

[0143] AELEVESATQLRX$_1$FGDX$_2$LNFRQKLL(SEQ ID NO:12)-NOXA

[0144] QWAREIGAQLRX_1BADX_2LNAQYERR(SEQ ID NO:13)-PUMA

[0145] FSSNRX_1KILX$_2$RTQILNQEWKQRRIQPV(SEQ ID NO:14)-EZH2

[0146] RRFFGI X_1LTNX$_2$LKTEEGN(SEQ ID NO:15)-SOS

[0147] RKALETLRRVGDGVX_1RNHX$_2$TAF(SEQ ID NO:16)-MCL-1

[0148] LSQEQLEHRERSLX$_1$TLRX$_2$IQRBLF(SEQ ID NO:17)-BCL9

[0149] LTF8EYWAQ#XSAA(SEQ ID NO:18)-p53

[0150] DIIRNIARHLAX$_1$VGDX$_2$BDRSI(SEQ ID NO:19)-BID

[0151] IWIAQELRX$_1$IGDX$_2$FNAYYARR(SEQ ID NO:20)-BIM

[0152] NLWAAQRYGRELRX$_1$BDDX$_2$FVDSFKK(SEQ ID NO:21)-BAD-S153D

[0153] NLWAAQRYGRELRX$_1$BSDX$_2$FVDSFKK(SEQ ID NO:22)-BAD

[0154] QLTAARLKX$_1$LGDX$_2$LHQRTBWR(SEQ ID NO:23)-HRK

[0155] AELEVESATQLRX$_1$FGDX$_2$LNFRQKLL(SEQ ID NO:24)-NOXA

[0156] LTF8EYWAQLXSAA(SEQ ID NO:134)-p53(ATSP-7041#26L),

[0157] 其中,8=R-辛烯基丙氨酸;B=正亮氨酸;#=环丁基丙氨酸;X=S-戊烯基丙氨酸,并且在某些情况下,X_1和X_2相同(例如,S-戊烯基丙氨酸)。

[0158] 在某些实施方式中,所述钉合多肽包含SEQ ID NO:1至24和134中任一个所示的氨基酸序列或由SEQ ID NO:1至24和134中任一个所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式

中,本公开的特征在于与上述肽差异在于它们的钉合钉/缝合位置有所不同的稳定肽。在某些实施方式中,本公开特征在于与以上公开的肽差异如下的稳定肽:它们与以上公开的序列不同,在这些肽的α-螺旋的非相互作用面上具有1至7个(例如1、2、3、4、5、6、7)个氨基酸取代。在某些情况下,取代是保守的。在其他情况下,取代是非保守的。在某些实施方式中,本公开特征在于与以上公开的肽差异如下的稳定肽:它们与以上公开的序列不同,在这些肽的α-螺旋的相互作用面上具有1至5个(例如1、2、3、4、5)个氨基酸取代。在某些情况下,取代是保守的。在图29中示出了对钉合肽的变化/修饰的示例性类型。

[0159] 在某些实施方式中,钉合肽不是Bcl-2同源3(BH3)结构域多肽(例如,不是MCL-1的BH3结构域,不是BCL2结构域的MCL-1稳定的α螺旋(SAHB),或不是MCL-1SAHB$_D$)。

[0160] 在某些实施方式中,稳定肽(例如,钉合肽)直接结合并募集降解剂蛋白,例如泛素E3连接酶MDM2。例如,E3连接酶MDM2可以被本领域已知的钉合p53肽强有力结合,已知的钉合p53肽通过引用整体并入本文。在某些情况下,肽降解决定子是稳定的或钉合肽,其直接结合并募集包含降解剂蛋白的复合物,例如MDMX和泛素E3连接酶MDM2之间的复合物。在此示例中,钉合p53肽能够有力结合MDMX并募集MDMX/MDM2复合物,使得MDM2可以作为降解剂蛋白被募集。

[0161] 在某些实施方式中,稳定肽直接或间接结合降解剂蛋白,例如E3泛素连接酶或E3泛素连接酶的底物衔接子。在某些实施方式中,稳定肽直接或间接结合E3泛素连接酶。在一些实施方式中,稳定肽直接或间接结合E3连接酶(例如,MDM2)或与E3连接酶复合的蛋白,例如结合MDM2的MDMX。在某些实施方式中,E3泛素连接酶是RING E3泛素连接酶(例如,Mdm2-MdmX、TRIM5α、c-CBL、cIAP、RNF4、BIRC7、IDOL、BRCA1-BARD1、RING1B-Bmi1、E4B、CHIP、Prp19)。在某些实施方式中,E3泛素连接酶是HECT E3泛素连接酶(例如,Smurf1、Smurf2、Itch、E6AP)。在某些实施方式中,E3泛素连接酶是RBR E3泛素连接酶(例如,Parkin、Parc、RNF144(A/B)、HOIP、HHARI)。例如,E3泛素连接酶的非限制性实例见Morreale和Walden,Cell 165,2016DOI http:/dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.003。

[0162] 可以用于本文所述嵌合融合蛋白的其他稳定肽的非限制性实例在美国专利9,834,581;9,822,165;9,695,224;9,617,309;9,579,395;9,556,229;9,556,227;9,527,896;9,522,947;9,517,252;9,505,816;9,505,804;9,505,801;9,493,510;9,464,125;9,485,202;9,458,189;9,416,162;9,408,885;9,346,868;9,296,805;9,227,995;9,175,047;9,175,045;9,163,330;9,096,684;9,079,970;8,957,026;8,937,154;8,933,109;8,927,500;8,889,632;8,592,377;8,586,707;8,324,153;和美国专利申请公开20170247423;20170240604;20170212125;20170165320;20170066747;20170015716;20160376336;和20160244494中提供,其全部内容通过引用整体并入本文(尤其是稳定(例如,钉合或缝合)肽的公开)。

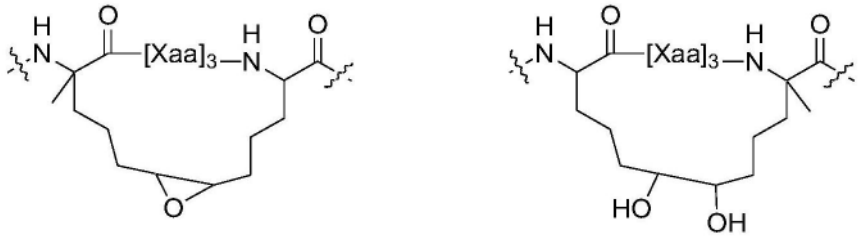
[0163] 尽管烃系链是常见的,但其他系链也可用于本文所述的稳定肽中。例如,系链可包括醚、硫醚、酯、胺或酰胺或三唑部分中的一种或多种。在某些情况下,可以将天然存在的氨基酸侧链结合到系链中。例如,系链可以与官能团偶联,例如丝氨酸中的羟基、半胱氨酸中的硫醇、赖氨酸中的伯胺、天冬氨酸或谷氨酸中的酸、或天冬酰胺或谷氨酰胺中的酰胺。因此,可以使用天然存在的氨基酸来产生系链,而不是使用通过偶联两个非天然存在的氨基酸制成的系链。也可以将单个非天然存在的氨基酸与天然存在的氨基酸一起使用。可以使

用含三唑(例如1,4三唑或1,5三唑)的交联(参见例如Kawamoto等,2012Journal of Medicinal Chemistry 55:1137;WO 2010/060112)。另外,执行不同类型的钉合的其他方法是本领域众所周知的,并且可以被采用(例如见Lactam stapling:Shepherd等,J.Am.Chem.Soc.,127:2974-2983(2005);UV-cycloaddition stapling:Madden等,Bioorg.Med.Chem.Lett.,21:1472-1475(2011);Disulfide stapling:Jackson等,Am.Chem.Soc.,113:9391-9392(1991);Oxime stapling:Haney等,Chem.Commun.,47:10915-10917(2011);Thioether stapling:Brunel和Dawson,Chem.Commun.,552-2554(2005);Photoswitchable stapling:J.R.Kumita等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,97:3803-3808(2000);Double-click stapling:Lau等,Chem.Sci.,5:1804-1809(2014);Bis-lactam stapling:J.C.Phelan等,J.Am.Chem.Soc.,119:455-460(1997);和Bis-arylation stapling:A.M.Spokoyny等,J.Am.Chem.Soc.,135:5946-5949(2013))。

[0164] 进一步设想,系链的长度可以变化。例如,在期望对二级α-螺旋结构提供相对较高程度的约束的情况下,可以使用较短的系链,而在某些情况下,期望对二级α-螺旋结构提供较小的约束,因此可能需要更长的系链。

[0165] 另外,虽然跨度范围从氨基酸i至i+3、i至i+4和i至i+7的系链很常见,以提供主要位于α螺旋的单个面上的系链,但系链可经合成以跨越任何数量的氨基酸组合,也可以组合使用以安装多个系链。

[0166] 在一些情况下,本文所述的烃系链(即,交联)可以被进一步操纵。在一种情况下,可以氧化(例如,通过环氧化、氨基羟基化或二羟基化)烃烯基系链的双键(例如,如使用钌催化的闭环复分解(RCM)所合成的)以提供以下化合物之一。

[0167] 

[0168] 环氧部分或游离羟基部分之一可以进一步官能化。例如,可以用亲核试剂处理环氧化物,该亲核试剂提供了可以用于例如连接治疗剂的附加官能性。作为另选,可以通过合成操作多肽的氨基或羧基末端或通过氨基酸侧链来实现这种衍生。可以将其他试剂连接至功能化的系链,例如,促进多肽进入细胞的试剂。

[0169] 在某些情况下,在多肽中使用α二取代的氨基酸以改善α螺旋二级结构的稳定性。然而,还设想了不需要α-二取代的氨基酸,而使用单α-取代基(例如,在系链的氨基酸中)的实例。

[0170] 钉合多肽可包括药物、毒素、聚乙二醇的衍生物;第二多肽;糖等。聚合物或其他试剂与钉合多肽连接的情况对于基本上均质的组合物是需要的。

[0171] 聚乙二醇(PEG)分子的添加可以改善多肽的药代动力学和药效学性质。例如,聚乙二醇化可降低肾脏清除率并产生更稳定的血浆浓度。PEG是水溶性聚合物,可以表示为与下式的多肽连接:

[0172] $XO--(CH_2CH_2O)_n--CH_2CH_2—Y$,其中n是2至10,000,并且X为H或末端修饰,例如C_{1-4}烷基;Y是连接多肽的胺基(包括但不限于赖氨酸的ε胺或N-末端)的酰胺、氨基甲酸酯或脲键。

Y也可以是连接硫醇基团(包括但不限于半胱氨酸的硫醇基团)的马来酰亚胺键。将PEG直接或间接连接至多肽的其他方法是本领域普通技术人员已知的。PEG可以是直链或支链的。包括各种官能化衍生物的各种形式的PEG是可商购的。

[0173] 可以使用在主链中具有可降解键的PEG。例如,可以制备具有容易水解的酯键的PEG。在WO 99/34833;WO 99/14259和U.S.6,348,558中描述了具有可降解的PEG键的缀合物。

[0174] 在某些实施方式中,大分子聚合物(例如PEG)通过中间接头连接至本文所述的试剂。在某些实施方式中,接头由通过肽键连接的1至20个氨基酸组成,其中氨基酸选自20种天然存在的氨基酸。如本领域技术人员众所周知的,这些氨基酸中的一些可以被糖基化。在其他实施方式中,所述1至20个氨基酸选自甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺和赖氨酸。在其他实施方式中,接头由没有空间位阻的大多数氨基酸组成,例如甘氨酸和丙氨酸。非肽接头也是可能的。例如,可以使用烷基连接基,例如-NH$(CH_2)_n$C(O)-,其中n=2-20。这些烷基接头可以进一步被任何非空间位阻基团所取代,例如低级烷基(例如,C_1-C_6)、低级酰基、卤素(例如Cl、Br)、CN、NH_2、苯基等。美国专利号5,446,090描述了一种双官能PEG接头及其在形成在每个PEG接头末端具有肽的缀合物中的用途。

[0175] 在一些实施方式中,还可以修饰稳定的肽,例如以进一步促进细胞摄取或增加体内稳定性。例如,将拟肽大环化合物酰化或聚乙二醇化有助于细胞摄取、增加生物利用度、增加血液循环、改变药代动力学、降低免疫原性和/或降低所需的施用频率。

[0176] 在一些实施方式中,本文公开的钉合肽具有增强的穿透细胞膜的能力(例如,相对于非钉合肽)。

[0177] 合成本文描述的稳定肽的方法是本领域已知的。然而,可以使用以下示例性方法。应当理解,可以以替代的顺序或次序进行各种步骤以得到所需的化合物。可用于合成本文所述化合物的合成化学转化和保护基方法(保护和脱保护)是本领域已知的,并且包括例如在R.Larock,Comprehensive Organic Transformations,VCH Publishers(1989);T.W.Greene和P.G.M.Wuts,Protective Groups in Organic Synthesis,3d.Ed.,John Wiley和Sons(1999);L.Fieser和M.Fieser,Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis,John Wiley and Sons(1994);和L.Paquette,ed.,Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis,John Wiley and Sons(1995)及其后续版本中所述的那些。

[0178] 可以通过普通技术人员众所周知的化学合成方法来制备稳定肽。参见,例如,Fields等,Chapter 3in Synthetic Peptides:A User's Guide,ed.Grant,W.H.Freeman&Co.,New York,N.Y.,1992,p.77。因此,可以使用固相合成的自动Merrifield技术合成肽,其中α-NH_2通过t-Boc或Fmoc化学保护,使用侧链保护的氨基酸,例如在430A或431型Applied Biosystems肽合成仪上。

[0179] 制备本文描述的肽的一种方式是使用固相肽合成(SPPS)。C末端氨基酸通过接头分子经酸不稳定键连接至交联的聚苯乙烯树脂。该树脂不溶于合成所用的溶剂,因此可以相对简单快速地洗去多余的试剂和副产物。N末端受Fmoc基团保护,该基团在酸中稳定,但可被碱除去。任何侧链官能团均受碱稳定而酸不稳定的基团保护。

[0180] 通过使用天然化学连接将单个合成肽连接起来,可以制得更长的肽。作为另选,更长的合成肽可以通过众所周知的重组DNA技术合成。此类技术在带有详细规程的众所周知

的标准手册中提供。为了构建编码本发明的肽的基因,将氨基酸序列反向翻译以获得编码该氨基酸序列的核酸序列,优选对于要在其中表达该基因的生物最佳的密码子。接下来,通常通过合成编码肽和任何调节元件(如果需要的话)的寡核苷酸来制备合成基因。将合成基因插入合适的克隆载体中,并转染到宿主细胞中。然后在适合于所选表达系统和宿主的合适条件下表达该肽。通过标准方法纯化和表征肽。

[0181] 可以以高通量的组合方式制备肽,例如,使用可购自Advanced Chemtech的高通量多通道组合合成仪。肽键可以例如替代为以下的键,以增加肽的生理稳定性:逆反键(C(O)-NH);还原的酰胺键(NH-CH_2);硫亚甲基键(S-CH_2或CH_2-S);氧亚甲基键(O-CH_2或CH_2-O);亚乙键(CH_2-CH_2);硫酰胺键(C(S)-NH);反式烯烃键(CH=CH);氟取代的反式烯烃键(CF=CH);酮亚甲基键(C(O)-CHR)或CHR-C(O),其中R为H或CH_3;氟代-酮亚甲基键(C(O)-CFR或CFR-C(O),其中R为H或F或CH_3。

[0182] 可以通过以下方式进一步修饰多肽:乙酰化、酰胺化、生物素化、肉桂酰化、法尼基化、荧光化、甲酰化、肉豆蔻酸化、棕榈酰化、磷酸化(Ser、Tyr或Thr)、硬脂酰化、琥珀酰化和磺化。如上所述,肽可以缀合例如聚乙二醇(PEG);烷基(例如,C1-C20直链或支链烷基);脂肪酸基;及其组合。包含可变长度的烯烃侧链的α,α-二取代的非天然氨基酸可以通过已知方法合成(Williams等J.Am.Chem.Soc.,113:9276,1991;Schafmeister等,J.Am.Chem Soc.,122:5891,2000;和Bird等,Methods Enzymol.,446:369,2008;Bird等,Current Protocols in Chemical Biology,2011)。对于使用i与i+7钉合的肽(稳定的两圈螺旋):a)使用一个S5氨基酸和一个R8;或者b)使用一个S8氨基酸和一个R5氨基酸。使用相同的途径合成R8,不同之处在于起始手性助剂赋予R-烷基-立体异构体。另外,使用8-碘辛烯代替5-碘戊烯。使用在MBHA树脂上的固相肽合成(SPPS)在固体支持物上合成抑制剂(参见,例如,WO 2010/148335)。

[0183] 受Fmoc保护的α-氨基酸(烯式氨基酸Fmoc-S_5-OH、Fmoc-R_8-OH、Fmoc-R_8-OH、Fmoc-S_8-OH和Fmoc-R_5-OH除外),2-(6-氯-1-H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基六氟磷酸铵(HCTU)和Rink Amide MBHA可从例如Novabiochem(San Diego,CA)商购获得。二甲基甲酰胺(DMF)、N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)、N,N-二异丙基乙胺(DIEA)、三氟乙酸(TFA)、1,2-二氯乙烷(DCE)、异硫氰酸荧光素(FITC)和哌啶可商购自例如Sigma-Aldrich。烯属氨基酸的合成在本领域中已有报道(Williams等,Org.Synth.,80:31,2003)。

[0184] 再次,适合于获得(例如,合成)、钉合和纯化本文公开的肽的方法也是本领域已知的(参见,例如Bird等,Methods in Enzymol.,446:369-386(2008);Bird等,Current Protocols in Chemical Biology,2011;Walensky等,Science,305:1466-1470(2004);Schafmeister等,J.Am.Chem.Soc.,122:5891-5892(2000);2010年3月18日提交的美国专利申请第12/525,123号;以及2010年5月25日发布的美国专利第7,723,468号,其全部内容通过引用合并于本文)。

[0185] 在一些实施方式中,所述肽基本上不含非钉合肽污染物或是分离的。纯化肽的方法包括,例如,在固相载体上合成肽。环化之后,可以分离固相载体并将其悬浮在溶剂的溶液中,所述溶剂例如是DMSO、DMSO/二氯甲烷混合物、或DMSO/NMP混合物。DMSO/二氯甲烷或DMSO/NMP混合物可包含约30%、40%、50%或60%的DMSO。在一个具体的实施方式中,使用50%/50%的DMSO/NMP溶液。可以将溶液温育1、6、12或24小时,然后可以用例如二氯甲烷或

NMP洗涤树脂。在一个实施方式中,用NMP洗涤树脂。可以将惰性气体摇动和鼓泡到溶液中。

[0186] 可以例如使用以下描述的方法来测定本发明的稳定(例如,钉合)的多肽的性质。

[0187] 确定α-螺旋度的测定:将化合物溶解在水溶液(例如,pH 7的5mM磷酸钾溶液或蒸馏H_2O,浓度为25-50μM)中。使用标准测量参数(例如温度20℃;波长190-260nm;步长分辨率0.5nm;速度20nm/秒;累积:10;响应:1秒;带宽:1nm;路径长度,0.1cm)在分光旋光仪(例如Jasco J-710,Aviv)上获得圆二色性(CD)光谱)。通过将平均残基椭圆率除以模型螺旋十肽的报道值来计算每种肽的α-螺旋含量(Yang等人,Methods Enzymol.130:208(1986))。

[0188] 确定解链温度(Tm)的测定:将交联或未修饰的模板肽溶解在蒸馏H_2O或其他缓冲液或溶剂中(例如终浓度为50μM),并在分光旋光仪(例如,Jasco J-710,Aviv)上使用标准参数(例如波长222nm;步长分辨率:0.5nm;速度:20nm/sec;累积:10;响应;1秒;带宽1nm;升温速率:1℃/min;路径长度0.1cm)通过测量整个温度范围(例如4至95℃)的椭圆率的变化来确定Tm。

[0189] 体外蛋白酶抗性测定:肽骨架的酰胺键易于被蛋白酶水解,从而使肽类化合物易于在体内快速降解。然而,肽螺旋的形成通常掩埋和/或扭曲和/或屏蔽酰胺主链,因此可以防止或基本上阻止蛋白水解裂解。可以使本发明的拟肽大环化合物进行体外酶蛋白水解(例如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶),以评估与相应的未交联的或钉合的多肽相比降解速率的任何变化。例如,将拟肽大环化合物和相应的未交联的多肽与胰蛋白酶琼脂糖一起温育,并通过离心在各个时间点淬灭反应,并通过随后HPLC注入以280nm处的紫外线吸收来定量残留的底物。简而言之,将拟肽大环化合物和拟肽前体(5mcg)与胰蛋白酶琼脂糖(Pierce)(S/E～125)温育0、10、20、90和180分钟。通过台式离心机高速淬灭反应;通过基于HPLC的280nm峰检测定量分离的上清液中剩余的底物。蛋白水解反应显示出一级动力学,速率常数k由ln[S]与时间的关系图确定。

[0190] 拟肽大环化合物和/或相应的未交联多肽可分别与新鲜的小鼠、大鼠和/或人血清(例如1-2mL)在37℃下温育0、1、2、4、8和24小时。大环化合物浓度不同的样品可以通过用血清进行系列稀释来制备。要确定完整化合物的水平,可以使用以下步骤:提取样品,例如,通过将100μL血清转移至2ml离心管中,然后添加10μL 50%甲酸和500μL乙腈,并在4+/-2℃以14,000RPM离心10分钟。然后将上清液转移至新鲜的2ml试管中,并在Turbovap上于N_2<10psi,37℃下蒸发。将样品在100μL的50:50乙腈:水中重构,并进行LC-MS/MS分析。用于测试离体稳定性的等效或相似程序是已知的,可用于确定血清中大环化合物的稳定性。

[0191] 体内蛋白酶抗性测定:肽钉合的一个关键好处是将体外蛋白酶抗性转化为显著改善的体内药代动力学。

[0192] 体外结合测定:为了评估拟肽大环化合物和拟肽前体与受体蛋白的结合和亲和力,可以使用例如荧光偏振测定(FPA)。FPA技术使用偏振光和荧光示踪剂测量分子的取向和迁移率。当用偏振光激发时,附着在具有高表观分子量的分子(例如与大蛋白结合的FITC标记的肽)上的荧光示踪剂(例如FITC)会发出更高水平的偏振荧光,这是因为它们的旋转速率比附着在较小的分子(例如溶液中游离的FITC标记的肽)上的示踪剂慢。

[0193] 细胞分析:将培养的细胞(例如,癌细胞)用钉合肽-降解决定子嵌合体处理,并且通过蛋白分析随时间监测靶蛋白水平。同样监测未被嵌合肽靶向的阴性对照蛋白,以证明靶向降解特异性。根据具体靶标,通过生存力、膜联蛋白V结合、胱天蛋白酶3/7激活、和线粒

体细胞色素c释放试验的组合来评估表型结果,例如凋亡诱导。

[0194] 肽降解决定子

[0195] 本公开特征在于肽降解决定子结合作为泛素E3连接酶的底物衔接子的蛋白的肽。在某些情况下,降解决定子结合WD-40蛋白,该蛋白是泛素E3连接酶的底物衔接子。降解决定子在浅槽中结合泛素E3连接酶的底物识别结构域,并且在N-或C-末端容许精细加工(即,钉合肽序列的缀合)。泛素E3连接酶的示例底物衔接子包括MDM2、SKP2-CKS1、FBXW1、FBXW2、FBXW4、FBXW5、FBXW7、FBXW8、FBXW9、FBXW10、FBXW11、FBXW12、SPOP、VHL、ITCH、KEAP1、KLHL2、KLHL3、KLHL7、KLHL12、KLHL13、KLHL15、KLHL20、KLHL21、KLHL24、KLHL40、KLHL42、COP1、TRAF7、RFWD3、DCAF1、DCAF2、DCAF3、DCAF4、DCAF5、DCAF6、DCAF7、DCAF8、DCAF9、DCAF10、DCAF11、DCAF12、DCAF13、DCAF14、DCAF15、DCAF16、DCAF17、DCAF19、SIAH1、TRPC4AC、DET1、WSB1、WSB2、HERC1、DDB2、CSA、CBL和FZR1。尽管含有WD40的E3连接酶包含许多E3连接酶,但是还有其他类型的E3连接酶和结合作为所述E3连接酶的底物衔接子的蛋白的降解决定子也被本公开内容涵盖。

[0196] 在某些情况下,肽降解决定子基于Trib1蛋白序列:DQIVPEY(SEQ ID NO:25)或其变体。

[0197]

位置	1	2	3	4	5	6	7
氨基酸	D	Q	I	V	P	E	Y

[0198] 本公开的降解决定子包括SEQ ID NO:25的变体,其中变体包括一个或多个(例如,1、2、3、4、5)氨基酸取代;一个或多个(例如,1、2、3)缺失;一个或多个(例如,1、2、3)插入;或其中任何两个以上的组合。在一些情况下,SEQ ID NO:25的变体基于一个或多个(例如,1、2、3、4、5)取代。在某些情况下,一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7)这些取代不是SEQ ID NO:25的1位至6位中任一处取代为A、R。在某些情况下,这些取代不包括SEQ ID NO:25中的4位V取代为I。在一些情况下,SEQ ID NO:25的变体具有一个或多个(例如,1、2、3)缺失。在一些情况下,SEQ ID NO:25的变体具有一个或多个(例如,1、2、3)插入。在一些情况下,SEQ ID NO:25的变体具有一个或多个(例如,1、2、3、4、5)取代和一个或多个(例如,1、2、3)缺失。在一些情况下,SEQ ID NO:25的变体具有一个或多个(例如,1、2、3、4、5)取代和一个或多个插入(例如,1、2、3)。在一些情况下,SEQ ID NO:25的变体具有一个或多个(例如,1、2、3)缺失和一个或多个(例如,1、2、3)插入。在一些情况下,SEQ ID NO:25的变体在SEQ ID NO:25中具有1-6个、1-5个、1-4个、1-3个、2个或1个氨基酸取代。在某些情况下,SEQ ID NO:25的4位(V)和/或5位(P)未取代。在一些情况下,SEQ ID NO:25的1位(D)、2位(Q)、3位(I)和6位(E)中的一个或多个被取代。在一些实施方式中,肽降解决定子包含SEQ ID NO:25,不同之处在于1至7位中的任何一个未被丙氨酸取代。在一些实施方式中,肽降解决定子包含包含SEQID NO:25的氨基酸序列,不同之处在于1至7位中的任一个未被精氨酸取代。在一些实施方式中,肽降解决定子包含SEQ ID NO:25,不同之处在于4位未被异亮氨酸取代。在某些情况下,SEQ ID NO:25的变体具有一个缺失。缺失可以在SEQ ID NO:25的C-末端或N-末端。

[0199] 在一些情况下,肽降解决定子是结合含有F-box/WD重复序列的蛋白7(FBXW7)蛋白的肽。在一个实施方式中,肽降解决定子包含氨基酸序列磷酸-Ser/磷酸-ThrPXXE/磷酸-Ser/磷酸-Thr(pS/pT-P-X_a-X_b-E/pS/pT)(SEQ ID NO:46),其中X_a和X_b独立地是任何氨基酸。在某些情况下,X_a=P。在一些情况下,X_b=V、L或Q。在其他情况下,X_a=P并且X_b=V、L或

Q。在某些实施方式中,肽降解决定子是SEQ ID NO:46的变体。这样的变体包括与SEQ ID NO:46有以下不同的肽:有一个或多个(例如,1、2、3、4)氨基酸取代;一个或多个缺失(例如,1、2、3);一个或多个插入(例如,1、2、3);或其中任何两个以上的组合。在一些情况下,SEQ ID NO:46的变体具有一个或多个(例如,1、2、3、4)取代。在一些情况下,SEQ ID NO:46的变体具有一个或多个(例如,1、2、3)缺失。在一些情况下,SEQ ID NO:46的变体具有一个或多个(例如,1、2、3)插入。在一些情况下,SEQ ID NO:46的变体具有一个或多个(例如,1、2、3、4)取代和一个或多个(例如,1、2、3)缺失。在一些情况下,SEQ ID NO:46的变体具有一个或多个(例如,1、2、3、4)取代和一个或多个插入(例如,1、2、3)。在一些情况下,SEQ ID NO:46的变体具有一个或多个(例如,1、2、3)缺失和一个或多个(例如,1、2、3)插入。在一些情况下,SEQ ID NO:46的变体在SEQ ID NO:46内具有1-5个、1-4个、1-3个、2个或1个氨基酸取代。在某些情况下,2位(P)未取代。在某些情况下,1位是pS并且2位是P。在某些情况下,1位是pS、2位是P,并且5位是E。在某些情况下,1位是pS、2位是P,并且5位是pS。在某些情况下,1位是pS、2位是P,并且5位是pT。在某些情况下,1位是pT、2位是P,并且5位是E。在某些情况下,1位是pT、2位是P,并且5位是pS。在某些情况下,1位是pT、2位是P,并且5位是pT。

[0200] 在某些情况下,肽降解决定子基于与WD40重复蛋白结合的肽的天然结合共有序列,该WD40重复蛋白是E3泛素连接酶的底物衔接子。在某些情况下,肽降解决定子是结合WD40重复蛋白的肽的天然结合共有序列的变体(例如,取代、缺失或插入变体),WD40重复蛋白是E3泛素连接酶的底物衔接子。下文提供了与WD40重复蛋白结合的肽的天然结合共有序列的非限制性实例,所述WD40重复蛋白是E3泛素连接酶的底物衔接子(序列从上至下指定为SEQ ID NO.:65至92):

[0201]

E3 连接酶/降解决定子	已知实例数	基序模式†‡
APC/C(DBOX)	8	.R..L..[LIVM].
APC/C(KEN)	15	.KEN.
APC/C(ABBA)	1	[FIVL].[ILMVP][FHY].[DE].{0,3}[DEST]
APCC_TPR_1	16	.[ILM]R$
CBL(PTK)	3	[DN].**Y**[ST]..P
CBL(MET)	5	D**Y**R
COP1	7	[DE][DE].{2,3}VP[DE]
CRL4_CDT2_1	6	[NQ]{0,1}..[ILMV][ST][DEN][FY][FY].{2,3}[KR]{2,3}[^DE]
CRL4_CDT2_2	1	[NQ]{0,1}..[ILMV]T[DEN][HMFY][FMY].{2,3}[KR]{2,3}[^DE]
Kelch_KEAP1_1	13	[DNS].[DES][TNS]GE
Kelch_KEAP1_2	1	QD.DLGV
Kelch_actinfilin	1	[AP]P[MV][IM]V
Kelch_KLHL3	4	E.EE.E[AV]DQH
MDM2_SWIB	5	F[^P]{3}W[^P]{2,3}[VIL]
Nend_Nbox_1	1	^M{0,1}[FYLIW][^P]
Nend_UBRbox_1	2	^M{0,1}[RK][^P].
Nend_UBRbox_2	1	^M{0,1}([ED]).
Nend_UBRbox_3	1	^M{0,1}([NQ]).
Nend_UBRbox_4	8	^M{0,1}(C).
ODPH_VHL_1	8	[IL]A(**P**).{6,8}[FLIVM].[FLIVM]
SCF_COI1_1	6	..[RK][RK].SL..F[FLM].[RK]R[HRK].[RK].
SCF_FBW7_1	7	[LIVMP].{0,2}(**T**)P..([**ST**])
SCF_FBW7_2	2	[LIVMP].{0,2}(T)P..E
SCF_SKP2-CKS1_1	3	..[DE].(**T**)P.K
SCF_TIR1_1	7	.[VLIA][VLI]GWPP[VLI]...R.
SCF-TRCP1	18	D(**S**)G.{2,3}([**ST**])
SIAH	8	.P.A.V.P[^P]

[0202]

SPOP	13	[AVP].[ST][ST][ST]

[0203] †基序模式使用以下术语：‘.’指定任何氨基酸类型，‘[X]’指定该位置允许的氨基酸类型,模式开头的‘^X’指定序列以X型氨基酸开始，‘[^X]’表示该位置可以具有X型以外的任何氨基酸,数字指定为以下‘X{x,y}’,其中x和y指定在该位置需要的‘X’

[0204] 氨基酸类型的最小和最大数量。‘$’符号表示蛋白链的C末端。一级降解决定子中

的已知经翻译后修饰(例如,磷酸化和脯氨酸羟化)的保守残基位置以黑体字显示。

[0205] 本领域中已知的任何其他肽降解决定子也可用于本发明。例如见,Mészáros等,Sci.Signal.,10(470):eaak9982(2017);Guharoy等,Nature Communications,7:10239,doi:10.1038/ncomms10239(2016);美国专利9,783,575;9,297,017;和9,115,184,其全部通过引用整体并入本文。

[0206] 在某些情况下,肽降解决定子具有以下所列肽的氨基酸序列,或其变体:

[0207] FSDLWKLL(SEQ ID NO:31)-E3连接酶:MDM2;

[0208] SVEQTPKK(SEQ ID NO:32)-E3连接酶:SKP2-CKS1;

[0209] DSGIHS(SEQ ID NO:32)-E3连接酶:β-TrCP1;

[0210] LLPTPPLS(SEQ ID NO:33)-E3连接酶:FBXW7;

[0211] ASSSS(SEQ ID NO:34)-E3连接酶:SPOP;

[0212] LAPAAGDTIISLDF(SEQ ID NO:35)-E3连接酶:VHL;

[0213] PFLTPSPE(SEQ ID NO:36)-E3连接酶:FBXW7;

[0214] PPPY(SEQ ID NO:37)-E3连接酶:ITCH;

[0215] DEETGE(SEQ ID NO:38)-E3连接酶:KEAP1;

[0216] QDIDLGV(SEQ ID NO:39)-E3连接酶:KEAP1;

[0217] LLQPNNYQFC(SEQ ID NO:40)-E3连接酶:CBL;

[0218] DYR-E3连接酶:CBL;

[0219] RAVENQYSFY(SEQ ID NO:41)-E3连接酶:CBL;

[0220] QKENS(SEQ ID NO:42)-E3连接酶:CDH1;

[0221] FDIYMD(SEQ ID NO:43)-E3连接酶:CDC20/CDH1;

[0222] PRTALGDIG(SEQ ID NO:44)-E3连接酶:CDC20/CDH1;

[0223] DKENG(SEQ ID NO:45)-E3连接酶:PTTG1;

[0224] HRKHLQEIP(SEQ ID NO:93)-E3连接酶:APC/C;

[0225] SKENV(SEQ ID NO:94)-E3连接酶:APC/C;

[0226] TRIR(SEQ ID NO:95)-E3连接酶:APC/C;

[0227] DQIVPEY(SEQ ID NO:96)-E3连接酶:COP1;

[0228] TSMTDFYHSKRRL(SEQ ID NO:97)-E3连接酶:DCAF2;

[0229] SPETGE(SEQ ID NO:98)-E3连接酶:KEAP1;

[0230] EPEEPEADQH(SEQ ID NO:99)-E3连接酶:KLHL3;

[0231] LAPYIPMDDDFQL(SEQ ID NO:100)-E3连接酶:VHL;

[0232] LTPPQS(SEQ ID NO:101)-E3连接酶:FBXW7;

[0233] SVEQTPRK(SEQ ID NO:102)-E3连接酶:SKP2/CKS1;

[0234] DSGNYS(SEQ ID NO:103)-E3连接酶:β-TrCP1;

[0235] KPAAVVAPI(SEQ ID NO:104)-E3连接酶:Siah;或

[0236] ADSST(SEQ ID NO:105)-E3连接酶:SPOP

[0237] 上述肽(即,SEQ ID NO.:31-45和93-105)的变体包括具有一个或多个(例如,1、2、3、4、5)氨基酸取代;一个或多个缺失(例如,1、2、3);一个或多个插入(例如,1、2、3);或其中任何两个或多个的组合的肽。选择与相关的E3连接酶相互作用的变体。在一些情况下,所选

的肽降解决定子结合其相关的E3连接酶,结合亲和力为1nM至300nM。在一些情况下,所选的肽降解决定子结合相关的E3连接酶,结合亲和力为10nM至300nM。在一些情况下,所选的肽降解决定子结合相关的E3连接酶,结合亲和力为50nM至300nM。在一些情况下,所选的肽降解决定子结合相关的E3连接酶,结合亲和力为100nM至300nM。在一些情况下,所选的肽降解决定子结合相关的E3连接酶,结合亲和力为200nM至300nM。在一些情况下,所选的肽降解决定子结合相关的E3连接酶,结合亲和力为200nM至250nM。在一些情况下,所选的肽降解决定子结合相关的E3连接酶,结合亲和力为1nM至1000nM。在一些情况下,所选的肽降解决定子结合相关的E3连接酶,结合亲和力为200nM至1000nM。

[0238] 以下提供了非限制性示例性变体:

[0239] 对于FBXW7 E3连接酶:LTPPAS(SEQ ID NO:106)、LTPPSS(SEQ ID NO:107)、LSPPPS(SEQ ID NO:108)、LSPPAS(SEQ ID NO:109)、LSPPLS(SEQ ID NO:110);

[0240] 对于β-TrCP1 E3连接酶:DSGIIS(SEQ ID NO:111)、DSGNYT(SEQ ID NO:112)、DSGIDT(SEQ ID NO:113)、DSGIET(SEQ ID NO:114)、DSGVDTS(SEQ ID NO:115);和

[0241] 对于DCAF2 E3连接酶:TSMTDFYHSKRRI(SEQ ID NO:116)、TSMTDFYHSKRKL(SEQ ID NO:117)、TSMTDFYHSKRRS(SEQ ID NO:118)。

[0242] 在某些情况下,肽降解决定子的长度为4至20个氨基酸(例如,4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20)。

[0243] 在某些情况下,肽降解决定子具有如SEQ ID NO.:26至30中任一项所示的肽的氨基酸序列。在一些情况下,肽降解决定子具有如SEQ ID NO.:26至30中任一项所示的肽的变体的氨基酸序列。在某些情况下,肽降解决定子具有如SEQ ID NO.:31至45中任一项所示的肽的氨基酸序列。在一些情况下,肽降解决定子具有如SEQ ID NO.:31至45中任一项所示的肽的变体的氨基酸序列。在某些情况下,肽降解决定子具有如SEQ ID NO.:65至118中任一项所示的肽的氨基酸序列。在一些情况下,肽降解决定子具有如SEQ ID NO.:65至118中任一项所示的肽的变体的氨基酸序列。变体包括具有一个或多个(例如,1、2、3、4、5)氨基酸取代;一个或多个缺失(例如,1、2、3);一个或多个插入(例如,1、2、3);或其中任何两个以上的组合的肽降解决定子。

[0244] 上述肽降解决定子结合其相关的泛素E3连接酶的底物衔接子(例如,Cop1、FBXW7、FBXW8)。在一些情况下,肽降解决定子结合泛素E3连接酶的底物衔接子(例如,Cop1、FBXW7、FBXW8),结合亲和力为1nM至300nM。在一些情况下,肽降解决定子结合泛素E3连接酶的底物衔接子(例如,Cop1、FBXW7、FBXW8),结合亲和力为10nM至300nM。在一些情况下,肽降解决定子结合泛素E3连接酶的底物衔接子(例如,Cop1、FBXW7、FBXW8),结合亲和力为50nM至300nM。在一些情况下,肽降解决定子结合泛素E3连接酶的底物衔接子(例如,Cop1、FBXW7、FBXW8),结合亲和力为100nM至300nM。在一些情况下,肽降解决定子结合泛素E3连接酶的底物衔接子(例如,Cop1、FBXW7、FBXW8),结合亲和力为200nM至300nM。在一些情况下,肽降解决定子结合泛素E3连接酶的底物衔接子(例如,Cop1、FBXW7、FBXW8),结合亲和力为200nM至250nM。在一些情况下,肽降解决定子结合泛素E3连接酶的底物衔接子(例如,Cop1、FBXW7、FBXW8),结合亲和力为1nM至1000nM。在一些情况下,肽降解决定子结合泛素E3连接酶的底物衔接子(例如,Cop1、FBXW7、FBXW8),结合亲和力为200nM至1000nM。

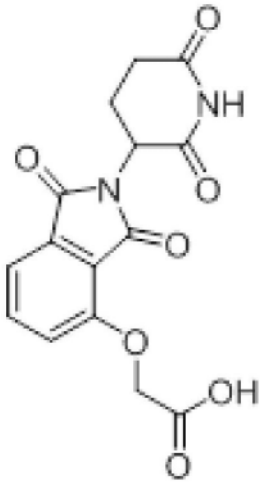
[0245] 本公开特征还在于选择蛋白降解决定子的方法。如此选择的蛋白降解决定子可用

于本公开的嵌合构建体中。该方法包括使泛素E3连接酶的底物衔接子与天然存在的肽降解决定子的变体接触,并选择以所需亲和力结合底物衔接子的降解决定子。例如,该方法包括使作为E3泛素连接酶的底物衔接子的WD40重复蛋白接触结合WD40重复蛋白的天然结合共有序列的氨基酸序列的变体(例如,Cop1、FBXW7、FBXW8),然后选择与WD40重复蛋白结合的肽。在一些情况下,所选的肽降解决定子结合WD40重复蛋白,结合亲和力为1nM至1000nM。在一些情况下,所选的肽降解决定子结合WD40重复蛋白,结合亲和力为10nM至300nM。在一些情况下,所选的肽降解决定子结合WD40重复蛋白,结合亲和力为50nM至300nM。在一些情况下,所选的肽降解决定子结合WD40重复蛋白,结合亲和力为100nM至300nM。在一些情况下,所选的肽降解决定子结合WD40重复蛋白,结合亲和力为200nM至300nM。在一些情况下,所选的肽降解决定子结合WD40重复蛋白,结合亲和力为200nM至250nM。在一些情况下,所选的肽降解决定子结合WD40重复蛋白,结合亲和力为1nM至1000nM。在一些情况下,所选的肽降解决定子结合WD40重复蛋白,结合亲和力为200nM至1000nM。在一些情况下,所选的肽降解决定子结合WD40重复蛋白,结合亲和力为小于1nM(例如,约0.01nM、约0.05nM、约0.1nM、约0.5nM)。在一些情况下,所选的肽降解决定子结合WD40重复蛋白,结合亲和力大于300nM(例如,约350nM、约400nM、约500nM、约1000nM)。

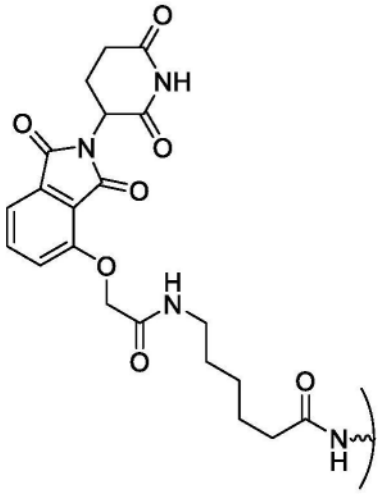
[0246] 在某些情况下,对需要靶向降解的蛋白进行直接修饰。检查该蛋白的包括结构无序区域的区域。结构无序的区域是由IUPred:iupred.enzim.hu计算的无序评分小于或等于0.4的区域。该蛋白在结构无序区域中被修饰以包括上述的肽降解决定子序列或其变体。在一些情况下,结构无序区在蛋白的N-或C-末端。在一些情况下,结构无序区在蛋白的N-和C-末端之间。可以将肽降解决定子序列插入结构无序区。在其他情况下,肽降解决定子序列被取代以替换蛋白的结构无序区中的氨基酸序列。可以例如通过CRISPR/Cas9修饰来进行此类取代。

[0247] 小分子降解决定子

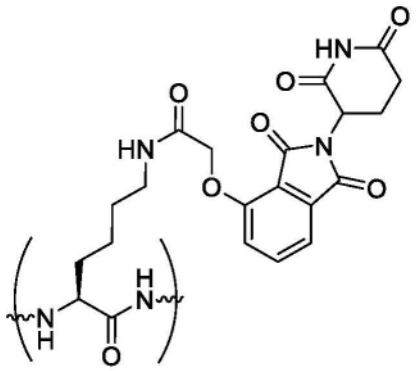
[0248] 本公开特征在于可以在本文所述的嵌合体中使用的小分子降解决定子。在一个实施方式中,小分子降解决定子基于具有以下结构的沙利度胺:

[0249] 

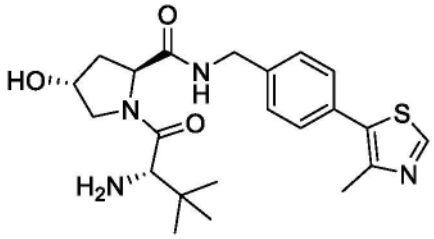
[0250] 在某些情况下,当小分子降解决定子在稳定肽的N端缀合时,其结构如下所示:

[0251] 

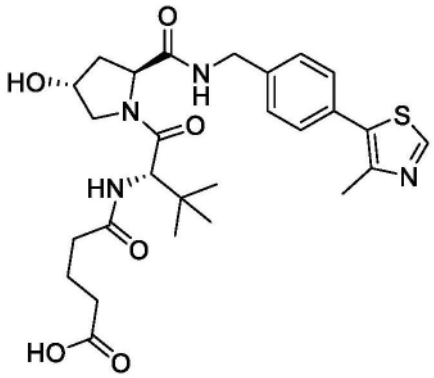
[0252] 在某些情况下,当小分子降解决定子在稳定肽的C端缀合时,其结构如下所示:

[0253] 

[0254] 在某些情况下,本文采用的小分子降解决定子结合Von Hippel-Lindau(“VHL”)蛋白,并具有以下提供的结构(与酸残基偶联相容)的配体:

[0255] 

[0256] 在某些情况下,当小分子VHL降解决定子与胺缀合时,使用如下所示的羧酸酯类似物:

[0257] 

[0258] 本领域已知的任何小分子降解决定子都可以用于本文所述的嵌合体。在某些情况

下,本文所用的小分子降解决定子是美国专利9,694,084;9,750,816;9,770,512;9,821,068;9,783,575;9,765,019;9,632,089和9,500,653所述的任何降解决定子,其全部内容通过引用整体并入本文。

[0259] 稳定肽和降解决定子的嵌合体

[0260] 本公开提供了稳定化的肽(例如,钉合的,缝合的)与降解决定子(例如,小分子降解决定子、一级序列降解决定子、和稳定的(例如,钉合的)肽降解决定子)的嵌合体。这样的嵌合体可以以小分子(例如,cereblon-结合分子)或其他能够靶向降解结合的蛋白的小分子或肽降解决定子部分有效地靶向广泛的以前小分子所难以接近的蛋白。同样,可以结合并募集降解蛋白的稳定肽降解决定子可以与结合多种蛋白的小分子结合以降解疾病相关蛋白。这些新型的钉合肽降解决定子嵌合体扩大了钉合肽的生物活性的效力和广度。本文还涵盖包含多于一种(例如2、3、4或更多)稳定肽和一种降解决定子(例如一种小分子降解决定子,一种一级序列降解决定子或一种稳定(例如钉合)肽降解决定子)的嵌合体。本文还包括包含多于一种(例如2、3、4或更多个)降解决定子(例如,多于一种小分子降解决定子,多于一种一级序列降解决定子或多于一种稳定(例如钉合)肽降解决定子)和一种稳定肽的嵌合体。本文还涵盖包含多于一种(例如2、3、4或更多)稳定肽和多于一种(例如2、3、4或更多)降解决定子(例如,多于一种小分子降解决定子,多于一种一级序列降解决定子或多于一种稳定(例如钉合)肽降解决定子)的嵌合体。

[0261] 在某些实施方式中,嵌合体的钉合肽不是Bcl-2同源3(BH3)结构域多肽(例如,不是MCL-1的BH3结构域,不是BCL2结构域(SAHB)的MCL-1稳定的α螺旋,或不是MCL-1$SAHB_D$)。

[0262] 稳定肽-肽降解决定子嵌合体

[0263] 本文提供稳定肽-肽降解决定子嵌合体。这些嵌合体由稳定肽和肽降解决定子组成,其中稳定肽结合第一蛋白,第一蛋白是靶向以降解的蛋白,并且肽降解决定子直接或间接结合第二蛋白,第二蛋白是泛素E3连接酶的底物衔接子。因此,在某些实施方式中,上述稳定肽(例如,钉合、缝合的)连接到上述肽降解决定子。示例性嵌合体如图7、15、17和18所示。

[0264] 稳定肽可以通过任何感兴趣的接头(例如,肽接头、合成化合物接头)连接至降解决定子。下文描述了可用于将肽降解决定子连接至稳定肽以形成本文所述的嵌合体的接头的非限制性实例,图6中示出了一个子集。

[0265] 在某些实施方式中,稳定所述肽具有以下所示的任一氨基酸序列:SEQ ID NO.:1-24和134或其变体。在一些实施方式中,肽降解决定子具有以下所示的任一氨基酸序列:SEQ ID NO.:25-46、65-118或其变体。在某些情况下,肽降解决定子连接至稳定肽的N末端。在其他情况下,肽降解决定子连接至稳定肽的C末端。在一些情况下,降解决定子或降解决定子连接至稳定肽的N-和C末端。在一些情况下,降解决定子连接至稳定肽的内部氨基酸位置(即,除N-或C末端外的稳定肽中任何氨基酸位置,例如,2、3、4、5、6、7、8、9位等)。在一些情况下,多于一个(例如,2或3)降解决定子连接至稳定肽。在多于一个(例如,2或3)降解决定子连接至稳定肽的一些情况下,一个降解决定子可连接至稳定肽的末端,并且一个降解决定子可连接至稳定肽的内部位置。在多于一个(例如,2或3)降解决定子连接至稳定肽的一些情况下,一个降解决定子可连接至稳定肽的各末端。在多于一个(例如,2或3)降解决定子连接至稳定肽的一些情况下,多于一个降解决定子各自连接至稳定肽的内部位置。图7描绘

了其中降解决定子连接至稳定肽的内部氨基酸位置的示例性嵌合体。

[0266] 在某些情况下,稳定肽-肽降解决定子嵌合体具有SEQ ID NO.:119-126中的一种的氨基酸序列。

[0267] 在某些实施方式中,稳定肽-肽降解决定子嵌合体包含一个或多个(例如,2、3、4或更多)稳定肽和一个肽降解决定子。在某些实施方式中,稳定肽-肽降解决定子嵌合体包含一个或多个(例如,2、3、4或更多)肽降解决定子和一个稳定肽。在某些实施方式中,稳定肽-肽降解决定子嵌合体包含一个或多个(例如,2、3、4或更多)稳定肽和一个或多个(例如,2、3、4或更多)肽降解决定子。

[0268] 本公开涵盖图7、15、17和18中列出的每个嵌合构建体。本公开内容涵盖了图7、15、17和18中列出的每个嵌合构建体的变体。

[0269] 在某些实施方式中,嵌合体是以下实施例部分描述的嵌合体。对于稳定肽-肽降解决定子嵌合体的非限制实例,例如参见下面的实施例6。

[0270] 稳定肽-小分子降解决定子嵌合体

[0271] 本文提供稳定肽-小分子降解决定子嵌合体。这些嵌合体由稳定肽和小分子降解决定子构成,其中稳定肽结合第一蛋白,第一蛋白是降解靶标,并且小分子降解决定子结合第二蛋白,第二蛋白是降解剂蛋白。因此,在某些实施方式中,上述稳定肽(例如,钉合,缝合)连接至上述小分子降解决定子。稳定肽可通过任何感兴趣的接头(例如,合成化合物接头)连接至降解决定子。示例性嵌合体如图1、7、8、9、11、12、19和20所示。

[0272] 在某些实施方式中,第一蛋白是第二蛋白降解的靶标,或第二蛋白的配体或受体。在一些实施方式中,第一蛋白是细胞内蛋白。在一些实施方式中,第一蛋白是细胞外蛋白。在一些实施方式中,第一蛋白是细胞表面蛋白(例如,受体)。在一些实施方式中,第一蛋白是引起疾病的或疾病相关蛋白。在一些实施方式中,第一蛋白是杀手蛋白(例如,BAX、BAK)或对细胞有害或引起神经变性的蛋白(例如,IgG、β淀粉样蛋白、tau、α-突触核蛋白、TDP-43、HbS(血红蛋白-镰状细胞)、超氧化物歧化酶、Notch3、FUS、GFAP)。在一些实施方式中,第一蛋白是选自由以下组成的组的蛋白:BCL2、BCLXL、MCL-1、BFL-1、BCL-w、BCL-B、EZH2、HDM2/HDMX、KRAS/NRAS/HRAS、MYC、β-连环蛋白、PI3K、PTEN、TSC、AKT、BRCA1/2、EWS-FLI融合蛋白、MLL融合蛋白、受体酪氨酸激酶、HOX同源物、JUN、Cyclin D、Cyclin E、BRAF、CRAF、CDK4、CDK2、HPV-E6/E7、Aurora激酶、MITF、Wnt1、PD-1、BCR和CCR5。在一些实施方式中,第一蛋白是细菌蛋白。在一些实施方式中,第一蛋白是病毒蛋白。在某些情况下,第一蛋白是引起神经变性的蛋白聚集体(例如,β淀粉样蛋白)。

[0273] 在某些实施方式中,稳定所述肽具有以下所示的任一氨基酸序列:SEQ ID NO.:1-24和134或其变体。

[0274] 在某些实施方式中,稳定肽通过接头结合小分子降解决定子。下文描述了可用于将稳定肽与小分子彼此连接以形成本文所述的嵌合体的接头的非限制性实例,图6中描绘了一个子集。

[0275] 在某些实施方式中,稳定肽间接结合小分子肽。

[0276] 在某些情况下,小分子降解决定子连接至稳定肽的N末端。在其他情况下,小分子降解决定子连接至稳定肽的C末端。在一些情况下,降解决定子或降解决定子连接至稳定肽的N-和C末端。在一些情况下,降解决定子连接至稳定肽的内部氨基酸位置(即,除N-或C末

端外的稳定肽中任何氨基酸位置,例如,2、3、4、5、6、7、8、9位等)。在一些情况下,多于一个(例如,2或3)降解决定子连接至稳定肽。在多于一个(例如,2或3)降解决定子连接至稳定肽的一些情况下,一个降解决定子可连接至稳定肽的末端,并且一个降解决定子可连接至稳定肽的内部位置。在多于一个(例如,2或3)降解决定子连接至稳定肽的一些情况下,一个降解决定子可连接至稳定肽的各个末端。在多于一个(例如,2或3)降解决定子连接至稳定肽的一些情况下,多于一个降解决定子各自连接至稳定肽的内部位置。

[0277] 在某些实施方式中,第二蛋白是降解剂蛋白,例如E3泛素连接酶或E3泛素连接酶的底物衔接子。在某些实施方式中,第二蛋白是E3泛素连接酶。E3泛素连接酶的非限制性实例包括VHL、COP1和MDM2。在某些实施方式中,第二蛋白选自由以下组成的组:MDM2、SKP2-CKS1、FBXW1、FBXW2、FBXW4、FBXW5、FBXW7、FBXW8、FBXW9、FBXW10、FBXW11、FBXW12、SPOP、VHL、ITCH、KEAP1、KLHL2、KLHL3、KLHL7、KLHL12、KLHL13、KLHL15、KLHL20、KLHL21、KLHL24、KLHL40、KLHL42、COP1、TRAF7、RFWD3、DCAF1、DCAF2、DCAF3、DCAF4、DCAF5、DCAF6、DCAF7、DCAF8、DCAF9、DCAF10、DCAF11、DCAF12、DCAF13、DCAF14、DCAF15、DCAF16、DCAF17、DCAF19、SIAH1、TRPC4AC、DET1、WSB1、WSB2、HERC1、DDB2、CSA、CBL、CDC20和FZR1。在某些实施方式中,第二蛋白是与选自由以下组成的组的蛋白结合的蛋白:MDM2、SKP2-CKS1、FBXW1、FBXW2、FBXW4、FBXW5、FBXW7、FBXW8、FBXW9、FBXW10、FBXW11、FBXW12、SPOP、VHL、ITCH、KEAP1、KLHL2、KLHL3、KLHL7、KLHL12、KLHL13、KLHL15、KLHL20、KLHL21、KLHL24、KLHL40、KLHL42、COP1、TRAF7、RFWD3、DCAF1、DCAF2、DCAF3、DCAF4、DCAF5、DCAF6、DCAF7、DCAF8、DCAF9、DCAF10、DCAF11、DCAF12、DCAF13、DCAF14、DCAF15、DCAF16、DCAF17、DCAF19、SIAH1、TRPC4AC、DET1、WSB1、WSB2、HERC1、DDB2、CSA、CBL、CDC20和FZR1。在一些实施方式中,第二蛋白结合MDM2或与MDM2复合的蛋白,例如MDMX。

[0278] 在某些实施方式中,第二蛋白是降解剂蛋白,例如E3泛素连接酶或E3泛素连接酶的底物衔接子。在某些实施方式中,第二蛋白是E3泛素连接酶。在一些实施方式中,第二蛋白结合至E3连接酶(例如,MDM2)或与E3连接酶复合的蛋白,例如结合MDM2的MDMX。在某些实施方式中,E3泛素连接酶是RING E3泛素连接酶(例如,Mdm2-MdmX、TRIM5α、c-CBL、cIAP、RNF4、BIRC7、IDOL、BRCA1-BARD1、RING1B-Bmi1、E4B、CHIP、Prp19)。在某些实施方式中,E3泛素连接酶是HECT E3泛素连接酶(例如,Smurf1、Smurf2、Itch、E6AP)。在某些实施方式中,E3泛素连接酶是RBR E3泛素连接酶(例如,Parkin、Parc、RNF144(A/B)、HOIP、HHARI)。例如,E3泛素连接酶的非限制性实例见Morreale和Walden,Cell 165,2016DOI http:/dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.003。

[0279] 在某些实施方式中,小分子降解决定子基于沙利度胺(例如,见上述结构)。在某些实施方式中,小分子降解决定子基于结合Von Hippel-Lindau蛋白(例如,见上述结构)的配体。在某些实施方式中,小分子降解决定子是本领域已知的任何降解决定子。在某些实施方式中,本文所用的小分子降解决定子是美国专利9,694,084;9,750,816;9,770,512;9,821,068;9,783,575;9,765,019;9,632,089和9,500,653中所述的任何降解决定子,通过引用将其全部内容全部合并入本文。

[0280] 钉合肽-小分子降解决定子嵌合体的非限制性实例提供如下:

[0281] ^QWAREIGAQLRX$_1$BAD X$_2$LNAQYERR(SEQ ID NO:1)-PUMA

[0282] ^FSSNRX$_1$KILX$_2$RTQILNQEWKQRRIQPV(SEQ ID NO:2)-EZH2

[0283] ^RRFFGIX$_1$LTNX$_2$LKTEEGN(SEQ ID NO:3)-SOS

[0284] ^RKALETLRRVGDGVX$_1$RNHX$_2$TAF(SEQ ID NO:4)-MCL-1

[0285] ^LSQEQLEHRERSLX$_1$TLRX$_2$IQRBLF(SEQ ID NO:5)-BCL9

[0286] ^LTF8EYWAQ#XSAA(SEQ ID NO:6)-p53

[0287] ^DIIRNIARHLAX$_1$VGDX$_2$BDRSI(SEQ ID NO:7)-BID

[0288] ^IWIAQELRX$_1$IGDX$_2$FNAYYARR(SEQ ID NO:8)-BIM

[0289] ^NLWAAQRYGRELRX$_1$BDDX$_2$FVDSFKK(SEQ ID NO:9)-BAD S153D

[0290] ^NLWAAQRYGRELRX$_1$BSDX$_2$FVDSFKK(SEQ ID NO:10)-BAD

[0291] ^QLTAARLKX$_1$LGDX$_2$LHQRTBWR(SEQ ID NO:11)-HRK

[0292] ^AELEVESATQLRX$_1$FGDX$_2$LNFRQKLL(SEQ ID NO:12)-NOXA

[0293] QWAREIGAQLRX$_1$BADX$_2$LNAQYERR&(SEQ ID NO:13)-PUMA

[0294] FSSNRX$_1$KILX$_2$RTQILNQEWKQRRIQPV&(SEQ ID NO:14)-EZH2

[0295] RRFFGI X$_1$LTNX$_2$LKTEEGN&(SEQ ID NO:15)-SOS

[0296] RKALETLRRVGDGVX$_1$RNHX$_2$TAF&(SEQ ID NO:16)-MCL-1

[0297] LSQEQLEHRERSLX$_1$TLRX$_2$IQRBLF&(SEQ ID NO:17)-BCL9

[0298] LTF8EYWAQ#XSAA&(SEQ ID NO:18)-p53

[0299] DIIRNIARHLAX$_1$VGDX$_2$BDRSI&(SEQ ID NO:19)-BID

[0300] IWIAQELRX$_1$IGDX$_2$FNAYYARR&(SEQ ID NO:20)-BIM

[0301] NLWAAQRYGRELRX$_1$BDDX$_2$FVDSFKK&(SEQ ID NO:21)-BAD-S153D

[0302] NLWAAQRYGRELRX$_1$BSDX$_2$FVDSFKK&(SEQ ID NO:22)-BAD

[0303] QLTAARLKX$_1$LGDX$_2$LHQRTBWR&(SEQ ID NO:23)-HRK

[0304] AELEVESATQLRX$_1$FGDX$_2$LNFRQKLL&(SEQ ID NO:24)-NOXA

[0305] IWIA%ELRX$_1$IGDX$_2$FNAYYARR(SEQ ID NO:136)-BIM

[0306] IWIAQELRX$_1$IGDX$_2$FN%YYARR(SEQ ID NO:137)-BIM

[0307] LTF8$YWAQLXSAA(SEQ ID NO:138)

[0308] LTF8EYWAQLX$AA(SEQ ID NO:139)

[0309] %TF8EYWAQLXSAA(SEQ ID NO:140)

[0310] LTF8%YWAQLXSAA(SEQ ID NO:141)

[0311] LTF8EYWAQLX%AA(SEQ ID NO:142)

[0312] @TF8EYWAQLXSAA(SEQ ID NO:143),

[0313] 其中,8＝R-辛烯基丙氨酸;B＝正亮氨酸;#＝环丁基丙氨酸;X＝S-戊烯基丙氨酸,并且在某些情况下,X$_1$和X$_2$相同(例如,S-戊烯基丙氨酸),^＝沙利度胺-氨基己酸,&＝Lys-ε-氨基-沙利度胺,%＝A$_1$、A$_2$、A$_3$、A$_4$、A$_5$、A$_6$、A$_7$、A$_8$、A$_9$、A$_{10}$或A$_{11}$,其中A$_1$＝DAB-沙利度胺,A$_2$＝DAB-Gly-Thal,A$_3$＝DAB-βAla-Thal,A$_4$＝DAB-接头1-Thal,A$_5$＝DAB-接头2-Thal,A$_6$＝DAB-接头3-Thal、A$_7$＝DAB-接头4-Thal,A$_8$＝DAB-接头5-Thal,A$_9$＝DAB-接头6-Thal,A$_{10}$＝DAB-接头7-Thal,并且A$_{11}$＝DAB-接头8-Thal;$＝B$_1$、B$_2$、B$_3$、B$_4$、B$_5$或B$_6$,其中B$_1$＝DAB-TRIB甲酸盐,B$_2$＝DAB-Gly-TRIB甲酸盐,B$_3$＝DAB-βAla-TRIB甲酸盐,B$_4$＝DAB-接头3-TRIB甲酸盐,B$_5$＝DAB-接头5-TRIB甲酸盐,并且B$_6$＝DAB-接头7-TRIB甲酸盐;@＝C$_1$、C$_2$、C$_3$、C$_4$、C$_5$或C$_6$,其中C$_1$＝DAB-VHL甲酸盐,C$_2$＝DAB-Gly-VHL甲酸盐,C$_3$＝DAB-βAla-VHL甲酸盐,C$_4$＝DAB-接头3-VHL甲酸

盐,C_5=DAB-接头5-VHL甲酸盐,并且C_6=DAB-接头7-VHL甲酸盐,

[0314] 其中,接头1-接头8如图6所示。在一些实施方式中,沙利度胺-氨基己酸(^)或Lys-ε-氨基-沙利度胺(&)通过接头连接至钉合肽。

[0315] 在某些实施方式中,稳定肽-小分子降解决定子嵌合体包含一个或多个(例如,2、3、4或更多)稳定肽和一个小分子降解决定子。在某些实施方式中,稳定肽-小分子降解决定子嵌合体包含一个或多个(例如,2、3、4或更多)小分子降解决定子和一个稳定肽。在某些实施方式中,稳定肽-小分子降解决定子嵌合体包含一个或多个(例如,2、3、4或更多)稳定肽和一个或多个(例如,2、3、4或更多)小分子降解决定子。

[0316] 上面列出的每个嵌合构建体及其变体都被本公开内容涵盖。本公开涵盖图1、7、8、9、11、12、19和20中列出的每个嵌合构建体。本公开涵盖图1、7、8、9、11、12、19和20中列出的每个嵌合构建体的变体。

[0317] 在某些实施方式中,嵌合体是以下实施例部分所述的嵌合体。例如,稳定肽-小分子降解决定子嵌合体的非限制性实例见以下实施例2、3、4和7。

[0318] 稳定肽-稳定肽降解决定子嵌合体

[0319] 本文提供稳定肽-稳定肽降解决定子嵌合体。这些嵌合体由两种稳定肽—第一稳定肽和第二稳定肽构成,其中第一稳定肽结合第一蛋白,第一蛋白是要降解的蛋白靶标,并且第二稳定肽结合第二蛋白,第二蛋白是降解剂蛋白。因此,在某些实施方式中,上述第一稳定肽(例如,钉合、缝合的)连接至上述第二稳定肽(例如,钉合、缝合的)。第一和第二稳定肽可以直接或间接连接。

[0320] 在某些实施方式中,第一蛋白是第二蛋白要降解的蛋白靶标,或第二蛋白的配体或受体。在一些实施方式中,第一蛋白是细胞内蛋白。在一些实施方式中,第一蛋白是细胞外蛋白。在一些实施方式中,第一蛋白是细胞表面蛋白(例如,受体)。在一些实施方式中,第一蛋白是引起疾病的或疾病相关蛋白。在一些实施方式中,第一蛋白是杀手蛋白(例如,BAX、BAK)或对细胞有害或引起神经变性的蛋白(例如,IgG、β淀粉样蛋白、tau、α-突触核蛋白、TDP-43、HbS(血红蛋白-镰状细胞)、超氧化物歧化酶、Notch3、FUS、GFAP)。在一些实施方式中,第一蛋白是选自由以下组成的组的蛋白:BCL2、BCLXL、MCL-1、BFL-1、BCL-w、BCL-B、EZH2、HDM2/HDMX、KRAS/NRAS/HRAS、MYC、β-连环蛋白、PI3K、PTEN、TSC、AKT、BRCA1/2、EWS-FLI融合蛋白、MLL融合蛋白、受体酪氨酸激酶、HOX同源物、JUN、Cyclin D、Cyclin E、BRAF、CRAF、CDK4、CDK2、HPV-E6/E7、Aurora激酶、MITF、Wnt1、PD-1、BCR和CCR5。在一些实施方式中,第一蛋白是细菌蛋白。在一些实施方式中,第一蛋白是病毒蛋白。在某些情况下,第一蛋白是引起神经变性的蛋白聚集体(例如,β淀粉样蛋白)。

[0321] 在某些实施方式中,第一稳定所述肽具有以下所示的任一氨基酸序列:SEQ ID NO.:1-24和134或其变体。

[0322] 在某些实施方式中,第一稳定肽通过接头结合第二稳定肽。下文描述了可用于将第一和第二稳定肽相互连接以形成本文所述的嵌合体的接头的非限制性实例,图6中示出了一个子集。

[0323] 在某些实施方式中,第一稳定肽间接结合至第二稳定肽。

[0324] 在某些实施方式中,第二蛋白是降解剂蛋白,例如E3泛素连接酶或E3泛素连接酶的底物衔接子。在某些实施方式中,第二蛋白是E3泛素连接酶。E3泛素连接酶的非限制性实

例包括VHL、COP1和MDM2。在某些实施方式中,第二蛋白选自由以下组成的组:MDM2、MDMX、SKP2-CKS1、FBXW1、FBXW2、FBXW4、FBXW5、FBXW7、FBXW8、FBXW9、FBXW10、FBXW11、FBXW12、SPOP、VHL、ITCH、KEAP1、KLHL2、KLHL3、KLHL7、KLHL12、KLHL13、KLHL15、KLHL20、KLHL21、KLHL24、KLHL40、KLHL42、COP1、TRAF7、RFWD3、DCAF1、DCAF2、DCAF3、DCAF4、DCAF5、DCAF6、DCAF7、DCAF8、DCAF9、DCAF10、DCAF11、DCAF12、DCAF13、DCAF14、DCAF15、DCAF16、DCAF17、DCAF19、SIAH1、TRPC4AC、DET1、WSB1、WSB2、HERC1、DDB2、CSA、CBL、CDC20和FZR1。在某些实施方式中,第二蛋白是与选自由以下组成的组的蛋白结合的蛋白:MDM2、SKP2-CKS1、FBXW1、FBXW2、FBXW4、FBXW5、FBXW7、FBXW8、FBXW9、FBXW10、FBXW11、FBXW12、SPOP、VHL、ITCH、KEAP1、KLHL2、KLHL3、KLHL7、KLHL12、KLHL13、KLHL15、KLHL20、KLHL21、KLHL24、KLHL40、KLHL42、COP1、TRAF7、RFWD3、DCAF1、DCAF2、DCAF3、DCAF4、DCAF5、DCAF6、DCAF7、DCAF8、DCAF9、DCAF10、DCAF11、DCAF12、DCAF13、DCAF14、DCAF15、DCAF16、DCAF17、DCAF19、SIAH1、TRPC4AC、DET1、WSB1、WSB2、HERC1、DDB2、CSA、CBL、CDC20和FZR1。在一些实施方式中,第二蛋白结合至MDM2或与MDM2复合的蛋白,例如MDMX。

[0325] 在某些实施方式中,第二蛋白是降解剂蛋白,例如E3泛素连接酶或E3泛素连接酶的底物衔接子。在某些实施方式中,第二蛋白是E3泛素连接酶。在一些实施方式中,第二蛋白结合至E3连接酶(例如,MDM2)或与E3连接酶复合的蛋白,例如结合MDM2的MDMX。在某些实施方式中,E3泛素连接酶是RING E3泛素连接酶(例如,Mdm2-MdmX、TRIM5α、c-CBL、cIAP、RNF4、BIRC7、IDOL、BRCA1-BARD1、RING1B-Bmi1、E4B、CHIP、Prp19)。在某些实施方式中,E3泛素连接酶是HECT E3泛素连接酶(例如,Smurf1、Smurf2、Itch、E6AP)。在某些实施方式中,E3泛素连接酶是RBR E3泛素连接酶(例如,Parkin、Parc、RNF144(A/B)、HOIP、HHARI)。例如,E3泛素连接酶的非限制性实例见Morreale和Walden,Cell 165,2016DOI http:/dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.003。

[0326] 在某些实施方式中,第二稳定所述肽具有以下所示的氨基酸序列:SEQ ID NO:134或其变体。在某些实施方式中,第二稳定所述肽具有以下所示的氨基酸序列:SEQ ID NO:6或其变体。在某些实施方式中,第二稳定所述肽具有以下所示的氨基酸序列:SEQ ID NO:18或其变体。

[0327] 在某些实施方式中,第二稳定肽是美国专利8,889,632、9,458,202、9,505,804、9,527,896、9,957,299、10,030,049和10,059,741、国际专利申请公开WO 1998/001467和WO 2017/165617、以及美国专利申请公开2014/0018302A1中所述的稳定肽,通过引用将其全部内容全部合并入本文。

[0328] 在某些情况下,第一稳定肽结合第二稳定肽的N末端。在其他情况下,第一稳定肽结合第二稳定肽的C末端。在一些情况下,第一稳定肽结合第二稳定肽的内部氨基酸位置(即,除N-或C末端外的稳定肽中任何氨基酸位置,例如,2、3、4、5、6、7、8、9位等)。在某些情况下,第二稳定肽结合第一稳定肽的N末端。在其他情况下,第二稳定肽结合第一稳定肽的C末端。在一些情况下,第二稳定肽结合第一稳定肽的内部氨基酸位置(即,除N-或C末端外的稳定肽中任何氨基酸位置,例如,2、3、4、5、6、7、8、9位等)。

[0329] 在某些实施方式中,稳定肽-稳定肽降解决定子嵌合体包含一个或多个(例如,2、3、4或更多)稳定肽(其结合一个或多个要降解的蛋白),和一个结合降解剂蛋白的稳定肽降解决定子。在某些实施方式中,稳定肽-稳定肽降解决定子嵌合体包含一个或多个(例如,2、

3、4或更多)稳定肽降解决定子(其结合一个或多个降解剂蛋白),和结合要降解的蛋白的一个稳定肽。在某些实施方式中,稳定肽-稳定肽降解决定子嵌合体包含一个或多个(例如,2、3、4或更多)稳定肽(其结合一个或多个要降解的蛋白),和一个或多个(例如,2、3、4或更多)稳定肽降解决定子(其结合一个或多个降解剂蛋白)。

[0330] 本公开内容涵盖图21中列出的每个嵌合构建体。本公开内容涵盖图21中列出的每种嵌合构建体的变体。

[0331] 在某些实施方式中,嵌合体是以下实施例部分所述的嵌合体。例如,稳定肽-稳定肽降解决定子嵌合体的非限制性实例见以下实施例8。

[0332] 小分子-稳定肽降解决定子嵌合体

[0333] 本文提供小分子-稳定肽降解决定子嵌合体。这些嵌合体由小分子和稳定肽组成,其中小分子结合第一蛋白,第一蛋白是要降解的蛋白靶标,并且稳定肽结合第二蛋白,第二蛋白是降解剂蛋白。因此,在某些实施方式中,小分子连接至上述稳定肽(例如,钉合,缝合)。小分子和稳定肽可以为直接或间接连接。

[0334] 在某些实施方式中,第一蛋白是要被第二蛋白降解的蛋白靶标或第二蛋白的配体或受体。在一些实施方式中,第一蛋白是细胞内蛋白。在一些实施方式中,第一蛋白是细胞外蛋白。在一些实施方式中,第一蛋白是细胞表面蛋白(例如,受体)。在一些实施方式中,第一蛋白是引起疾病的或疾病相关蛋白。在一些实施方式中,第一蛋白是杀手蛋白(例如,BAX、BAK)或对细胞有害或引起神经变性的蛋白(例如,IgG、β淀粉样蛋白、tau、α-突触核蛋白、TDP-43、HbS(血红蛋白-镰状细胞)、超氧化物歧化酶、Notch3、FUS、GFAP)。在一些实施方式中,第一蛋白是选自由以下组成的组的蛋白:BCL2、BCLXL、MCL-1、BFL-1、BCL-w、BCL-B、EZH2、HDM2/HDMX、KRAS/NRAS/HRAS、MYC、β-连环蛋白、PI3K、PTEN、TSC、AKT、BRCA1/2、EWS-FLI融合蛋白、MLL融合蛋白、受体酪氨酸激酶、HOX同源物、JUN、Cyclin D、Cyclin E、BRAF、CRAF、CDK4、CDK2、HPV-E6/E7、Aurora激酶、MITF、Wnt1、PD-1、BCR和CCR5。在一些实施方式中,第一蛋白是细菌蛋白。在一些实施方式中,第一蛋白是病毒蛋白。在某些情况下,第一蛋白是引起神经变性的蛋白聚集体(例如,β淀粉样蛋白)。

[0335] 在某些实施方式中,小分子是在形成嵌合体的一部分时能够结合蛋白而不会干扰嵌合体的钉合肽与其靶标相互作用的能力的任何药物或化合物。用于评估药物或化合物(在其嵌合体的情况下)对(嵌合体的)钉合肽与其靶标相互作用的能力(例如免疫荧光和免疫反应)的干扰的测定和方法是本领域已知的,例如,免疫荧光和免疫共沉淀。在某些实施方式中,小分子是图23中描绘的化合物。在某些实施方式中,小分子是激酶抑制剂。在某些实施方式中,小分子是组蛋白脱乙酰基酶抑制剂。

[0336] 在某些实施方式中,小分子通过接头连接至稳定肽。下文描述了可用于使小分子与稳定肽彼此连接以形成本文所述的嵌合体的接头的非限制性实例,图6中示出了一个子集。

[0337] 在某些实施方式中,小分子间接连接至稳定肽。

[0338] 在某些情况下,小分子连接至稳定肽的N末端。在其他情况下,小分子连接至稳定肽的C末端。在一些情况下,小分子连接至稳定肽的内部氨基酸位置(即,除N-或C末端外的稳定肽中任何氨基酸位置,例如,2、3、4、5、6、7、8、9位等)。

[0339] 在某些实施方式中,第二蛋白是降解剂蛋白,例如E3泛素连接酶或E3泛素连接酶

的底物衔接子。在某些实施方式中,第二蛋白是E3泛素连接酶。E3泛素连接酶的非限制性实例包括VHL、COP1和MDM2。在某些实施方式中,第二蛋白选自由以下组成的组:MDM2、MDMX、SKP2-CKS1、FBXW1、FBXW2、FBXW4、FBXW5、FBXW7、FBXW8、FBXW9、FBXW10、FBXW11、FBXW12、SPOP、VHL、ITCH、KEAP1、KLHL2、KLHL3、KLHL7、KLHL12、KLHL13、KLHL15、KLHL20、KLHL21、KLHL24、KLHL40、KLHL42、COP1、TRAF7、RFWD3、DCAF1、DCAF2、DCAF3、DCAF4、DCAF5、DCAF6、DCAF7、DCAF8、DCAF9、DCAF10、DCAF11、DCAF12、DCAF13、DCAF14、DCAF15、DCAF16、DCAF17、DCAF19、SIAH1、TRPC4AC、DET1、WSB1、WSB2、HERC1、DDB2、CSA、CBL、CDC20和FZR1。在某些实施方式中,第二蛋白是与选自由以下组成的组的蛋白结合的蛋白:MDM2、SKP2-CKS1、FBXW1、FBXW2、FBXW4、FBXW5、FBXW7、FBXW8、FBXW9、FBXW10、FBXW11、FBXW12、SPOP、VHL、ITCH、KEAP1、KLHL2、KLHL3、KLHL7、KLHL12、KLHL13、KLHL15、KLHL20、KLHL21、KLHL24、KLHL40、KLHL42、COP1、TRAF7、RFWD3、DCAF1、DCAF2、DCAF3、DCAF4、DCAF5、DCAF6、DCAF7、DCAF8、DCAF9、DCAF10、DCAF11、DCAF12、DCAF13、DCAF14、DCAF15、DCAF16、DCAF17、DCAF19、SIAH1、TRPC4AC、DET1、WSB1、WSB2、HERC1、DDB2、CSA、CBL、CDC20和FZR1。在一些实施方式中,第二蛋白结合至MDM2或与MDM2符合的蛋白,例如MDMX。

[0340] 在某些实施方式中,第二蛋白是降解剂蛋白,例如E3泛素连接酶或E3泛素连接酶的底物衔接子。在某些实施方式中,第二蛋白是E3泛素连接酶。在一些实施方式中,第二蛋白结合至E3连接酶(例如,MDM2)或与E3连接酶复合的蛋白,例如结合MDM2的MDMX。在某些实施方式中,E3泛素连接酶是RING E3泛素连接酶(例如,Mdm2-MdmX、TRIM5α、c-CBL、cIAP、RNF4、BIRC7、IDOL、BRCA1-BARD1、RING1B-Bmi1、E4B、CHIP、Prp19)。在某些实施方式中,E3泛素连接酶是HECT E3泛素连接酶(例如,Smurf1、Smurf2、Itch、E6AP)。在某些实施方式中,E3泛素连接酶是RBR E3泛素连接酶(例如,Parkin、Parc、RNF144(A/B)、HOIP、HHARI)。例如,E3泛素连接酶的非限制性实例见Morreale和Walden,Cell 165,2016DOI http:/dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.003。

[0341] 在某些实施方式中,稳定肽具有以下所示的氨基酸序列:SEQ ID NO:134或其变体。在某些实施方式中,第二稳定肽具有以下所示的氨基酸序列:SEQ ID NO:6或其变体。在某些实施方式中,第二稳定肽具有以下所示的氨基酸序列:SEQ ID NO:18或其变体。

[0342] 在某些实施方式中,小分子-稳定肽降解决定子嵌合体包含一个或多个(例如,2、3、4或更多)稳定肽降解决定子和一个小分子。在某些实施方式中,小分子-稳定肽降解决定子嵌合体包含一个或多个(例如,2、3、4或更多)小分子和一个稳定肽降解决定子。在某些实施方式中,小分子-稳定肽降解决定子嵌合体包含一个或多个(例如,2、3、4或更多)稳定肽降解决定子和的一个或多个(例如,2、3、4或更多)小分子。

[0343] 本公开内容涵盖图23中描绘的嵌合构建体。本公开内容涵盖图23中描绘的嵌合构建体的变体。

[0344] 在某些实施方式中,嵌合体是以下实施例部分所述的嵌合体。例如,小分子-稳定肽降解决定子嵌合体的非限制性实例见以下实施例9。

[0345] 接头

[0346] 对可用于上述构建体的接头没有特别限制。在一些实施方式中,接头是氨基酸,例如氨基丙酸、氨基丁酸、氨基戊酸或氨基己酸。在一些实施方式中,接头是低聚乙二醇,即,NH_2-$(CH_2$-CH_2-$O)_x$-CH_2-CH_2-COOH。在一些实施方式中,接头是肽接头。在一些实施方式中,可

以使用任何包含约1至30个残基(例如,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或30个氨基酸)的任意单链肽作为接头。在其他实施方式中,接头长度为10至20、10至30、10至40、10至50、10至60、10至70、10至80、10至90、10至100、10至144或10至150个氨基酸。在某些情况下,接头仅包含甘氨酸和/或丝氨酸残基。这种肽接头的实例包括:Gly,Ser;Gly Ser;Gly Gly Ser;Ser Gly Gly;Gly Gly Gly Ser (SEQ ID NO:47);Ser Gly Gly Gly(SEQ ID NO:48);Gly Gly Gly Gly Ser(SEQ ID NO:49);Ser Gly Gly Gly Gly(SEQ ID NO:50);Gly Gly Gly Gly Gly Ser(SEQ ID NO:51);Ser Gly Gly Gly Gly Gly(SEQ ID NO:52);Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser(SEQ ID NO:53);Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly(SEQ ID NO:54);$(Gly\ Gly\ Gly\ Gly\ Ser)_n$(SEQ ID NO:49)n,其中n是1以上的整数;和$(Ser\ Gly\ Gly\ Gly\ Gly)_n$(SEQ ID NO:50)n,其中n是1以上的整数。在一些情况下,接头具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列,不同之处在丝氨酸残基被另一个氨基酸取代。在一些情况下,接头具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的多个拷贝(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10),不同之处在接头各个拷贝中的丝氨酸残基被另一个氨基酸取代。

[0347] 在其他实施方式中,修饰接头肽,使得不存在氨基酸序列GSG(其出现在传统的Gly/Ser接头肽重复序列的连接处)。例如,肽接头包含选自以下的氨基酸序列:$(GGGXX)_nGGGGS$(SEQ ID NO:55)和$GGGGS(XGGGS)_n$(SEQ ID NO:56),其中X是可以掺入序列并且不会得到包含序列GSG的多肽的任何氨基酸,并且n是0至4。在一个实施方式中,接头肽的序列是$(GGGX_1X_2)_nGGGGS$,且X_1是P,且X_2是S,并且n是0至4(SEQ ID NO:57)。在另一个实施方式中,接头肽的序列是$(GGGX_1X_2)_nGGGGS$,且X_1是G,且X_2是Q并且n是0至4(SEQ ID NO:58)。在另一个实施方式中,接头肽的序列是$(GGGX_1X_2)_nGGGGS$,且X_1是G,且X_2是A,并且n是0至4(SEQ ID NO:59)。在又一个实施方式中,接头肽的序列是$GGGGS(XGGGS)_n$,并且X是P并且n是0至4(SEQ ID NO:60)。在一个实施方式中,本发明的接头肽包括氨基酸序列$(GGGGA)_2GGGGS$(SEQ ID NO:61),或由其组成。在另一个实施方式中,接头肽包括氨基酸序列$(GGGGQ)_2GGGGS$(SEQ ID NO:62),或由其组成。在又一个实施方式中,接头肽包括$(GGGPS)_2GGGGS$(SEQ ID NO:63),或由其组成。在又一个实施方式中,接头肽包括$GGGGS(PGGGS)_2$(SEQ ID NO:64),或由其组成。

[0348] 在某些实施方式中,接头是合成化合物接头(化学交联剂)。市售的交联剂的实例包括N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、双琥珀酰亚胺基辛二酸酯(DSS)、双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯(BS3)、二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)(DSP)、二硫代双(磺基琥珀酰亚胺基丙酸酯)(DTSSP)、乙二醇双(琥珀酰亚胺基琥珀酸酯)(EGS)、乙二醇双(磺基琥珀酰亚胺基琥珀酸酯)(磺基EGS)、二琥珀酰亚胺基酒石酸酯(DST)、二磺基琥珀酰亚胺基酒石酸酯(磺基-DST)、双[2-(琥珀酰亚胺基氧羰基氧)乙基]砜(BSOCOES)和双[2-(磺基琥珀酰亚胺基氧羰基氧)乙基]砜(磺基-BSOCOES)。

[0349] 在某些实施方式中,接头是图6所示的接头。

[0350] 合成稳定肽降解决定子嵌合体的方法

[0351] 钉合肽-小分子降解决定子嵌合体的合成

[0352] 可以使用先前报道的方法(Bird等,Methods Enzymol.,446:369-86(2008);Bird等,Curr.Protoc.Chem.Biol.,3(3):99-117(2011),通过以下修改和添加的详细信息来合成、纯化和定量烃-钉合肽:使用已建立的方法(即Fmoc保护的氨基酸,HATU偶联剂)合成该肽,直到完成所需的序列。然后将肽用Grubbs催化剂(第1代)钉合并用哌啶脱除N末端保护。

掺入多原子接头,例如β-丙氨酸或氨基己酸。然后用HCTU偶联沙利度胺-COOH。酰亚胺键对亲核试剂特别敏感,因此掺入后不使用哌啶或肼。然后将多肽用TFA切割1小时,并通过LCMS纯化。

[0353] 钉合肽-肽降解决定子嵌合体的合成

[0354] 嵌合体的钉合肽部分可以如上合成,然后偶联完全保护的肽降解决定子。可以在弱酸切割性树脂(例如Sieber酰胺树脂)上合成完全保护的降解决定子肽,最后的合成步骤是乙醇酸酐与肽N末端反应。1%TFA切割后,将受保护的肽沉淀在乙醚中,溶于乙酸/水,然后冻干。然后将完全保护的降解决定子肽与偶联剂和碱混合,并与结合至树脂的钉合肽N末端反应2小时,然后进行TFA切割和纯化,得到钉合肽-肽降解决定子。

[0355] 钉合肽-钉合肽降解决定子嵌合体的合成

[0356] 可以使用上述建立的方法合成第一钉合肽部分,然后引入接头部分,例如β-丙氨酸或氨基己酸。然后可以使用与第一个钉合肽部分相同的方案合成钉合肽嵌合体的第二半,然后可以使用Grubbs催化剂(第1代)钉合整个嵌合体,然后对N端进行乙酰化。嵌合体随后用TFA切割1小时,并通过LCMS纯化。

[0357] 小分子-钉合肽降解决定子嵌合体的合成

[0358] 可以使用上述建立的方法合成嵌合体的固定肽部分,然后使用Grubbs催化剂(第1代)进行肽钉合,用哌啶对N末端进行脱保护,并引入多原子接头,例如β-丙氨酸或氨基己酸。小分子与钉合肽的偶联可以如上所述进行。

[0359] 可以例如使用以下描述的方法来测定本发明的稳定的(例如,钉合的)肽降解决定子嵌合体的性质和功能活性。

[0360] 钉合肽降解决定子嵌合体与蛋白靶标的结合

[0361] 进行竞争性荧光偏振测定法以监测(1)嵌合体的钉合肽(或分子)部分保留对其蛋白靶标的结合亲和力和(2)降解决定子组分(无论是分子还是肽)保持结合其蛋白靶标亲和力的能力。用于钉合肽和分子降解决定子的示例性荧光偏振方法包括Pitter等Methods Enzymol 446:387-408(2008)和Nowak等Nat Chem Biol 14:706-714(2018)。在使用GFP标记的靶标蛋白底物(例如GFP-BRD4)的细胞降解试验中,同样用于确定钉合肽降解决定子嵌合体穿透完整细胞并与阳性对照分子降解决定子嵌合体(例如dBET6)竞争抑制诱导降解的能力。此类竞争性细胞降解测定的示例性方法可见于Nowak等Nat Chem Biol 14:706-714(2018)。

[0362] 监测由钉合肽降解决定子嵌合体引起的重组蛋白靶向的泛素化

[0363] 为了在体外监测蛋白靶标的泛素化,可以使用商业Mdm2/HDM2泛素连接酶试剂盒(K-200B)。简而言之,嵌合体(10μM)、重组全长MDM2(带有GST标签的1μM)、E1酶(UBE1,50nM)、E2酶(UBE2D3,1μM)、泛素(100μM)、ATP(1mM)和重组靶蛋白(100nM)在1.5mL微管中合并到反应缓冲液中。将混合物在37℃下温育6小时。随后,使用标准蛋白印迹技术测试20μL反应混合物,从而使用针对靶蛋白的抗体可视化由于泛素化引起的向上带移。

[0364] 监测由钉合肽降解决定子嵌合体引起的细胞中天然蛋白降解

[0365] 为了测定细胞内蛋白降解,将癌细胞(例如SJSA-1,SJSA-X,U2OS)在37℃的湿度控制的CO_2平衡的培养箱中在DMEM(Life Technologies,Grand Island,NY)培养基(CM)中传代,培养基含有10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素/链霉素(Pen Strep)。处理前一天,将细胞

传代并以100,000个细胞/mL的密度接种在六孔板中。24小时后,将细胞用钉合肽降解决定子嵌合体(例如,10μM)处理0、2、4和6小时,然后收获并裂解。然后使用标准的蛋白印迹技术测试细胞裂解物,使用针对靶标蛋白的抗体评估蛋白水平,并使用肌动蛋白抗体进行上样对照。

[0366] 监测由钉合肽降解决定子嵌合体诱导的靶蛋白降解对癌细胞活力的影响

[0367] 对于保持与两个蛋白靶标结合、实现细胞摄取并可以接触细胞内的两个靶标以诱导所靶向的蛋白降解的钉合肽降解决定子嵌合体,使用已建立的细胞生存力和凋亡测定法(包括细胞滴度Glo)和半胱天冬酶3/7活化测定法,如所报道那样进行(例如Labelle等,J Clin Invest 122:2018-31(2012);Wachter等,Oncogene,36:2184-2190(2017);Guerra等,Cell Reports 24:3393-3403(2018),评价其对癌细胞的细胞毒性作用。使用例如不能参与其蛋白靶标的点突变肽和/或不表达靶蛋白和/或感兴趣的降解剂蛋白的细胞系进行作用特异性的对照研究。

[0368] 治疗方法

[0369] 本文公开的嵌合体可以促进稳定肽或小分子结合的疾病相关蛋白的降解。在某些情况下,所降解的蛋白是杀手蛋白,例如BAX或BAK(这对于例如在中风、神经退行性疾病和心脏病发作缺氧等应激过程中作为细胞保护剂很有用)。在某些情况下,所降解的蛋白是对细胞有害的蛋白,例如骨髓瘤中的Ig、阿尔茨海默氏病中的淀粉样蛋白、引起疾病的其他蛋白沉积物。在某些情况下,要降解的蛋白是选自由以下组成的组的蛋白:BCL2、/$BCLX_L$、MCL-1、BFL-1、BCL-w、BCL-B、EZH2、HDM2/HDMX、PUMA、SOSKRAS/NRAS/HRAS、MYC、b-连环蛋白、PI3K、PTEN、TSC、AKT、BRCA1/2、EWS-FLI、MLL融合蛋白、受体酪氨酸激酶、HOX同源物、JUN、Cyclin D、Cyclin E、BRAF、CRAF、CDK4、CDK2、HPV-E6/E7、Aurora激酶、MITF、Wnt1、PD-1、BCR和CCR5。在某些情况下,要降解的蛋白是选自由以下组成的组的蛋白:淀粉样蛋白β(阿尔茨海默氏病)、tau蛋白(阿尔茨海默氏病)、α-突触核蛋白(阿尔茨海默氏病)、TDP-43(额颞叶变性)、超氧化物歧化酶(ALS)、Notch3(CADASIL)、FUS(肉瘤,ALS)、淀粉样蛋白A、Ig重链和轻链和GFAP(亚历山大病)。

[0370] 本公开的特征在于使用本文所述的任何稳定肽或嵌合体预防和/或治疗癌症、自身免疫性疾病或炎性疾病的方法。如本文所用,术语“治疗”是指减轻、抑制或改善受试者正在遭受的疾病或病状。

[0371] 本文所述的肽或嵌合体可用于治疗患有癌症的人类受试者。本文所述的肽或嵌合体也可用于治疗患有黑素瘤、白血病、淋巴瘤或其他血液系统恶性肿瘤或实体瘤的人。在某些情况下,实体瘤是黑色素瘤、乳腺癌或肺癌。在一些实施方式中,本文所述的肽或嵌合体可用于治疗患有自身免疫性疾病或以细胞过量疾病为特征的其他炎性病症的人类受试者。在某些情况下,自身免疫性疾病是自身免疫性结肠炎、甲状腺炎、关节炎、肾炎、皮炎、血管炎、系统性红斑狼疮、糖尿病或干燥综合征。在某些情况下,炎性疾病是哮喘、牛皮癣、炎性结肠炎、甲状腺炎、关节炎、肾炎、皮炎或血管炎。

[0372] 例如,在要修饰内源蛋白(例如,致癌蛋白如MDM2)包括降解决定子的情况下,可以使用任何基因编辑技术(参见,例如,美国专利9,840,713;9,840,702;9,840,699;9,834,791;9,822,372;9,816,080;9,790,490;9,783,490;9,771,601;9,758,775;9,738,908;9,616,090;9,574,211,所有这些均通过引用整体并入本文)。新引入的降解决定子的存在应

导致蛋白的降解。

[0373] 通常,方法包括选择受试者并向受试者施用有效量的一种或多种本文的肽,例如,在药物组合物中或作为药物组合物,以及根据预防或治疗癌症如黑色素瘤或淋巴瘤的需要可选地重复施用,并且可以口服、静脉内或局部施用。可以基于例如确定受试者患有表达该钉合肽靶向的蛋白(例如,MCL-1、BFL-1)的癌症来选择该受试者进行治疗。

[0374] 任何特定患者的具体剂量和治疗方案将取决于多种因素,包括所用特定化合物的活性、年龄、体重、总体健康状况、性别、饮食、施用时间、排泄率、药物组合、疾病、病状或症状的严重程度和病程、患者对疾病、病状或症状的倾向、以及治疗医师的判断。

[0375] 有效量可以在一次或多次施用、应用或剂量中施用。治疗化合物的治疗有效量(即有效剂量)取决于所选择的治疗化合物。所述组合物可以每天一次或多次施用至每周一次或多次施用;包括隔天一次。技术人员将理解,某些因素可影响有效治疗受试者所需的剂量和时间,包括但不限于疾病或病症的严重性、先前的治疗、受试者的总体健康和/或年龄、以及存在的其他疾病。此外,用治疗有效量的本文所述的治疗化合物对受试者的治疗可包括单一治疗或一系列治疗。例如,有效量可以施用至少一次。

[0376] 药物组合物

[0377] 可以配制本文所述的任何稳定肽或嵌合体中的一种或多种,以用作或用于药物组合物中。可以将这些组合物配制成制剂或使其适于通过任何途径(例如,由食品和药物管理局(FDA)批准的任何途径)施用于受试者。示例性方法在FDA的CDER数据标准手册,版本号004(可从fda.give/cder/dsm/DRG/drg00301.htm获得)中进行了描述。例如,组合物可以被配制成或适于通过吸入(例如,口和/或鼻吸入(例如,通过喷雾器或喷雾剂))、注射(例如,静脉内、动脉内、皮下、腹膜内、肌内和/或皮下);和/或用于口服施用、经粘膜施用和/或局部施用(包括局部(例如鼻腔)喷雾剂和/或溶液)。

[0378] 在某些情况下,药物组合物可以包含有效量的一种或多种稳定肽。如本文所用,术语“有效量”和“治疗有效”是指在一段时间内(包括急性或慢性施用以及周期性或连续性施用)使用的本文所述的一种或多种化合物或药物组合物的量或浓度,在其施用范围内有效引起预期的效果或生理结果(例如感染的治疗)。

[0379] 本发明的药物组合物可以包含一种或多种肽和任何药学上可接受的载体和/或载剂。在某些情况下,药物可进一步包含一种或多种另外的治疗剂,其量有效地实现对疾病或疾病症状的调节。

[0380] 术语“药学上可接受的载体或佐剂”是指可以与本发明的化合物一起施用于患者并且不破坏其药理活性的载体或佐剂,并且当以足以递送治疗量的化合物的剂量施用时是无毒的。

[0381] 可用于本发明的药物组合物中的药学上可接受的载体、佐剂和载剂包括但不限于:离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂;自乳化药物递送系统(SEDDS),例如d-α-生育酚聚乙二醇1000琥珀酸酯;用于药物剂型的表面活性剂,例如吐温或其他类似的聚合物递送基质;血清蛋白,例如人血清白蛋白;缓冲物质,例如磷酸盐;甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物、水、盐或电解质,例如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素基物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂。环糊

精如α-、β-和γ-环糊精也可有利地用于增强本文所述的式的化合物的递送。

[0382] 本发明的药物组合物可以包含任何常规的无毒的药学上可接受的载体、佐剂或载剂。在某些情况下,可以用药学上可接受的酸、碱或缓冲剂调节制剂的pH,以增强配制的化合物或其递送形式的稳定性。本文所用的术语肠胃外包括皮下、皮内、静脉内、肌肉内、关节内、动脉内、滑膜内、胸骨内、鞘内、病灶内和颅内注射或输液技术。

[0383] 药物组合物可以是用于吸入和/或经鼻施用的溶液或粉末形式。可以根据本领域已知的技术,使用合适的分散剂或湿润剂(例如吐温80)和助悬剂来配制这样的组合物。无菌注射制剂也可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌注射溶液或悬浮液,例如在1,3-丁二醇中的溶液。可以使用的可接受的载剂和溶剂中有甘露醇、水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。另外,无菌的不挥发油通常用作溶剂或悬浮介质。为此,可以使用任何温和的不挥发性油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。脂肪酸,例如油酸及其甘油酯衍生物可用于制备注射剂,如天然药学上可接受的油,例如橄榄油或蓖麻油,尤其是其聚氧乙烯化形式。这些油溶液或悬浮液还可以含有长链醇稀释剂或分散剂,或羧甲基纤维素或类似的分散剂,它们通常用于配制药学上可接受的剂型,例如乳剂和/或悬浮液。为了配制的目的,也可以使用其他通常使用的表面活性剂,例如吐温(Tween)或司盘(Span)和/或其他类似的乳化剂或生物利用度增强剂,其通常用于制造药学上可接受的固体、液体或其他剂型。

[0384] 药物组合物可以以任何口服可接受的剂型口服施用,包括但不限于胶囊剂、片剂、乳剂和水悬浮液、分散液和溶液。就口服片剂而言,常用的载体包括乳糖和玉米淀粉。通常还添加润滑剂,例如硬脂酸镁。对于胶囊形式的口服施用,有用的稀释剂包括乳糖和干燥的玉米淀粉。当口服水悬浮液和/或乳剂时,可以将活性成分悬浮或溶解在油相中,并与乳化剂和/或悬浮剂混合。如果需要,可以添加某些甜味剂和/或调味剂和/或着色剂。

[0385] 作为另选或除此以外,药物组合物可以通过鼻喷雾或吸入施用。此类组合物是根据药物制剂领域中众所周知的技术制备的,并且可以制备成盐水中的溶液,使用苯甲醇或其他合适的防腐剂、增强生物利用度的吸收促进剂、碳氟化合物和/或本领域已知的其他增溶剂或分散剂制备。

[0386] 在一些情况下,本文公开的一种或多种肽可以与例如载体蛋白缀合。这样的缀合组合物可以是单价或多价的。例如,缀合的组合物可以包括缀合至载体蛋白的本文公开的一种肽。作为另选,缀合的组合物可以包括与载体缀合的本文公开的两种或更多种肽。

[0387] 如本文所用,当两个实体彼此“缀合”时,它们通过直接或间接的共价或非共价相互作用连接。在某些实施方式中,缔合是共价的。在其他实施方式中,缔合是非共价的。非共价相互作用包括氢键、范德华相互作用、疏水相互作用、磁相互作用、静电相互作用等。间接共价相互作用是当两个实体共价连接时,任选地通过接头基团连接。

[0388] 载体蛋白可包括增加或增强受试者免疫原性的任何蛋白。示例性载体蛋白在本领域中有描述(例如,见Fattom等,Infect.Immun.,58:2309-2312,1990;Devi等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:7175-7179,1991;Li等,Infect.Immun.57:3823-3827,1989;Szu等,Infect.Immun.59:4555-4561,1991;Szu等,J.Exp.Med.166:1510-1524,1987;和Szu等,Infect.Immun.62:4440-4444,1994)。聚合物载体可以是包含一个或多个伯和/或仲氨基、叠氮基或羧基的天然或合成材料。载体可以是水溶性的。

[0389] 实施例

[0390] 提供以下实施例以更好地说明所要求保护的发明,并且不应将其解释为限制本发明的范围。就提及特定材料的程度而言,其仅出于说明的目的,并不旨在限制本发明。本领域技术人员在无需实践发明能力的情况下就可以开发等同的手段或反应物,并且不脱离本发明的范围。

[0391] 实施例1:钉合肽降解决定子嵌合体的合成

[0392] 生成了一系列钉合肽降解决定子嵌合体,包括:(i)钉合肽-小分子降解决定子嵌合体,(ii)钉合肽-肽降解决定子嵌合体,(iii)钉合肽-钉合肽降解决定子嵌合体,和(iv)小分子-钉合肽降解决定子嵌合体。下文描述了产生这些类别的钉合肽降解决定子嵌合体中的每一种的方法。图26-29展示了设计这些嵌合体的钉合肽部分的方法的多样性。嵌合体的示例性成分示于图1-7、15-16、21、23。

[0393] 钉合肽-小分子降解决定子嵌合体的合成

[0394] 使用先前报道的方法(Bird等,Methods Enzymol.,446:369-86(2008);Bird等,Curr.Protoc.Chem.Biol.,3(3):99-117(2011),通过以下修改和添加的详细信息合成、纯化和定量烃-钉合肽:使用已建立的方法(即Fmoc保护的氨基酸,HATU偶联剂)合成肽,直到完成所需序列为止。然后使用Grubbs催化剂(第1代)钉合肽,并使用哌啶对N末端脱保护。引入多原子接头,例如β-丙氨酸或氨基己酸(另请参见图6的接头)。然后使用HCTU将沙利度胺-COOH偶联。酰亚胺键对亲核试剂特别敏感;因此,掺入后不使用哌啶或肼。然后将肽用TFA切割1小时,并通过LCMS纯化。

[0395] 钉合肽-肽降解决定子嵌合体的合成

[0396] 如上所述(即,对于钉合肽-小分子降解决定子所述),合成钉合肽-肽降解决定子嵌合体的钉合肽部分。然后将钉合肽偶联至完全保护的肽降解决定子。在可经弱酸切割的树脂上,特别是在Sieber酰胺树脂上,合成了完全保护的降解决定子肽,最后的合成步骤是乙醇酸酐与降解决定子肽N末端反应。在1%TFA切割后,将被保护的降解决定子肽在乙醚中沉淀,溶解在乙酸/水中,并冻干。然后将完全保护的降解决定子肽与偶联剂和碱混合,并与树脂结合的钉合肽N末端反应2小时,然后进行TFA切割和纯化,得到钉合肽-肽降解决定子。

[0397] 钉合肽-钉合肽降解决定子嵌合体的合成

[0398] 如上所述(即,对于钉合肽-小分子降解决定子所述),合成钉合肽-钉合肽降解决定子嵌合体的第一钉合肽。然后将接头部分例如β-丙氨酸或氨基己酸引入第一钉合肽。使用与嵌合体的第一钉合肽相同的方案合成嵌合体的第二钉合肽。接下来,使用Grubbs催化剂(第1代)钉合整个嵌合体(即两个钉合肽),然后将N末端乙酰化。然后将嵌合体用TFA切割1小时,并通过LCMS纯化。

[0399] 小分子-钉合肽降解决定子嵌合体的合成

[0400] 如上所述(即,对于钉合肽-小分子降解决定子所述),合成小分子-钉合肽降解决定子嵌合体的钉合肽部分,然后使用Grubbs催化剂(第1代)钉合肽,N-末端用哌啶去保护,并引入多原子接头,例如β-丙氨酸或氨基己酸。

[0401] 产生了包含JQ1作为小分子的小分子-钉合肽降解决定子嵌合体。由于JQ1的羧基(L.Anders等,Nat.Biotechnol.32,92-96(2014))可以耐受化学取代,因此我们将树脂与JQ1酸(11.3mg,0.0281mmol,1当量)和在室温下溶解在DMF(0.28ml,0.1M)中的N-(4-氨基丁基)-2-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1,3-二氧代异吲哚啉-4-基)氧基)乙酰胺三氟乙酸盐

(14.5mg,0.0281mmol,1当量)一起温育。加入DIPEA (14.7微升,0.0843mmol,3当量)和HATU (10.7mg,0.0281mmol,1当量),然后在氮气下反应20小时。然后,将小分子-钉合肽降解决定子嵌合体用TFA切割1小时,并通过LCMS纯化。

[0402] 实施例2:钉合肽降解决定子嵌合体保持靶蛋白结合亲和力并且能够实现细胞摄入以接触其细胞内的天然靶标

[0403] 进行示例性的荧光偏振(FP)结合测定(见Nat Chem Biol.2018Jul;14(7):706-714)以证明一系列并入钉合肽、接头和沙利度胺部分的钉合肽降解决定子嵌合体可以如竞争性FP所监测的,可变地保留与cereblon的结合(图8)。通过使用涉及GFP-BRD4(示例性靶蛋白)表达和dBET6(一种与Cereblon和BRD4结合以诱导BRD4降解的小分子蛋白水解靶向嵌合体("PROTAC"))的细胞试验,我们进一步证明了钉合肽-沙利度胺嵌合体可进入细胞与dBET6竞争Cereblon结合,从而恢复GFP-BRD4(图9)。这些数据表明,钉合肽降解决定子嵌合体可以保留体外靶标蛋白的相互作用,可以进入细胞,并与细胞中的天然蛋白降解剂结合。

[0404] 实施例3:钉合BIM BH3肽螺旋-沙利度胺降解决定子嵌合体对抗细胞凋亡的BCL-2家族蛋白的靶向降解

[0405] 在促凋亡BIM BH3结构域与掺入的降解决定子(例如Lys-降解决定子,图2-4)之后建模的钉合肽螺旋-降解决定子嵌合肽(图1)应用于表达抗凋亡的BCL-2家族蛋白如MCL-1的A375P黑色素瘤细胞,MCL-1可促进癌细胞存活和化学抗性。进行10μM化合物处理,然后通过裂解物的蛋白印迹对细胞MCL-1的水平监测,发现MCL-1蛋白早在2小时的时间点就呈时间依赖性下降(图10)。重要的是,肌动蛋白水平的蛋白印迹对照未见下降。这些数据表明,由降解决定子部分衍生的BIM BH3螺旋靶向MCL-1能够在治疗后数小时内降低癌细胞中MCL-1蛋白的水平。

[0406] 实施例4:钉合p53肽螺旋-沙利度胺降解决定子嵌合体对MDM2癌蛋白的靶向降解

[0407] 在将p53的反式激活结构域螺旋(ATSP-7041)与沙利度胺降解决定子偶联后建模的钉合肽降解决定子嵌合体应用于培养的癌细胞(SJSA-1,SJSA-X),并通过蛋白质印记监测MDM2蛋白水平,并与单独用ATSP-7041处理的细胞进行比较。重复该实验,并通过Cell Titer Glo测定法测量细胞活力。数据表明,与单独用ATSP-7041处理的细胞相比,在用与ATSP-7041偶联的沙利度胺降解决定子处理的细胞中MDM2水平降低了(图11)。另外,每个钉合肽降解决定子嵌合体均以剂量响应方式损害癌细胞的生存力(图12)。接头的组成影响生物活性的存在(图12,左)或不存在(图12,右)。

[0408] 实施例5:Cop1-介导的蛋白降解

[0409] 一级降解决定子定义为包含特定序列模式的肽基序,该序列模式可通过同源泛素E3连接酶识别。一级降解决定子通常是结构无序的蛋白区域内的短而线性的基序(Guharoy,M.等,Nat Commun.,7:10239,doi:10.1038/ncomms10239(2016))。由E3连接酶Cop1识别的蛋白Trib1的一级降解决定子序列是氨基酸序列DQIVPEY(SEQ ID NO:25)。在蛋白Trib1的环境下,序列DQIVPEY(SEQ ID NO:25)赋予与Cop1结合的Trib1,使得Trib1充当底物衔接子,并且与Trib1结合的蛋白被靶向降解(Uljon,S.等,Structure,doi:10.1016/j.str.2016.03.002(2016))。序列DQIVPEY(SEQ ID NO:25)对Cop1的报道的结合亲和力为250±40nM。

[0410] 我们发现序列DQIVPEY(SEQ ID NO:25)及其保留与Cop1的结合亲和力的衍生物可

以用作引起细胞蛋白的Cop1介导降解的可移植的降解决定子序列,导致如下所述的治疗益处。

[0411] (1)直接遗传修饰:用序列DQIVPEY(SEQ ID NO:25)的衍生物替换结构无序区中的天然蛋白残基导致嵌合体蛋白被Cop1降解。例如,在表达Cop1的人胚胎肾293T细胞中外源表达时,用Trib1衍生的序列DQIVPD(SEQ ID NO:30)替换蛋白HDM2的p60亚型的C端序列GFDVPD(SEQ ID NO:26)导致突变蛋白的Cop1介导降解(图13)。在293T细胞中进行的免疫共沉淀研究表明,在特定的降解决定子序列并入后降解(图13)与Cop1与相应的Myc标记的MDM2 p60突变体构建体(例如DQIVPD(SEQ ID NO:30))之间的直接结合之间存在相关性(图14)。

[0412] (2)肽配体靶向:序列DQIVPEY(SEQ ID NO:25)的衍生物与蛋白靶向性钉合肽的缀合可以靶向钉合肽的结合伴侣以进行Cop1介导的降解。这些缀合物的设计与图1中概述的相同,不同之处在于小分子沙利度胺被肽序列DQIVPEY(SEQ ID NO:25)的衍生物替代,并通过肽接头实现缀合(图15)。

[0413] 实施例6:钉合p53肽螺旋-Trib降解决定子嵌合体对MDM2癌蛋白的靶向降解

[0414] 在将p53的反式激活结构域螺旋(ATSP-7041)与结合Cop1的Trib序列建模后的肽降解决定子缀合后建模的钉合肽降解决定子嵌合体应用于培养的癌细胞(SJSA-1,SJSA-X),并通过蛋白质印记监测MDM2蛋白水平,并与单独用ATSP-7041处理的细胞进行比较。重复该实验,并通过Cell Titer Glo测定法测量细胞活力。数据表明,与仅用ATSP-7041处理的细胞相比,在用与ATSP-7041偶联的Trib降解决定子处理的细胞中,MDM2水平更低(图17)。另外,每个钉合肽降解决定子嵌合体均以剂量响应方式损害癌细胞的生存力(图18)。

[0415] 实施例7:钉合p53肽螺旋-VHL降解决定子嵌合体对MDM2癌蛋白的靶向降解

[0416] 在将p53的反式激活结构域螺旋(ATSP-7041)与结合VHL的小分子降解决定子偶联后建模的钉合肽降解决定子嵌合体应用于培养的癌细胞(SJSA-1,SJSA-X),并通过蛋白质印记监测MDM2蛋白水平,并与单独用ATSP-7041处理的细胞进行比较。重复该实验,并通过Cell Titer Glo测定法测量细胞活力。数据表明,与单独用ATSP-7041处理的细胞相比,在用与ATSP-7041偶联的VHL降解决定子处理的细胞中MDM2水平更低(图19)。另外,每个钉合肽降解决定子嵌合体均以剂量响应方式损害癌细胞的生存力(图20)。

[0417] 实施例8:选择性钉合BH3肽螺旋-钉合p53肽降解决定子嵌合体对MCL-1癌蛋白的靶向降解

[0418] 在选择性靶向MCL-1的MCL-1BH3螺旋之后建模的钉合肽降解决定子嵌合体(图21)与p53的反式激活结构域螺旋后建模的钉合肽降解决定子缀合,目标是募集MDM2至MCL-1,以诱导非规范MDM2-介导的泛素化和MCL-1的降解。使用体外泛素化测定(如下所述),我们观察到钉合肽降解决定子嵌合体添加到重组MCL-1、重组MDM2、E1酶、E2酶(UBE2D3)和ATP诱导MCL-1的泛素化(图22)。这些结果表明,仅在钉合肽降解决定子嵌合体存在下,MDM2才成功募集到MCL-1,从而导致泛素通过泛素化机制转移至MCL-1。

[0419] 实施例9:选择性小分子BRD4抑制剂-钉合p53肽降解决定子嵌合体对BRD4癌蛋白的靶向降解

[0420] 有效靶向BRD4的小分子与在p53的反式激活结构域螺旋后建模的钉合肽降解决定子偶联(图23),目标是将MDM2募集到BRD4,以诱导非规范的MDM2-介导的BRD4泛素化和降

解。以上述类似的方式(参见实施例8)评估重组MCL-1蛋白的诱导泛素化,我们利用体外试验来测试我们的钉合肽降解决定子嵌合体是否可以募集MDM2来泛素化重组BRD4蛋白(例如,部分:氨基酸342-460或氨基酸49-170)。钉合肽降解决定子嵌合体的添加诱导了每种重组BRD4蛋白的上移,表明MDM2将泛素转移至靶标BRD4蛋白(图24)。为了评估对癌细胞中天然BRD4水平的影响,我们以10μM的剂量钉合肽降解决定子嵌合体处理U2OS癌细胞系,并观察到天然BRD4的时间响应性降解,这反映为BRD4蛋白水平随时间(例如0到6个小时)的逐渐降低(图25)。这些数据表明,我们的钉合肽降解决定子嵌合体可以有效地将MDM2重新用于体外BRD4泛素化,并诱导细胞中天然BRD4降解。

[0421] 材料和方法

[0422] 监测钉合肽降解决定子嵌合体诱导的重组蛋白靶标的泛素化

[0423] 为了监测体外蛋白靶标的泛素化作,采用了商用Mdm2/HDM2泛素连接酶试剂盒(K-200B)。简而言之,包括嵌合体(10μM)、重组全长MDM2(带有GST标签,1μM)、E1酶(UBE1,50nM)、E2酶(UBE2D3,1μM)、泛素(100μM)、ATP(1mM)和重组靶蛋白(100nM)在1.5mL微管中的反应缓冲液中合并。将混合物在37℃下温育6小时。随后,使用标准蛋白印迹技术测试20μL反应混合物,从而使用针对靶蛋白的抗体来可视化由于泛素化引起的向上带移。

[0424] 监测钉合肽降解决定子嵌合体诱导的细胞内天然蛋白降解

[0425] 为了测定细胞内蛋白降解,癌细胞(例如SJSA-1、SJSA-X、U2OS)在37℃的湿度控制的CO_2平衡的培养箱中在DMEM(Life Technologies,Grand Island,NY)培养基(CM)中传代,培养基含有10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素/链霉素(Pen Strep)。处理前一天,将细胞传代并以100,000个细胞/mL的密度接种在六孔板中。24小时后,将细胞用钉合肽降解决定子嵌合体(例如,10μM)处理0、2、4和6小时,然后收获并裂解。然后使用标准的蛋白印迹技术测试细胞裂解物,使用针对靶标蛋白的抗体评估蛋白水平,并使用肌动蛋白抗体进行上样对照。

[0426] 其他实施方式

[0427] 尽管已经结合本发明的详细描述描述了本发明,但是前述描述旨在说明而不是限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求的范围限定。其他方面、优点和修改在所附权利要求的范围内。

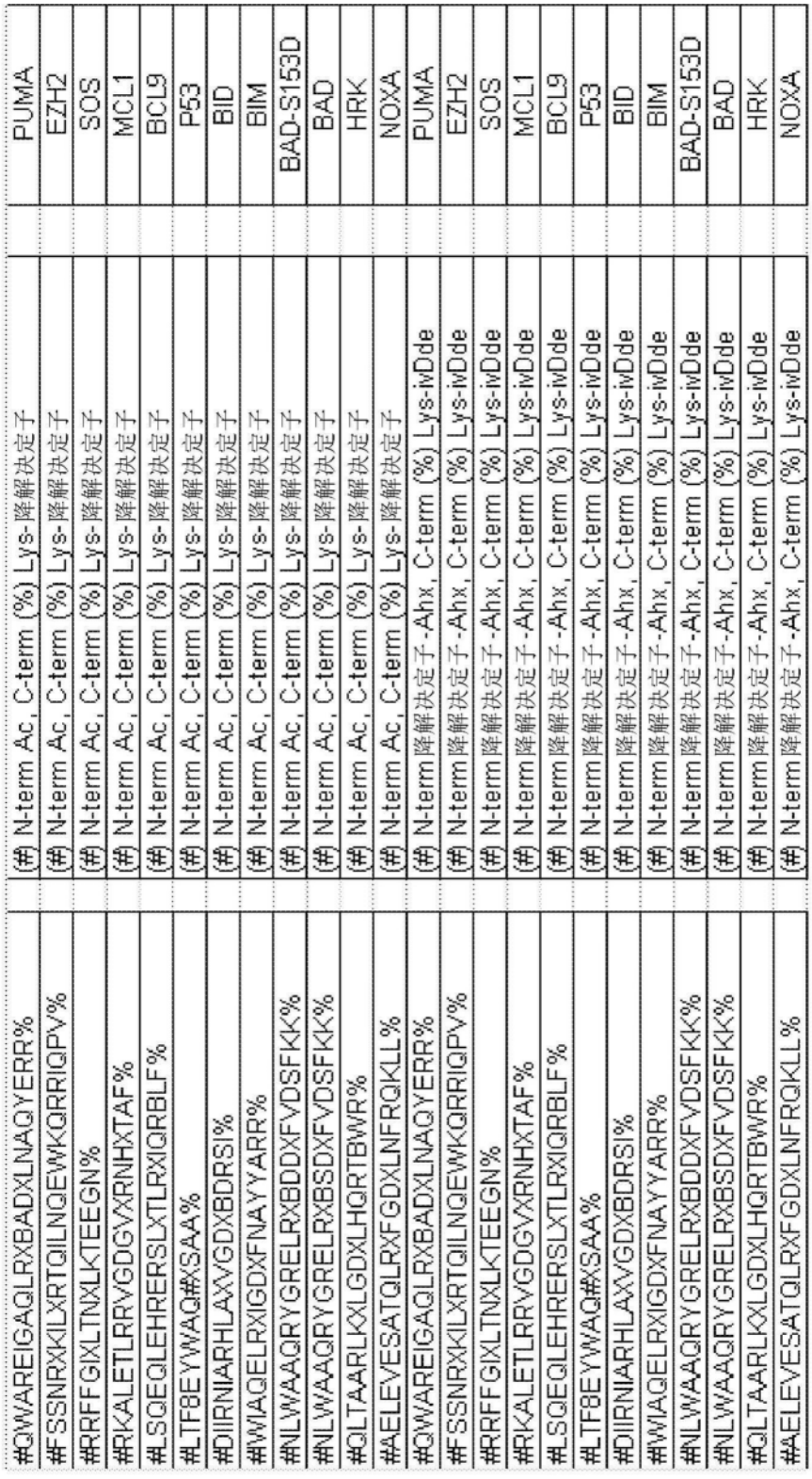
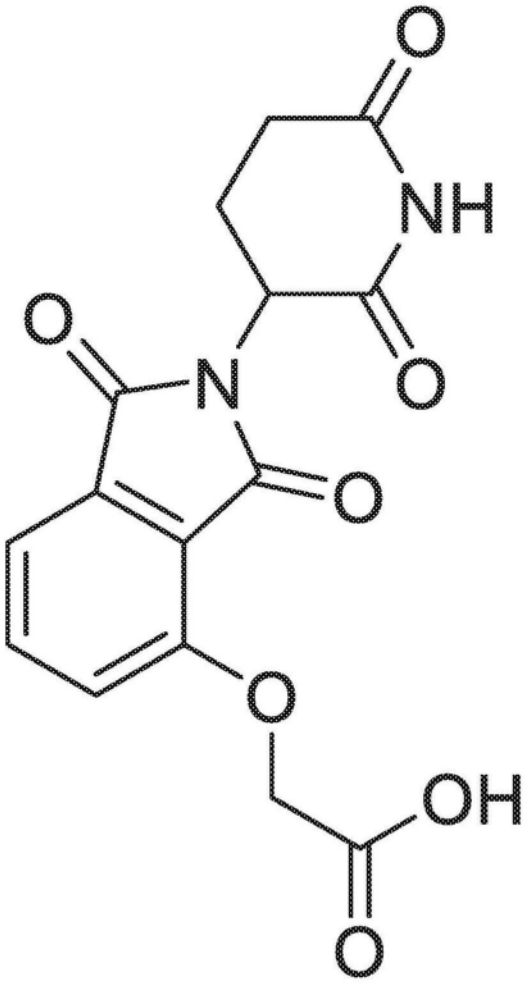
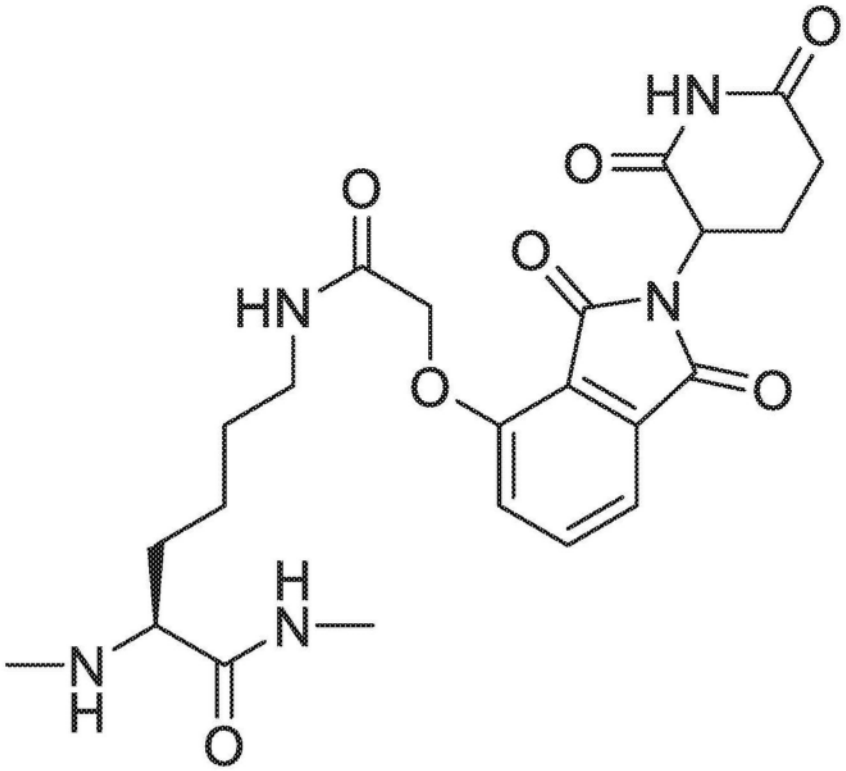

#QWAREIGAQLRXBADXLNAQYERR%
(#) N-term Ac, C-term (%) Lys- 降解决定子
PUMA
#FSSNRXKILXRTQILNQEWKQRRIQPV%
(#) N-term Ac, C-term (%) Lys- 降解决定子
EZH2
#RRFFGIXLTNXLKTEEGN%
(#) N-term Ac, C-term (%) Lys- 降解决定子
SOS
#RKALETLRRVGDGVXRNHXTAF%
(#) N-term Ac, C-term (%) Lys- 降解决定子
MCL1
#LSQEQLEHRERSLXTLRXIQRBLF%
(#) N-term Ac, C-term (%) Lys- 降解决定子
BCL9
#LTF8EYWAQ#XSAA%
(#) N-term Ac, C-term (%) Lys- 降解决定子
P53
#DIIRNIARHLAXVGDXBDRSI%
(#) N-term Ac, C-term (%) Lys- 降解决定子
BID
#WIAQELRXIGDXFNAYYARR%
(#) N-term Ac, C-term (%) Lys- 降解决定子
BIM
#NLWAAQRYGRELRXBDDXFVDSFKK%
(#) N-term Ac, C-term (%) Lys- 降解决定子
BAD-S153D
#NLWAAQRYGRELRXBSDXFVDSFKK%
(#) N-term Ac, C-term (%) Lys- 降解决定子
BAD
#QLTAARLKXLGDXLHQRTBWR%
(#) N-term Ac, C-term (%) Lys- 降解决定子
HRK
#AELEVESATQLRXFGDXLNFRQKLL%
(#) N-term Ac, C-term (%) Lys- 降解决定子
NOXA
#QWAREIGAQLRXBADXLNAQYERR%
(#) N-term 降解决定子-Ahx, C-term (%) Lys-ivDde
PUMA
#FSSNRXKILXRTQILNQEWKQRRIQPV%
(#) N-term 降解决定子-Ahx, C-term (%) Lys-ivDde
EZH2
#RRFFGIXLTNXLKTEEGN%
(#) N-term 降解决定子-Ahx, C-term (%) Lys-ivDde
SOS
#RKALETLRRVGDGVXRNHXTAF%
(#) N-term 降解决定子-Ahx, C-term (%) Lys-ivDde
MCL1
#LSQEQLEHRERSLXTLRXIQRBLF%
(#) N-term 降解决定子-Ahx, C-term (%) Lys-ivDde
BCL9
#LTF8EYWAQ#XSAA%
(#) N-term 降解决定子-Ahx, C-term (%) Lys-ivDde
P53
#DIIRNIARHLAXVGDXBDRSI%
(#) N-term 降解决定子-Ahx, C-term (%) Lys-ivDde
BID
#WIAQELRXIGDXFNAYYARR%
(#) N-term 降解决定子-Ahx, C-term (%) Lys-ivDde
BIM
#NLWAAQRYGRELRXBDDXFVDSFKK%
(#) N-term 降解决定子-Ahx, C-term (%) Lys-ivDde
BAD-S153D
#NLWAAQRYGRELRXBSDXFVDSFKK%
(#) N-term 降解决定子-Ahx, C-term (%) Lys-ivDde
BAD
#QLTAARLKXLGDXLHQRTBWR%
(#) N-term 降解决定子-Ahx, C-term (%) Lys-ivDde
HRK
#AELEVESATQLRXFGDXLNFRQKLL%
(#) N-term 降解决定子-Ahx, C-term (%) Lys-ivDde
NOXA

图1



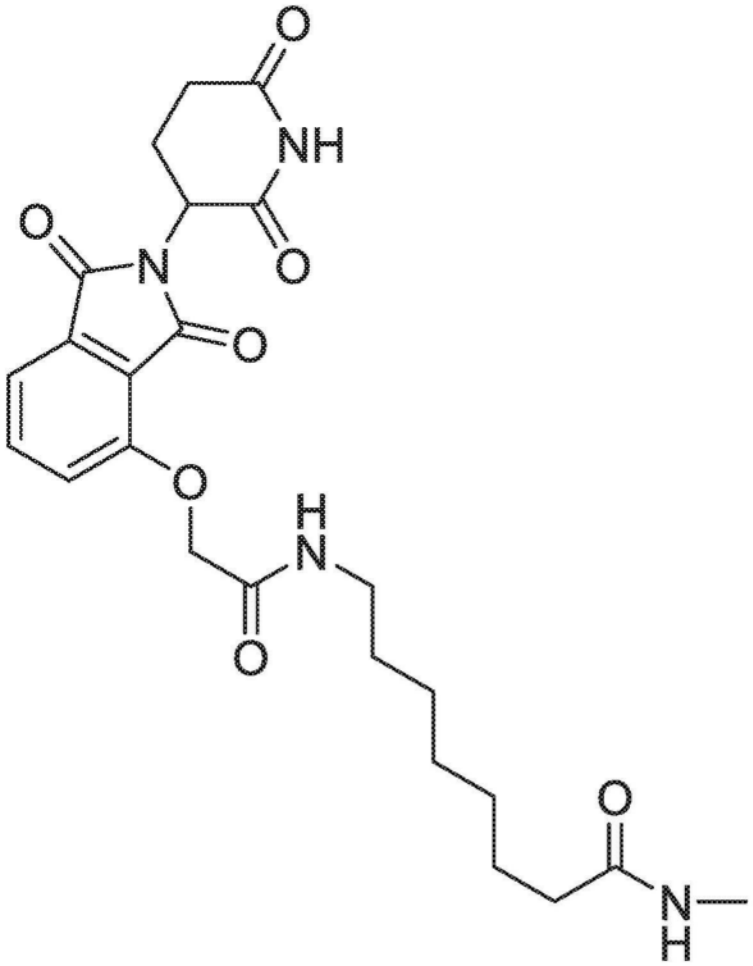
羧基降解决定子氨基酸

图2



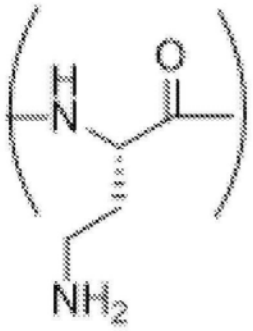
“Lys-降解决定子”

图3

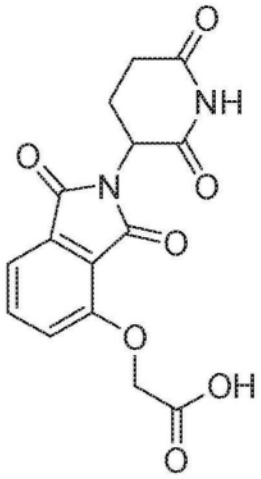


“N-末端 降解决定子 Ahx”

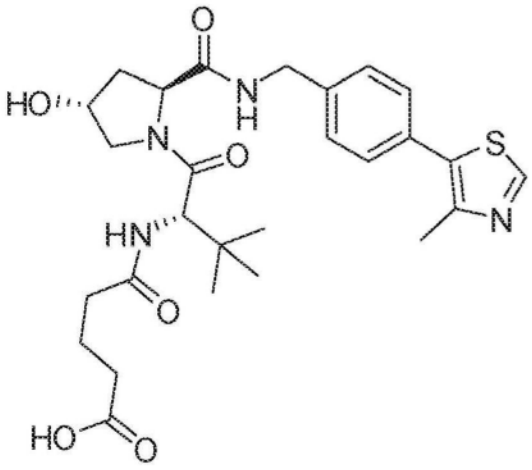
图4



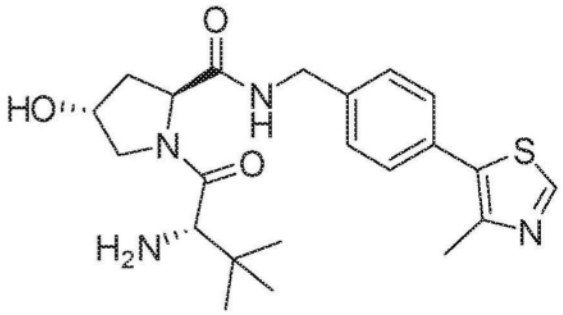
% = 二氨基丁酸



沙利度胺 ("THAL")



VHL-羧酸酯
(用于与胺偶联)



VHL 配体
(用于与酸偶联)

图5

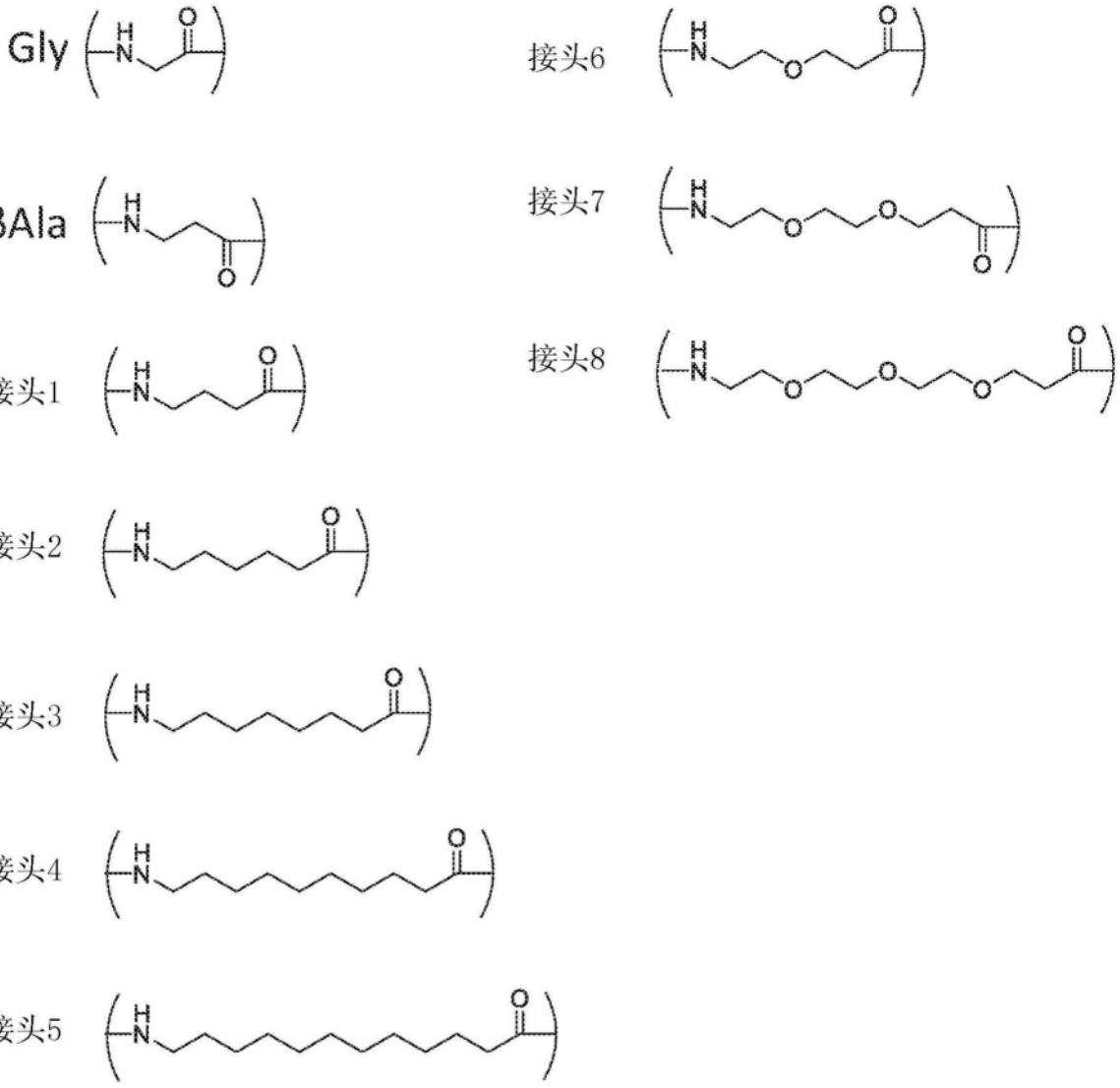
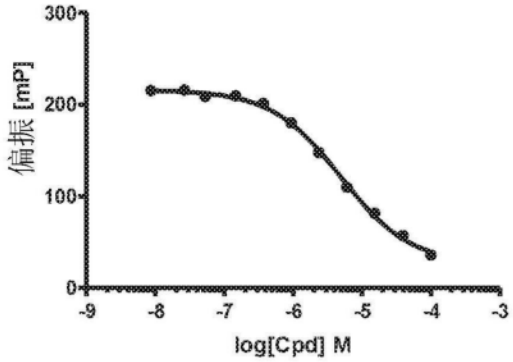


图6

IWIA%ELRXIGDXFNAYYARR (% = DAB + THAL)	%TF8EYWAQLXSAA (% = DAB + THAL)
IWIA%ELRXIGDXFNAYYARR (% = DAB + 接头 -Gly + THAL)	%TF8EYWAQLXSAA (% = DAB + 接头-Gly + THAL)
IWIA%ELRXIGDXFNAYYARR (% = DAB + 接头 -BAla + THAL)	%TF8EYWAQLXSAA (% = DAB + 接头-BAla + THAL)
IWIA%ELRXIGDXFNAYYARR (% = DAB + 接头1 + THAL)	%TF8EYWAQLXSAA (% = DAB + 接头1 + THAL)
IWIA%ELRXIGDXFNAYYARR (% = DAB + 接头2 + THAL)	%TF8EYWAQLXSAA (% = DAB + 接头2 + THAL)
IWIA%ELRXIGDXFNAYYARR (% = DAB + 接头3 + THAL)	%TF8EYWAQLXSAA (% = DAB + 接头3 + THAL)
IWIA%ELRXIGDXFNAYYARR (% = DAB + 接头4 + THAL)	%TF8EYWAQLXSAA (% = DAB + 接头4 + THAL)
IWIA%ELRXIGDXFNAYYARR (% = DAB + 接头5 + THAL)	%TF8EYWAQLXSAA (% = DAB + 接头5 + THAL)
IWIA%ELRXIGDXFNAYYARR (% = DAB + 接头6 + THAL)	%TF8EYWAQLXSAA (% = DAB + 接头6 + THAL)
IWIA%ELRXIGDXFNAYYARR (% = DAB + 接头7 + THAL)	%TF8EYWAQLXSAA (% = DAB + 接头7 + THAL)
IWIA%ELRXIGDXFNAYYARR (% = DAB + 接头8 + THAL)	%TF8EYWAQLXSAA (% = DAB + 接头8 + THAL)
IWIAQELRXIGDXFN%YYARR (% = DAB + THAL)	LTF8%YWAQLXSAA (% = DAB + THAL)
IWIAQELRXIGDXFN%YYARR (% = DAB + 接头 -Gly + THAL)	LTF8%YWAQLXSAA (% = DAB + 接头 -Gly + THAL)
IWIAQELRXIGDXFN%YYARR (% = DAB + 接头 -BAla + THAL)	LTF8%YWAQLXSAA (% = DAB + 接头 -BAla + THAL)
IWIAQELRXIGDXFN%YYARR (% = DAB + 接头1 + THAL)	LTF8%YWAQLXSAA (% = DAB + 接头1 + THAL)
IWIAQELRXIGDXFN%YYARR (% = DAB + 接头2 + THAL)	LTF8%YWAQLXSAA (% = DAB + 接头2 + THAL)
IWIAQELRXIGDXFN%YYARR (% = DAB + 接头3 + THAL)	LTF8%YWAQLXSAA (% = DAB + 接头3 + THAL)
IWIAQELRXIGDXFN%YYARR (% = DAB + 接头4 + THAL)	LTF8%YWAQLXSAA (% = DAB + 接头4 + THAL)
IWIAQELRXIGDXFN%YYARR (% = DAB + 接头5 + THAL)	LTF8%YWAQLXSAA (% = DAB + 接头5 + THAL)
IWIAQELRXIGDXFN%YYARR (% = DAB + 接头6 + THAL)	LTF8%YWAQLXSAA (% = DAB + 接头6 + THAL)
IWIAQELRXIGDXFN%YYARR (% = DAB + 接头7 + THAL)	LTF8%YWAQLXSAA (% = DAB + 接头7 + THAL)
IWIAQELRXIGDXFN%YYARR (% = DAB + 接头8 + THAL)	LTF8%YWAQLXSAA (% = DAB + 接头8 + THAL)
	LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + THAL)
	LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + 接头 -Gly + THAL)
	LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + 接头 -BAla + THAL)
	LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + 接头1 + THAL)
	LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + 接头2 + THAL)
LTF8%YWAQLXSAA (% = DAB + TRIB 羧酸酯)	LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + 接头3 + THAL)
LTF8%YWAQLXSAA (% = DAB + 接头-Gly + TRIB 羧酸酯)	LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + 接头4 + THAL)
LTF8%YWAQLXSAA (% = DAB + 接头-BAla + TRIB 羧酸酯)	LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + 接头5 + THAL)
LTF8%YWAQLXSAA (% = DAB + 接头3 + TRIB 羧酸酯)	LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + 接头6 + THAL)
LTF8%YWAQLXSAA (% = DAB + 接头5 + TRIB 羧酸酯)	LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + 接头7 + THAL)
LTF8%YWAQLXSAA (% = DAB + 接头7 + TRIB 羧酸酯)	LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + 接头8 + THAL)
LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + VHL 羧酸酯)	%TF8EYWAQLXSAA (% = DAB + VHL 羧酸酯)
LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + 接头-Gly + VHL羧酸酯)	%TF8EYWAQLXSAA (% = DAB + 接头-Gly + VHL羧酸酯)
LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + 接头-BAla + VHL 羧酸酯)	%TF8EYWAQLXSAA (% = DAB + 接头-BAla + VHL 羧酸酯)
LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + 接头3 + VHL羧酸酯)	%TF8EYWAQLXSAA (% = DAB + 接头3 + VHL 羧酸酯)
LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + 接头5 + VHL羧酸酯)	%TF8EYWAQLXSAA (% = DAB + 接头5 + VHL 羧酸酯)
LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + 接头7 + VHL羧酸酯)	%TF8EYWAQLXSAA (% = DAB + 接头7 + VHL 羧酸酯)

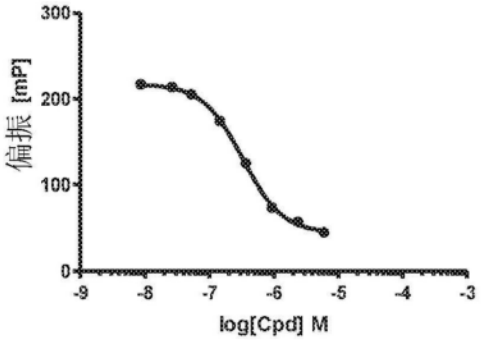
图7

来那度胺

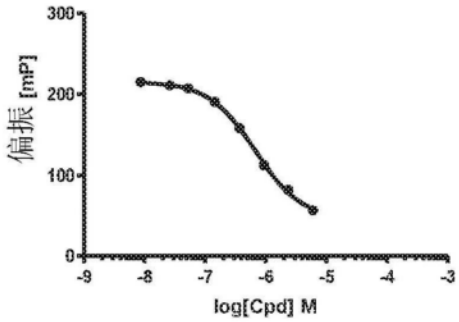


测试条件:
一式两份
100nM CRBN-DDB1dB
10nM 探针
缓冲剂
200mM NaCl, 50mM TRIS pH7.5, 0.1%
普朗尼克, 1mM TCEP, 1% DMSO

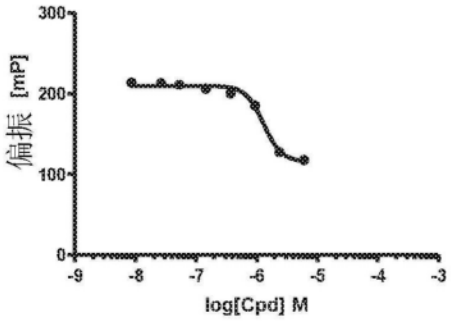
#QLTAARLKXLGDXLHQRTBWR%
[(#) N-末端 Ac, C-末端(%) Lys-降解决定子]



#AELEVESATQLRXFGDXLNFRQKLL%
(#) N-末端 Ac, C-末端(%) Lys-降解决定子



#QLTAARLKXLGDXLHQRTBWR%
(#) N-末端 降解决定子-Ahx, C-末端(%) Lys-ivDde



#RRFFGIXLTNXLKTEEGN%
(#) N-末端 降解决定子-Ahx, C-末端(%) 降解决定子

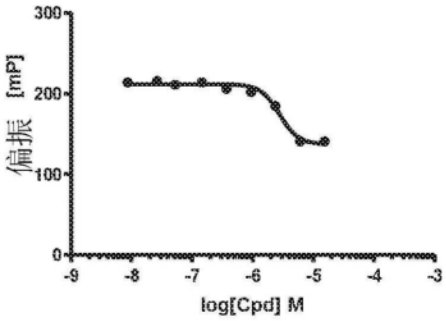


图8

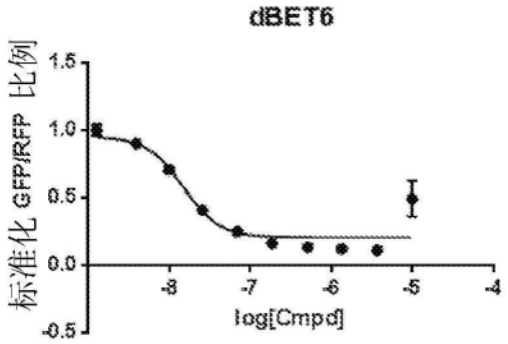

dBET6
标准化 GFP/RFP 比例
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-8
-7
-6
-5
-4
log[Cmpd]

图9A

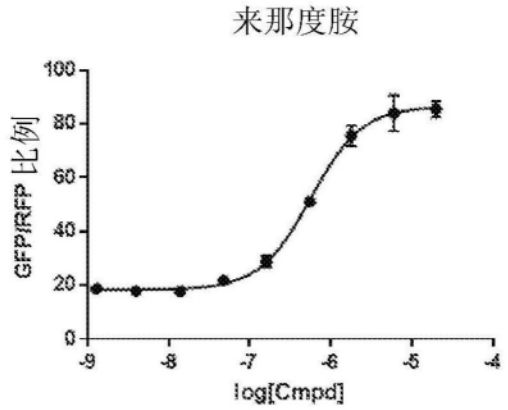

来那度胺
GFP/RFP 比例
100
80
60
40
20
0
-9
-8
-7
-6
-5
-4
log[Cmpd]

图9B

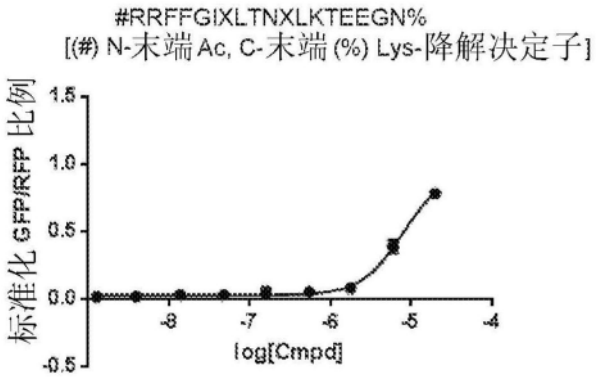

#RRFFGIXLTNXLKTEEGN%
[(#) N-末端Ac, C-末端(%) Lys-降解决定子]
标准化 GFP/RFP 比例
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-8
-7
-6
-5
-4
log[Cmpd]

图9C

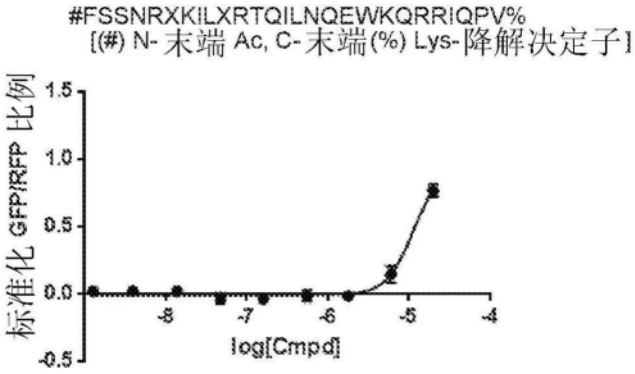

#FSSNRXKILXRTQILNQEWKQRRIQPV%
[(#) N-末端 Ac, C-末端(%) Lys-降解决定子]
标准化 GFP/RFP 比例
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-8
-7
-6
-5
-4
log[Cmpd]

图9D

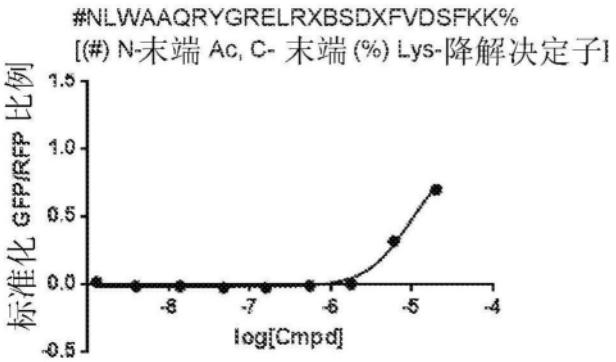

#NLWAAQRYGRELRXBSDXFVDSFKK%
[(#) N-末端 Ac, C- 末端 (%) Lys-降解决定子]
标准化 GFP/RFP 比例
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-8
-7
-6
-5
-4
log[Cmpd]

图9E

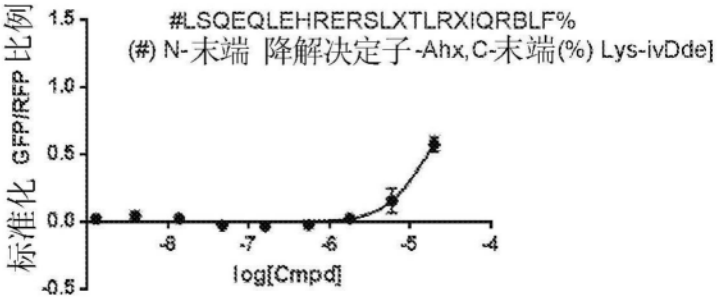

#LSQEQLEHRERSLXTLRXIQRBLF%
(#) N-末端 降解决定子-Ahx,C-末端(%) Lys-ivDde]
标准化 GFP/RFP 比例
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-8
-7
-6
-5
-4
log[Cmpd]

图9F

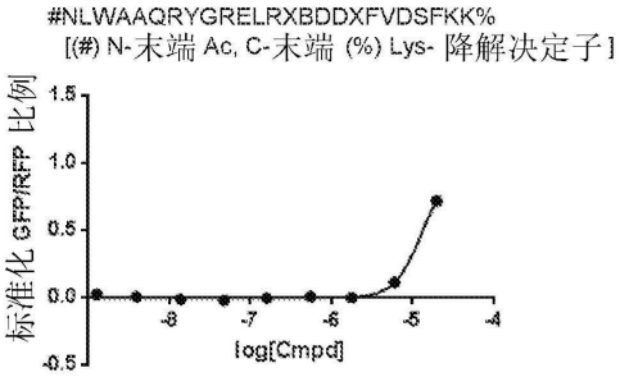

#NLWAAQRYGRELRXBDDXFVDSFKK%
[(#) N-末端 Ac, C-末端 (%) Lys- 降解决定子]
标准化 GFP/RFP 比例
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-8
-7
-6
-5
-4
log[Cmpd]

图9G

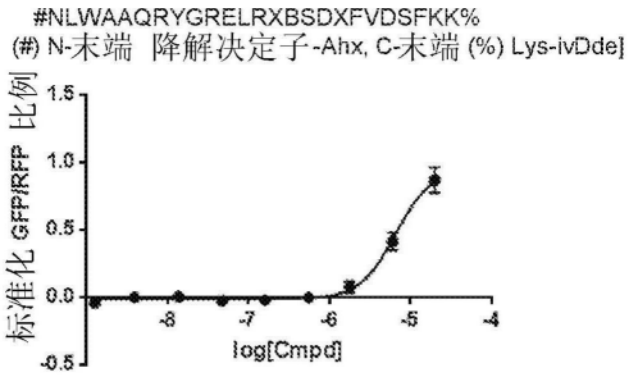

#NLWAAQRYGRELRXBSDXFVDSFKK%
(#) N-末端 降解决定子-Ahx, C-末端 (%) Lys-ivDde]
标准化 GFP/RFP 比例
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-8
-7
-6
-5
-4
log[Cmpd]

图9H

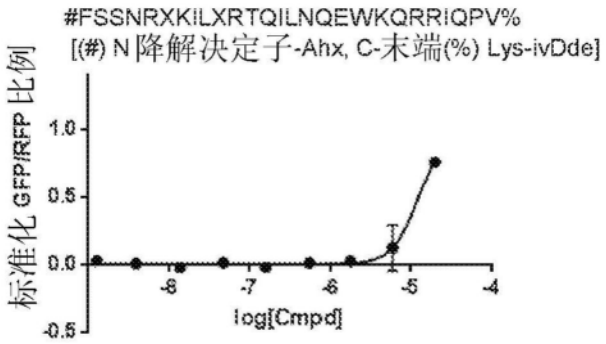

#FSSNRXKILXRTQILNQEWKQRRIQPV%
[(#) N 降解决定子-Ahx, C-末端(%) Lys-ivDde]
标准化 GFP/RFP 比例
1.0
0.5
0.0
-0.5
-8
-7
-6
-5
-4
log[Cmpd]

图9I

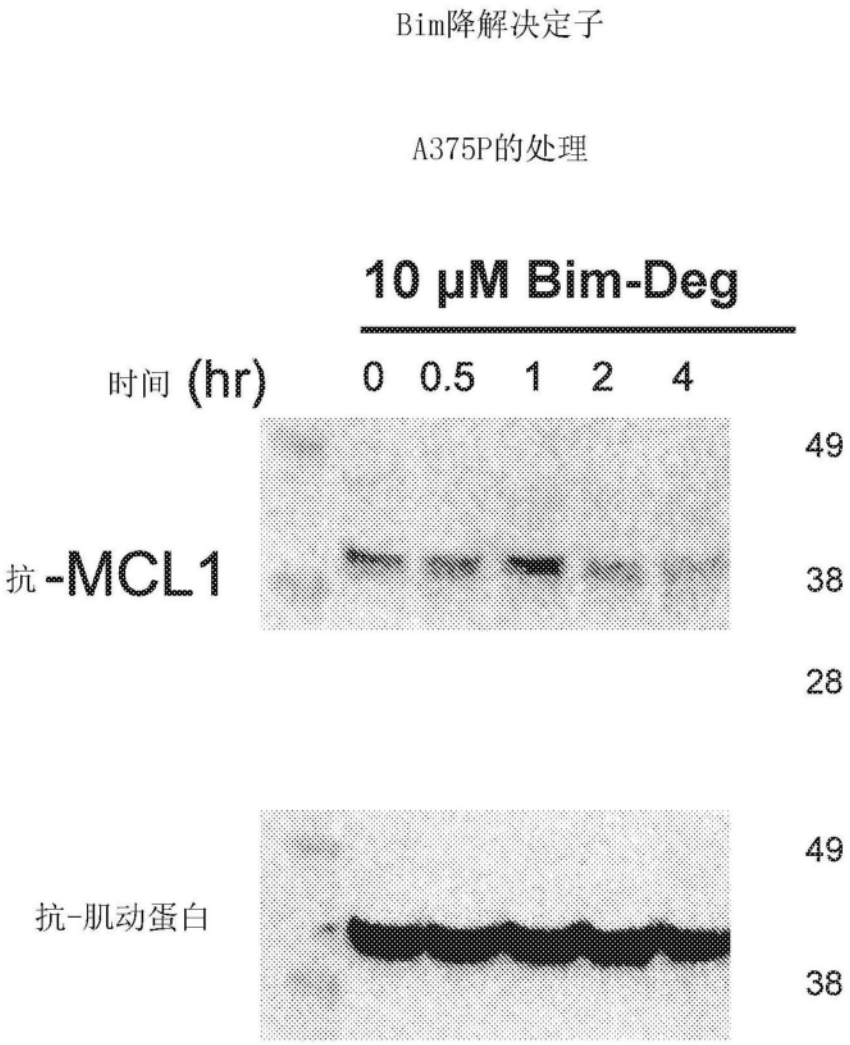
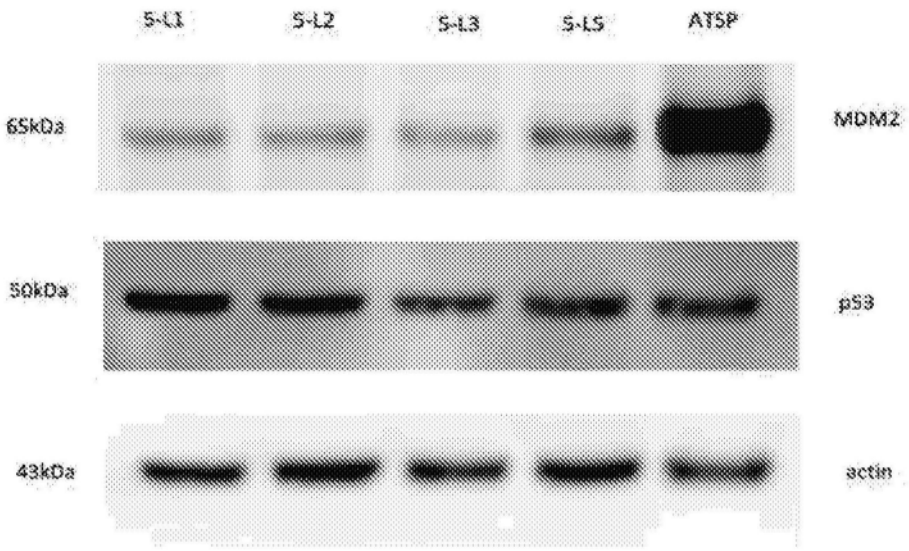

Bim降解决定子
A375P的处理
10 μM Bim-Deg
时间 (hr)
0 0.5 1 2 4
抗-MCL1
49
38
28
抗-肌动蛋白
49
38

图10



5-L1: LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + LINKER1 + THAL)

5-L2: LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + LINKER2 + THAL)

5-L3: LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + LINKER3 + THAL)

5-L5: LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + LINKER5 + THAL)

ATSP-7041:LTF8EYWAQ#XSAA (# = 环丁基丙氨酸)

图11

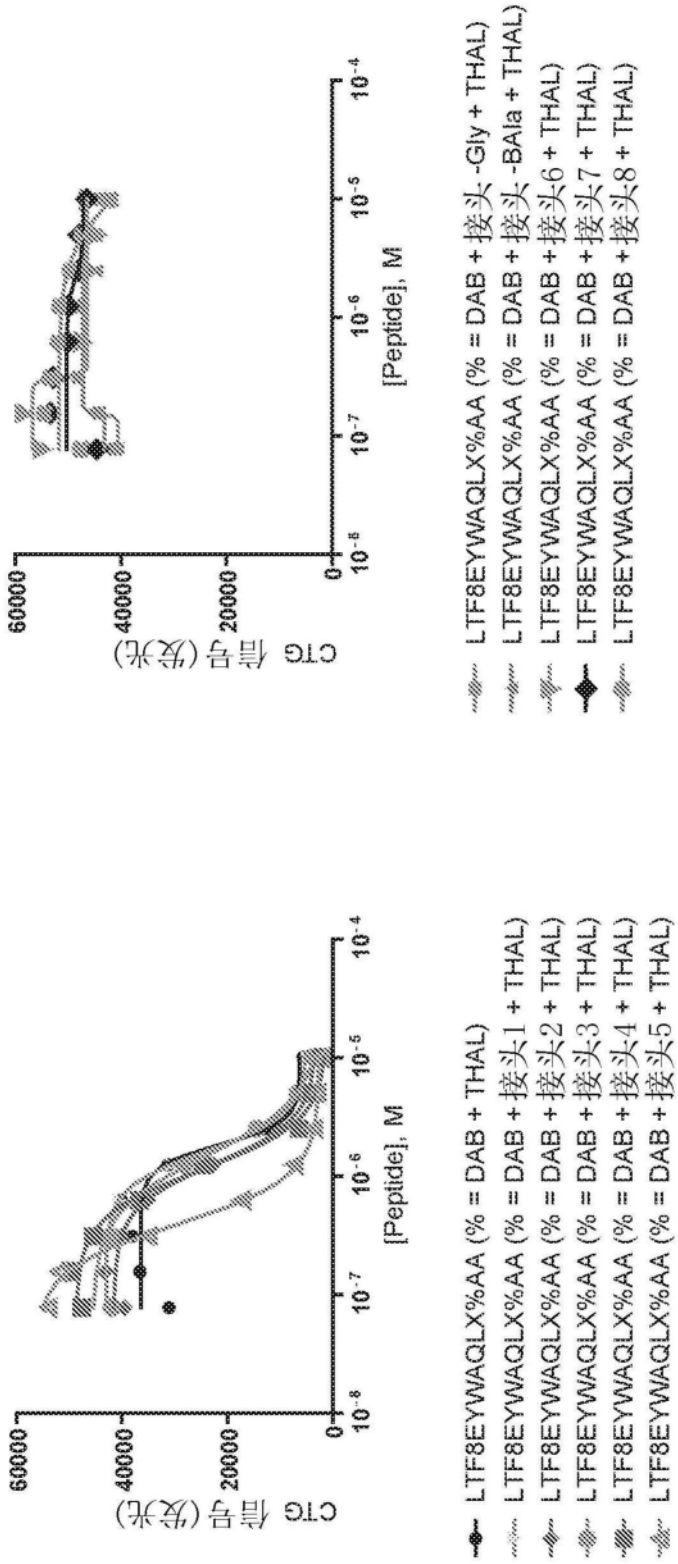

CTG 信号 (发光)
60000
40000
20000
0
10-8
10-7
10-6
10-5
10-4
[Peptide], M
LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + THAL)
LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + 接头1 + THAL)
LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + 接头2 + THAL)
LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + 接头3 + THAL)
LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + 接头4 + THAL)
LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + 接头5 + THAL)
CTG 信号 (发光)
60000
40000
20000
0
10-8
10-7
10-6
10-5
10-4
[Peptide], M
LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + 接头-Gly + THAL)
LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + 接头-BAla + THAL)
LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + 接头6 + THAL)
LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + 接头7 + THAL)
LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + 接头8 + THAL)

图12

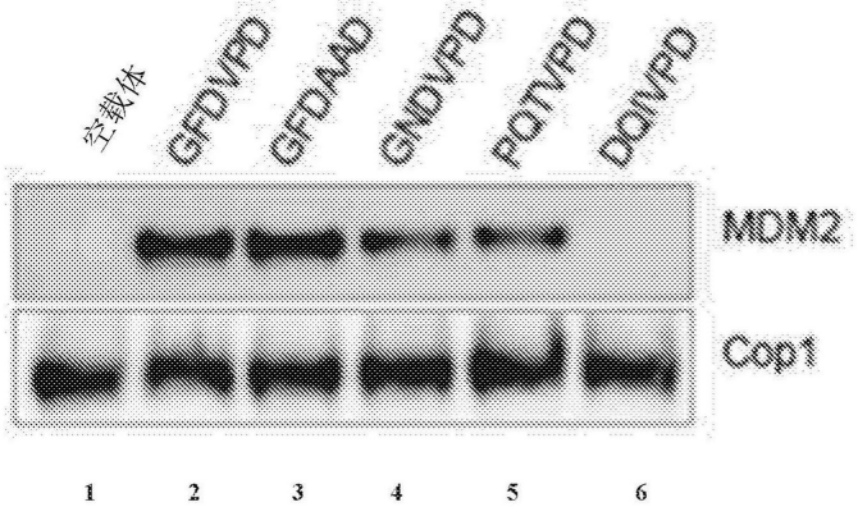

空载体
GFDVPD
GFDAAD
GNDVPD
PQTVPD
DQIVPD
MDM2
Cop1
1
2
3
4
5
6

图13

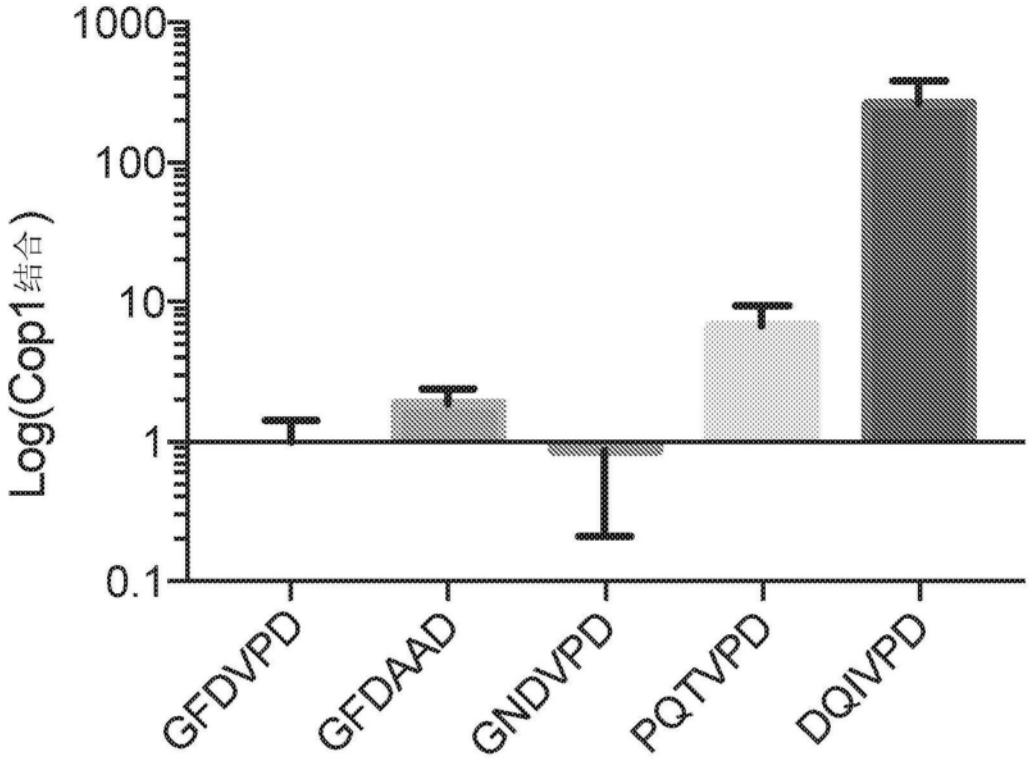

1000
100
10
1
0.1
Log(Cop1结合)
GFDVPD
GFDAAD
GNDVPD
PQTVPD
DQIVPD

图14

LTF**8**EYWAQ*XSAA-Ahx-Ahx-DQIVPEY (**SEQ ID NO:119**)

LTF**8**EYWAQ*XSAA-Ahx-DQIVPEY (**SEQ ID NO:120**)

DQIVPEY-Ahx-Ahx-LTF**8**EYWAQ*XSAA (**SEQ ID NO:121**)

DQIVPEY-Ahx-LTF**8**EYWAQ*XSAA (**SEQ ID NO:122**)

IWIAQELRXIGDXFNAYYARR-Ahx-Ahx-DQIVPEY (**SEQ ID NO:123**)

IWIAQELRXIGDXFNAYYARR-Ahx-DQIVPEY (**SEQ ID NO:124**)

DQIVPEY-Ahx-Ahx-IWIAQELRXIGDXFNAYYARR (**SEQ ID NO:125**)

DQIVPEY-Ahx-IWIAQELRXIGDXFNAYYARR (**SEQ ID NO:126**)

其中：

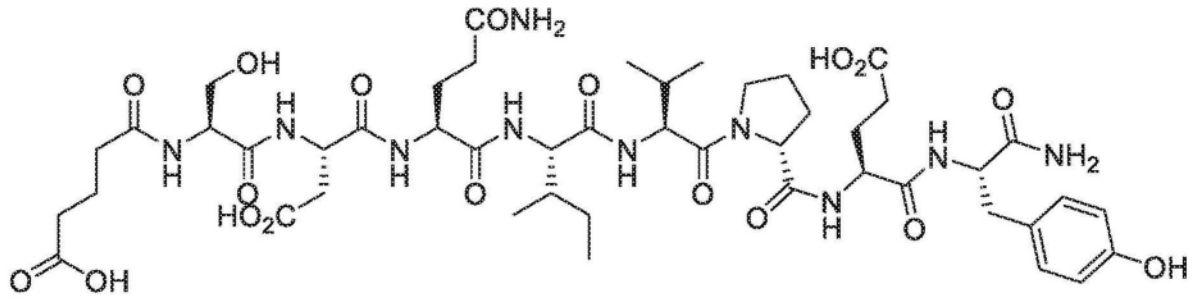
8-R-辛烯基丙氨酸；

X=S-戊烯基丙氨酸；

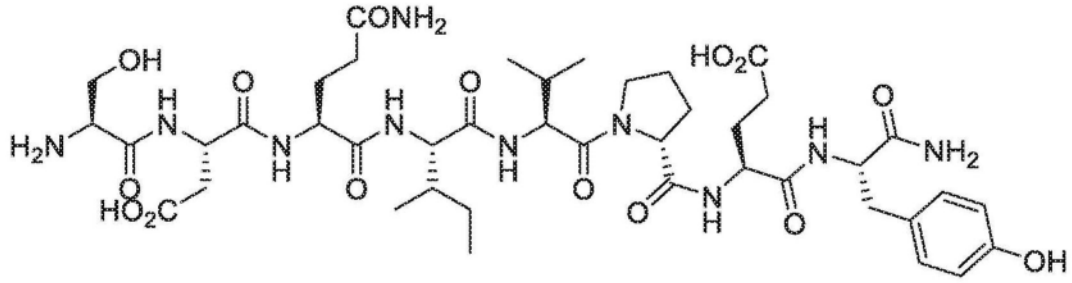
Ahx=氨基己酸

*=环丁基丙氨酸

图15

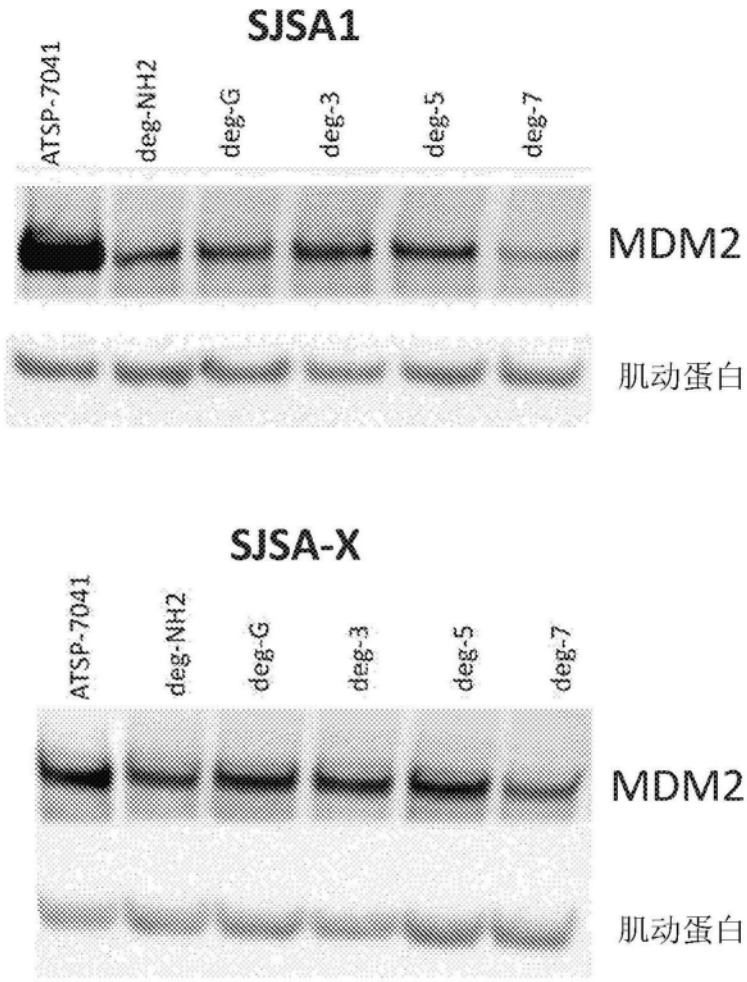


TRIB 羧酸酯(用于与胺偶联)



TRIB 肽(用于与酸偶联)

图16



ATSP-7041: LTF8EYWAQ#XSAA (# = 环丁基丙氨酸)

deg-NH2: LTF8%YWAQLXSAA (% = DAB + TRIB)

deg-G: LTF8%YWAQLXSAA (% = DAB + 接头 -Gly + TRIB)

deg-3: LTF8%YWAQLXSAA (% = DAB + 接头3 + TRIB)

deg-5: LTF8%YWAQLXSAA (% = DAB + 接头5 + TRIB)

deg-7: LTF8%YWAQLXSAA (% = DAB + 接头7 + TRIB)

图17

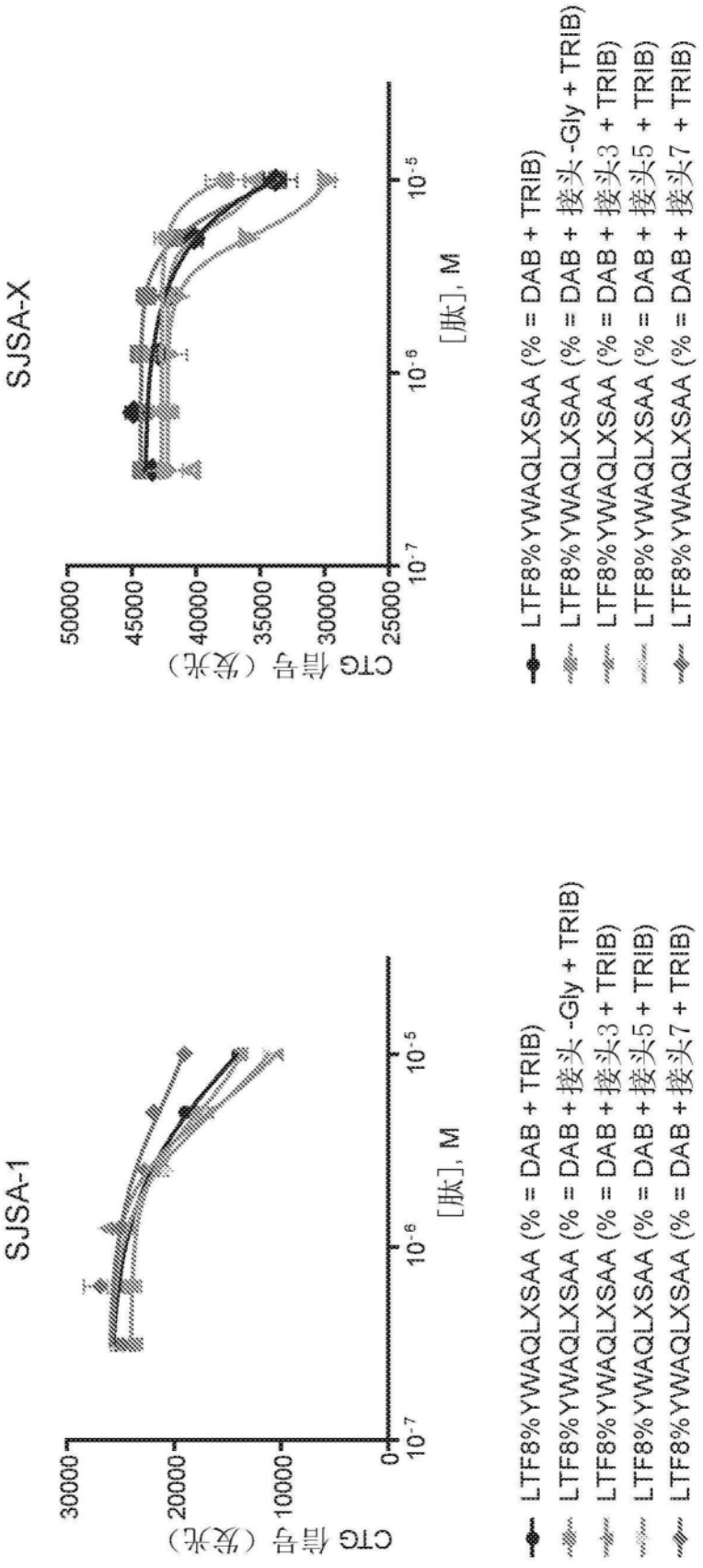
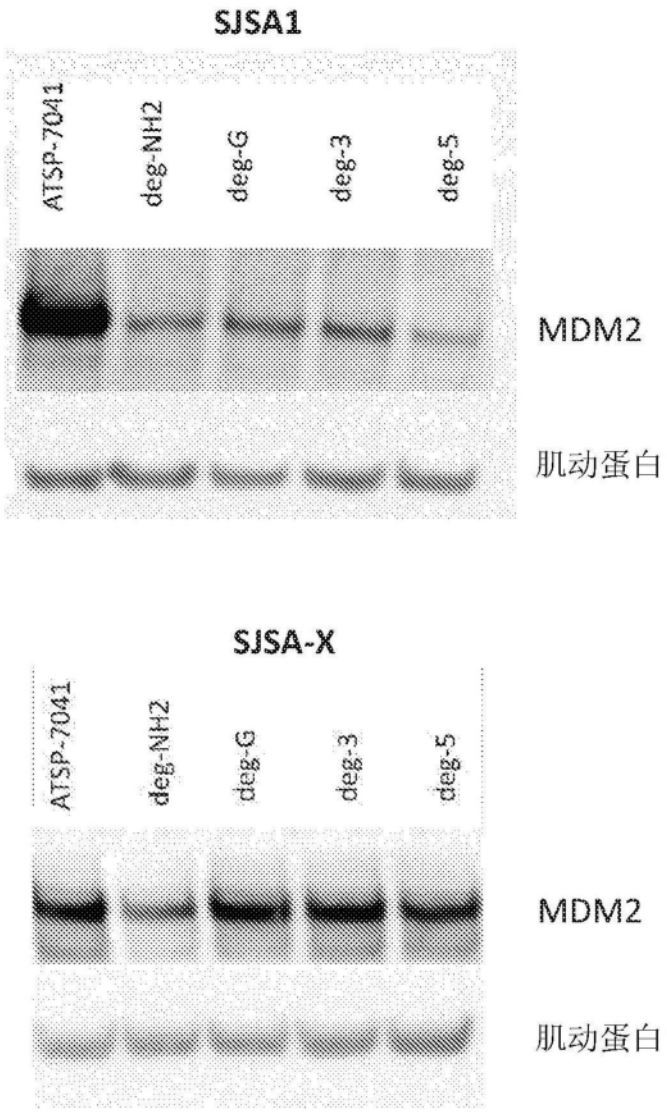

SJSA-1
SJSA-X
CTG 信号（发光）
[肽], M
LTF8%YWAQLXSAA (% = DAB + TRIB)
LTF8%YWAQLXSAA (% = DAB + 接头 -Gly + TRIB)
LTF8%YWAQLXSAA (% = DAB + 接头3 + TRIB)
LTF8%YWAQLXSAA (% = DAB + 接头5 + TRIB)
LTF8%YWAQLXSAA (% = DAB + 接头7 + TRIB)

图18



ATSP-7041: LTF8EYWAQ#XSAA (# = 环丁基丙氨酸)

deg-NH2: LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + VHL)

deg-G: LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + 接头 -Gly + VHL)

deg-3: LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + 接头3 + VHL)

deg-5: LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + 接头5 + VHL)

图19

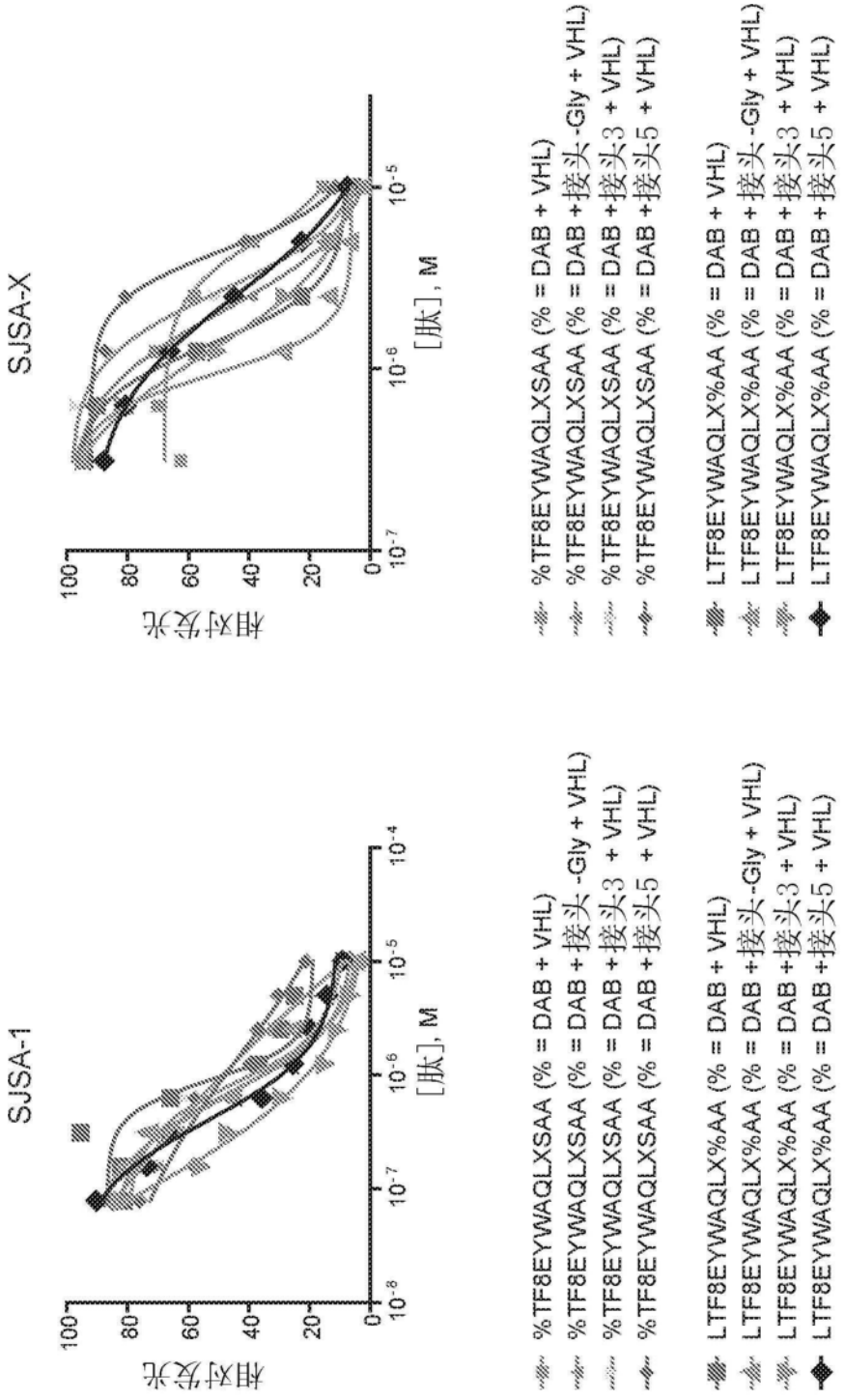

SJSA-1
SJSA-X
相对发光
[肽], M
%TF8EYWAQLXSAA (% = DAB + VHL)
%TF8EYWAQLXSAA (% = DAB +接头-Gly + VHL)
%TF8EYWAQLXSAA (% = DAB +接头3 + VHL)
%TF8EYWAQLXSAA (% = DAB +接头5 + VHL)
LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB + VHL)
LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB +接头-Gly + VHL)
LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB +接头3 + VHL)
LTF8EYWAQLX%AA (% = DAB +接头5 + VHL)

图20

QWAREIGAQLRXBADXLNAQYERR
FSSNRXKILXRTQILNQEWKQRRIQPV
RRFFGIXLTNXLKTEEGN
RKALETLRRVGDGVXRNHXTAF
LSQEQLEHRERSLXTLRXIQRBLF
LTF8EYWAQ#XSAA
DIIRNIARHLAXVGDXBDRSI
IWIAQELRXIGDXFNAYYARR
NLWAAQRYGRELRXBDDXFVDSFKK
NLWAAQRYGRELRXBSDXFVDSFKK
QLTAARLKXLGDXLHQRTBWR
AELEVESATQLRXFGDXLNFRQKLL
— 接头 - LTF8EYWAQ#XSAA
— 接头 - LTF8EYWAQ#XSAA
— 接头 - LTF8EYWAQ#XSAA
— 接头 - LTF8EYWAQ#XSAA
— 接头 - LTF8EYWAQ#XSAA
— 接头 - LTF8EYWAQ#XSAA
— 接头 - LTF8EYWAQ#XSAA
— 接头 - LTF8EYWAQ#XSAA
— 接头 - LTF8EYWAQ#XSAA
— 接头 - LTF8EYWAQ#XSAA
— 接头 - LTF8EYWAQ#XSAA
— 接头 - LTF8EYWAQ#XSAA

图21

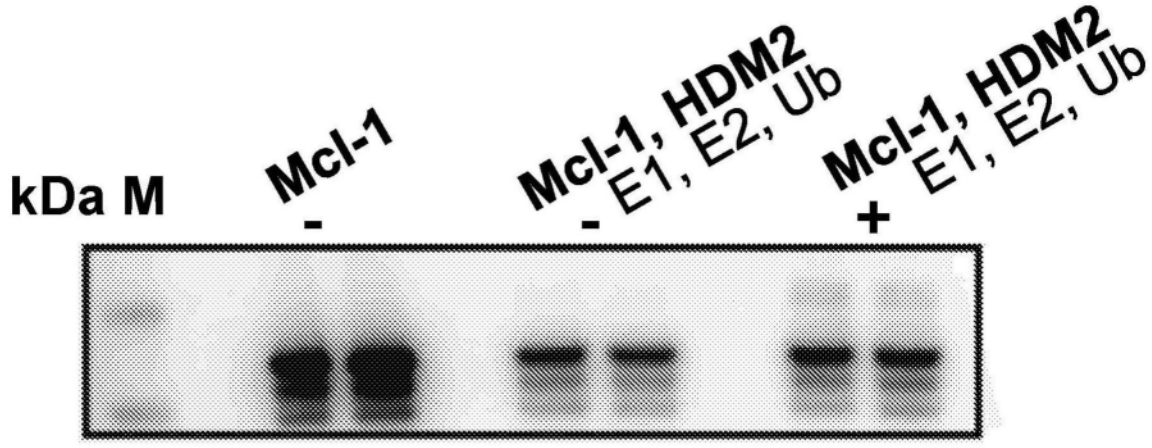

kDa M
Mcl-1
-
Mcl-1, HDM2
- E1, E2, Ub
Mcl-1, HDM2
+ E1, E2, Ub

图22

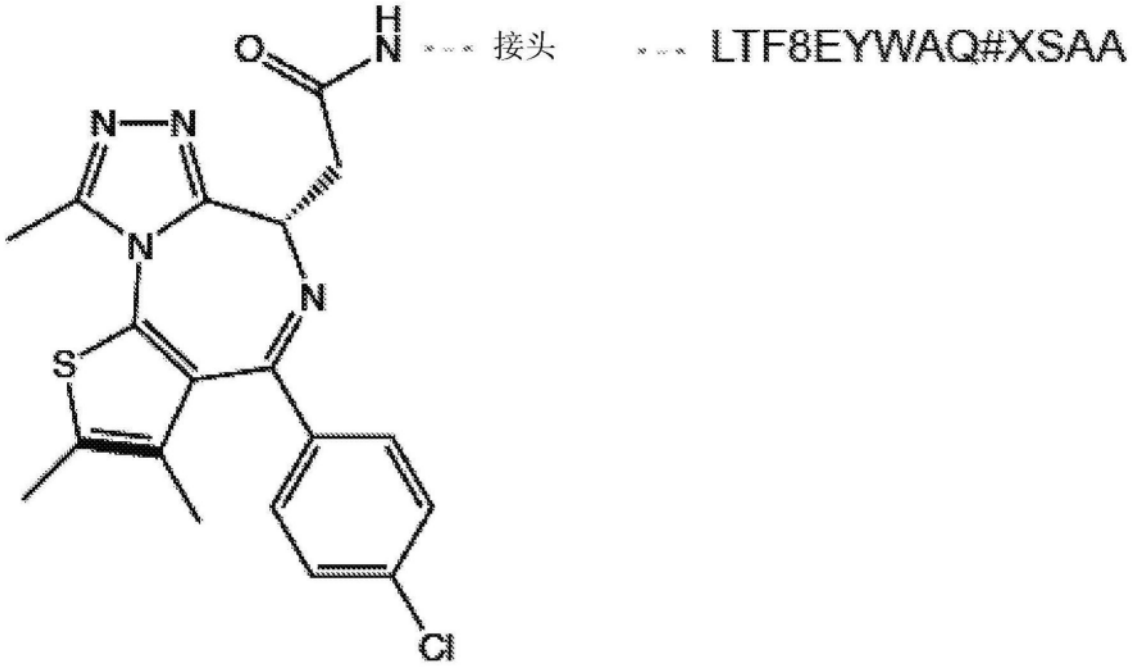

O
H
N
接头
LTF8EYWAQ#XSAA
N
N
N
N
S
Cl

图23

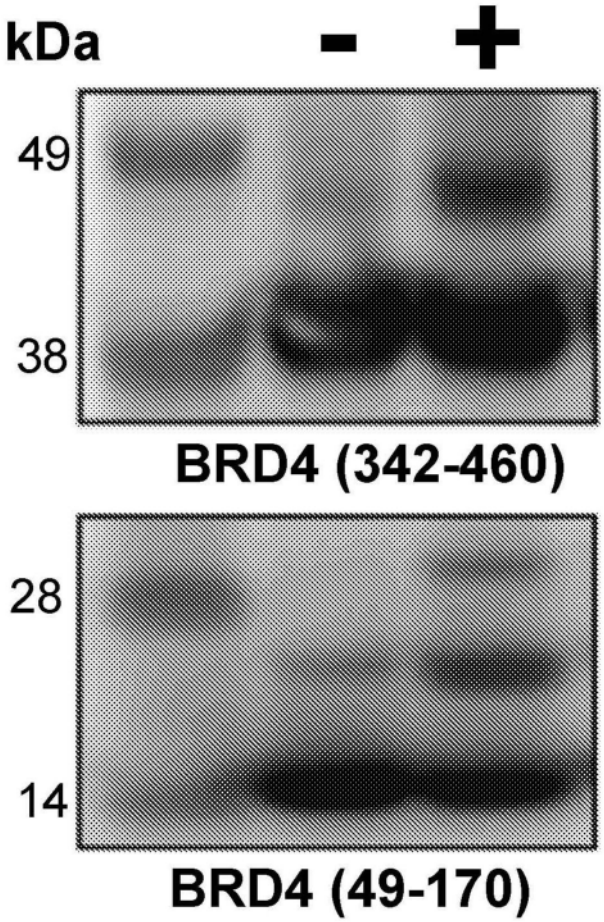


图24

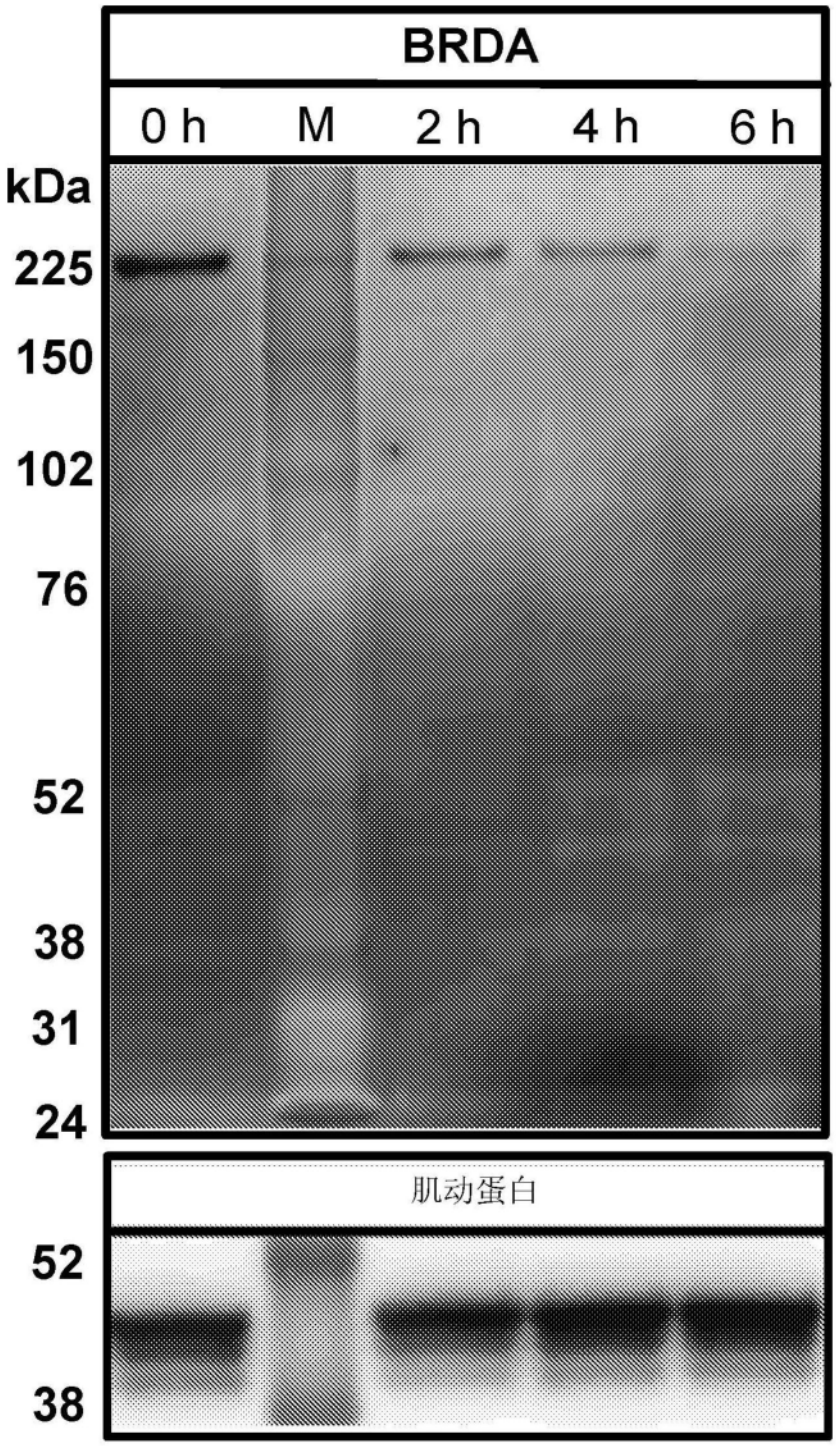


图25

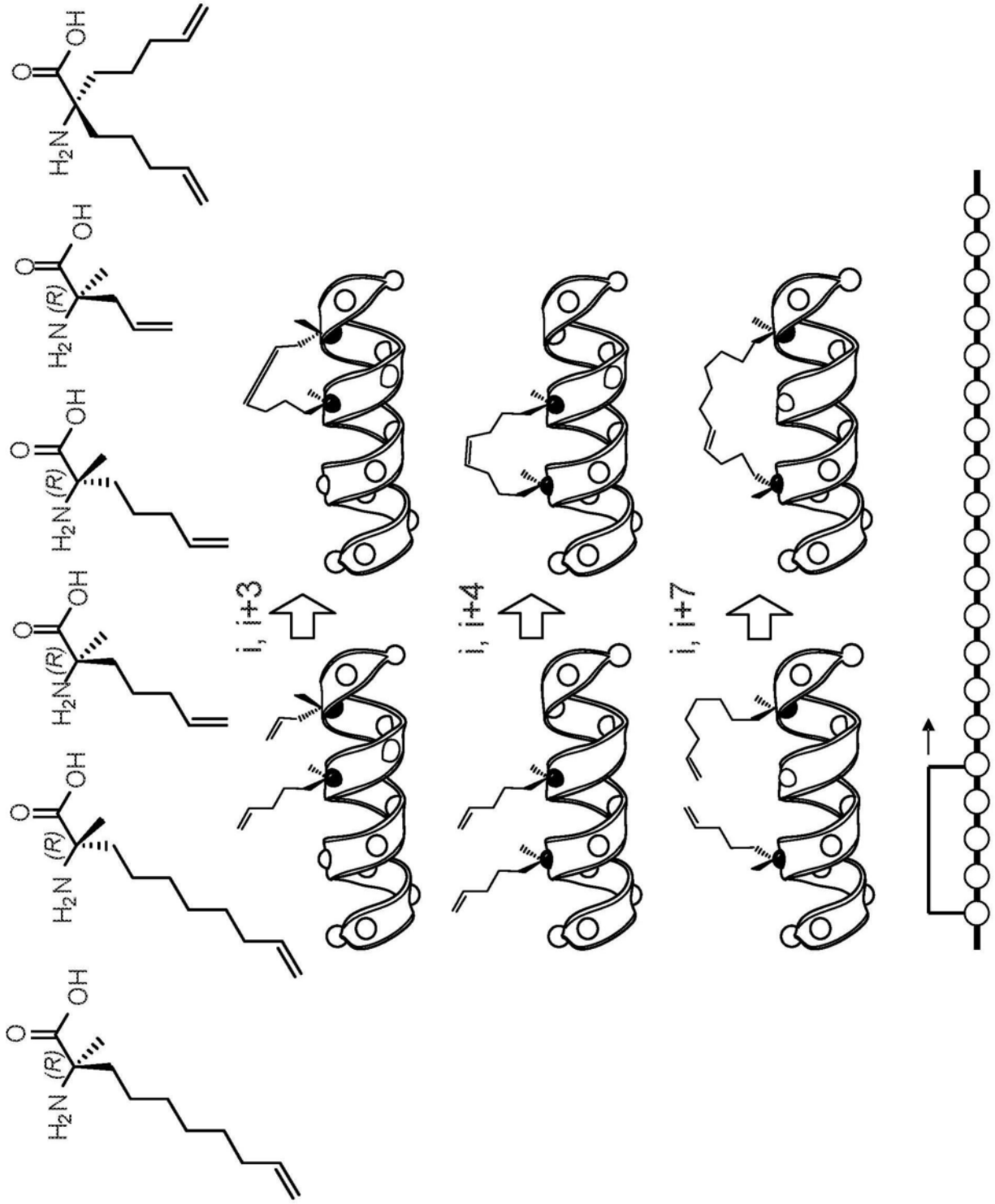


图26

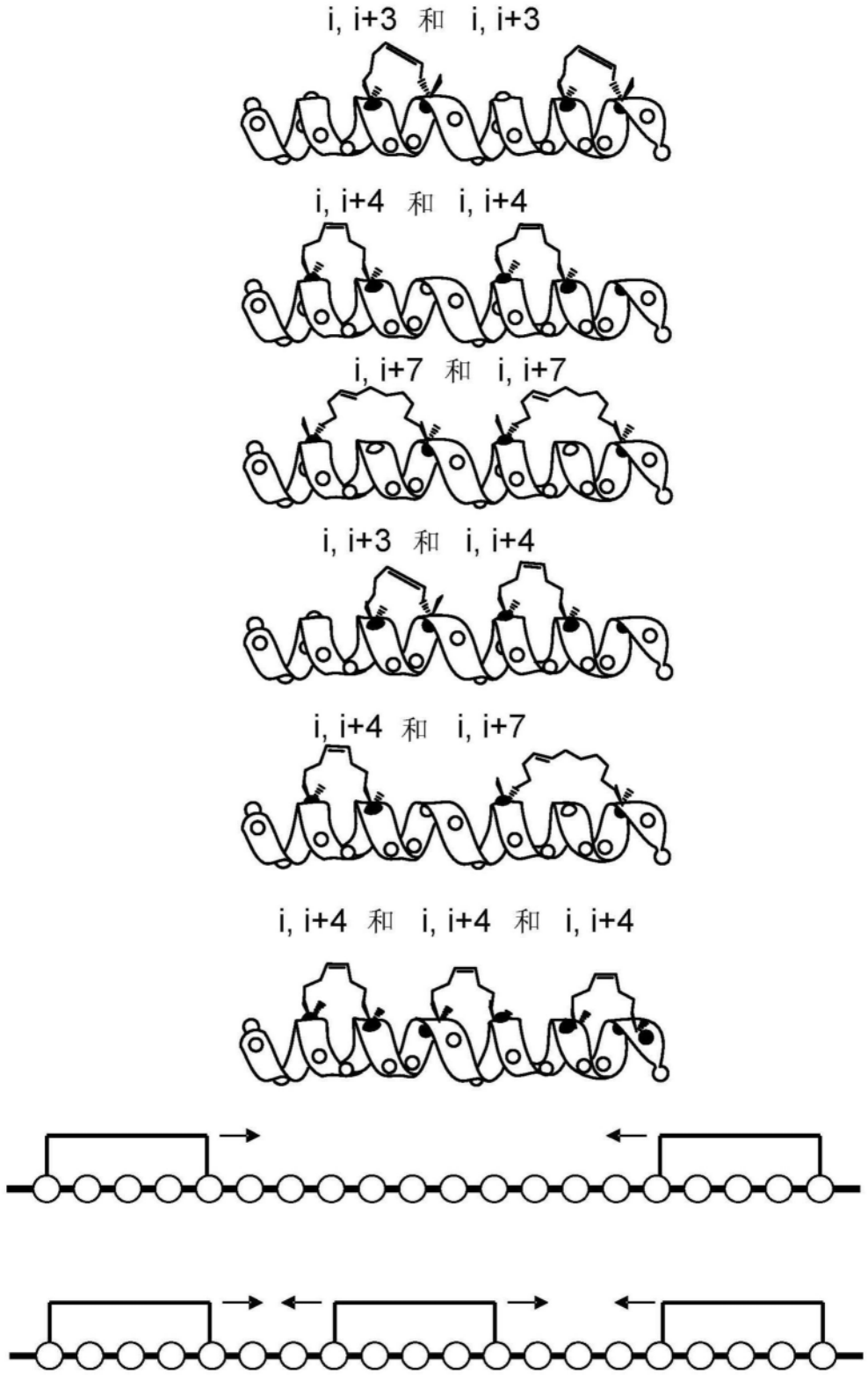


图27

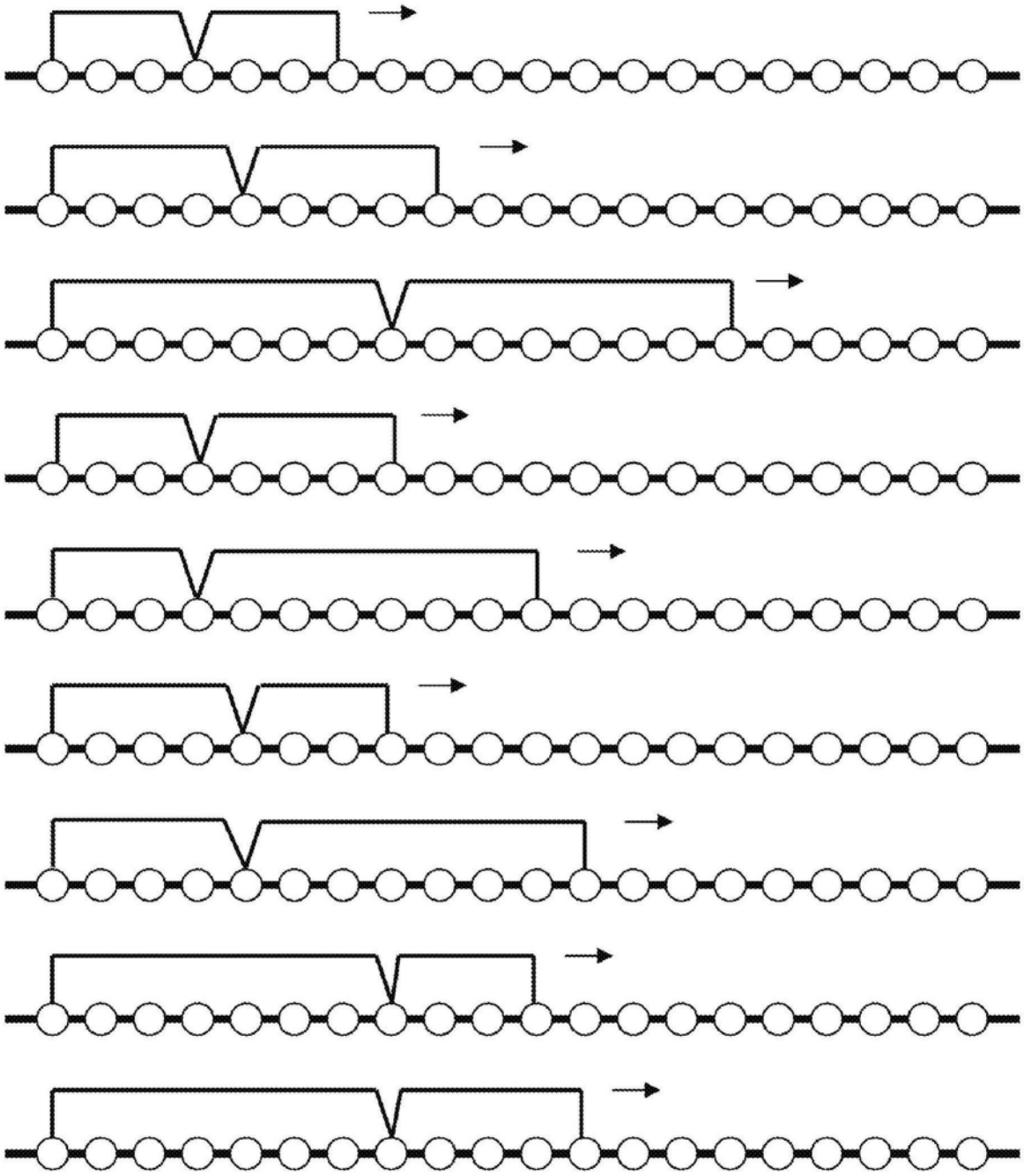


图28

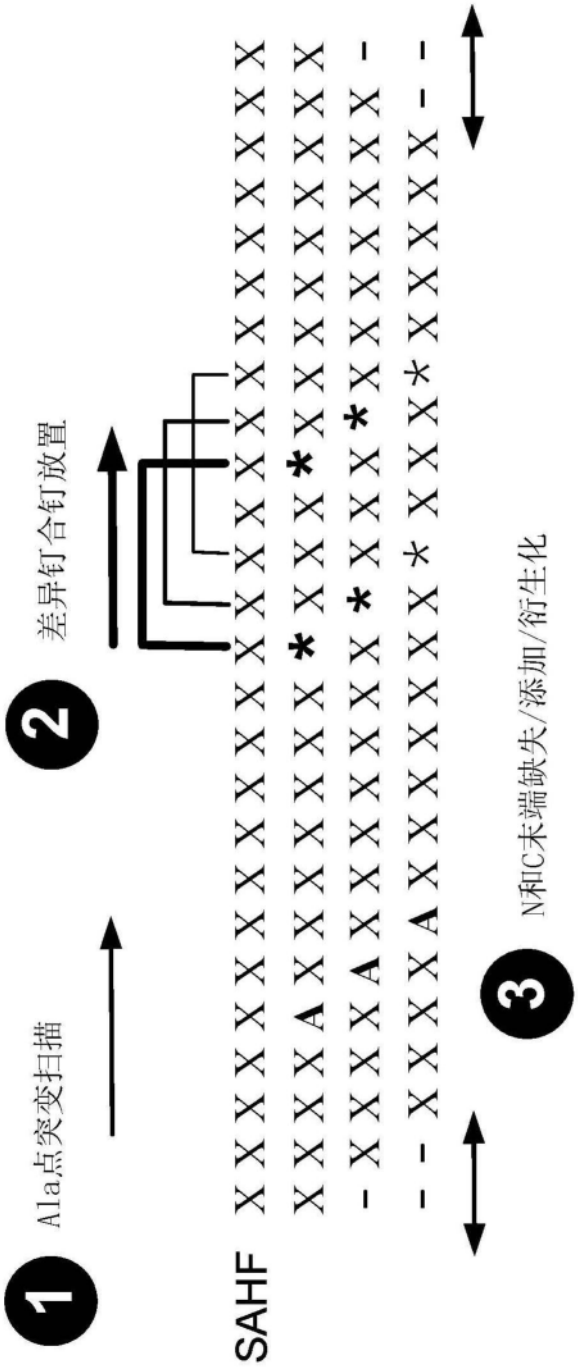


图29