

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-524911

(P2023-524911A)

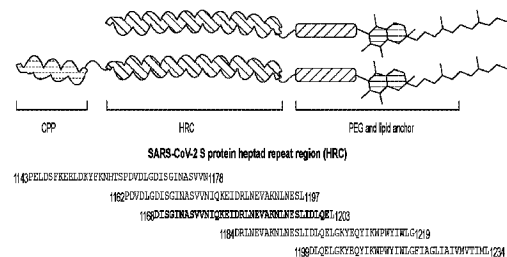
(43)公表日 令和5年6月13日(2023.6.13)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	14/165 (2006.01)	C 0 7 K	14/165	Z N A	4 C 0 7 6
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00		4 C 0 8 4
C 0 7 K	14/08 (2006.01)	C 0 7 K	14/08		4 H 0 4 5
A 6 1 K	38/02 (2006.01)	A 6 1 K	38/02		
A 6 1 P	31/14 (2006.01)	A 6 1 P	31/14		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全43頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-509461(P2023-509461)	(71)出願人	501306715	ザ トラスティース オブ コロンビア ユニバーシティ イン ザ シティ オブ ニューヨーク アメリカ合衆国 ニューヨーク州 100 27, ニューヨーク, ウェスト 116 番ストリート 535 番地 ロウ メモリアルライブラリー 412	
(86)(22)出願日	令和3年4月22日(2021.4.22)	(71)出願人	506097988		
(85)翻訳文提出日	令和4年12月26日(2022.12.26)	(71)出願人	ウィスコンシン アルムニ リサーチ ファウンデーション		
(86)国際出願番号	PCT/US2021/028667	(71)出願人	アメリカ合衆国, ウィスコンシン 53 726, マディソン, ウォルナット ストリート 614, サーティーンズ フロア		
(87)国際公開番号	WO2021/216891	(74)代理人	110001519		
(87)国際公開日	令和3年10月28日(2021.10.28)				
(31)優先権主張番号	63/015,479				
(32)優先日	令和2年4月24日(2020.4.24)			最終頁に続く	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,最終頁に続く				

(54)【発明の名称】 SARS-COV-2 抗ウイルス薬としての脂質-ペプチド融合物阻害剤

(57)【要約】

脂質-ペプチド融合物を用いる抗ウイルス療法でCOVID-19を治療する組成物及び方法を記載する。また、脂質-ペプチド融合物を用いる抗ウイルス療法でエボラを治療する組成物及び方法を記載する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、及び配列番号 5 からなる群より選択される配列を含むペプチド。

【請求項 2】

配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、及び配列番号 5 からなる群より選択される配列と 80% 超、85% 超、90% 超、95% 超であり且つ 100% 未満である相同性を有する配列を含むペプチド。

【請求項 3】

請求項 1 又は請求項 2 に記載のペプチド及び脂質タグを含む脂質－ペプチド融合物。

10

【請求項 4】

前記脂質タグがコレステロール、トコフェロール、又はパルミテートである、請求項 3 に記載の脂質－ペプチド融合物。

【請求項 5】

請求項 1 又は請求項 2 に記載のペプチド、脂質タグ、及びスペーサーを含む脂質－ペプチド融合物阻害剤。

【請求項 6】

前記スペーサーがポリエチレングリコール（PEG）を含む、請求項 5 に記載の脂質－ペプチド融合物阻害剤。

【請求項 7】

前記スペーサーが PEG 4 を含む、請求項 6 に記載の脂質－ペプチド融合物阻害剤。

20

【請求項 8】

前記脂質タグがコレステロール、トコフェロール、又はパルミテートである、請求項 5～請求項 7 のいずれか一項に記載の脂質－ペプチド融合物阻害剤。

【請求項 9】

細胞膜透過性ペプチド配列（CPP）をさらに含む、請求項 5～請求項 8 のいずれか一項に記載の脂質－ペプチド融合物阻害剤。

【請求項 10】

前記 CPP が HIV－TAT である、請求項 9 に記載の脂質－ペプチド融合物阻害剤。

【請求項 11】

請求項 1 又は請求項 2 に記載のペプチド及び医薬的に許容される添加剤を含む医薬組成物。

30

【請求項 12】

請求項 1 又は請求項 2 に記載のペプチド、脂質タグ、及び医薬的に許容される添加剤を含む医薬組成物。

【請求項 13】

前記脂質タグがコレステロール、トコフェロール、又はパルミテートである、請求項 12 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

請求項 1 又は請求項 2 に記載のペプチド、脂質タグ、スペーサー、及び医薬的に許容される添加剤を含む医薬組成物。

40

【請求項 15】

前記スペーサーがポリエチレングリコール（PEG）を含む、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

前記スペーサーが PEG 4 を含む、請求項 15 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

前記脂質タグがコレステロール、トコフェロール、又はパルミテートである、請求項 14～請求項 16 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

50

細胞膜透過性ペプチド配列（ＣＰＰ）をさらに含む、請求項１４～請求項１７のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項１９】

前記ＣＰＰがＨＩＶ－ＴＡＴである、請求項１８に記載の医薬組成物。

【請求項２０】

配列番号１、配列番号２、及び配列番号３からなる群より選択されるペプチド、脂質タグ、スパーサー、ＣＰＰ、並びに医薬的に許容される添加剤を含む、脂質－ペプチド融合物であるＳＡＲＳ－ＣＯＶ－２（ＣＯＶＩＤ－１９）阻害剤

を含む、ＳＡＲＳ－ＣＯＶ－２（ＣＯＶＩＤ－１９）抗ウイルス組成物。

【請求項２１】

前記ペプチドが配列番号２及び配列番号３から選択される、請求項２０に記載のＳＡＲＳ－ＣＯＶ－２（ＣＯＶＩＤ－１９）抗ウイルス組成物。

【請求項２２】

配列番号１、配列番号２、及び配列番号３からなる群より選択される配列と８０％超の相同性を有する配列を含むペプチド、脂質タグ、スパーサー、ＣＰＰ、並びに医薬的に許容される添加剤を含む、抗ウイルス医薬組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む、ＣＯＶＩＤ－１９を治療する方法。

【請求項２３】

前記脂質タグがコレステロール、トコフェロール、又はパルミテートである、請求項２２に記載の方法。

【請求項２４】

前記抗ウイルス医薬組成物が、気道を通じて、又は皮下に、投与される、請求項２２又は請求項２３に記載の方法。

【請求項２５】

前記抗ウイルス医薬組成物が鼻腔内投与される、請求項２４に記載の方法。

【請求項２６】

前記抗ウイルス医薬組成物が、点鼻薬又は噴霧薬として投与される、請求項２５に記載の方法。

【請求項２７】

配列番号４及び配列番号５からなる群より選択されるペプチド、脂質タグ、ＣＰＰ、並びに医薬的に許容される添加剤を含む、脂質－ペプチド融合物であるエボラ阻害剤を含む、エボラ抗ウイルス組成物。

【請求項２８】

スパーサーをさらに含む、請求項２７に記載のエボラ抗ウイルス組成物。

【請求項２９】

配列番号４及び配列番号５から選択される配列と８０％超の相同性を有する配列を含むペプチド、脂質タグ、ＣＰＰ、並びに医薬的に許容される添加剤を含む、抗ウイルス医薬組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む、エボラを治療する方法。

【請求項３０】

前記ペプチドがスパーサーをさらに含む、請求項２９に記載の方法。

【請求項３１】

前記脂質タグがコレステロール、トコフェロール、又はパルミテートである、請求項２９又は請求項３０に記載の方法。

【請求項３２】

前記抗ウイルス医薬組成物が、気道を通じて、又は皮下に、投与される、請求項２２又は請求項２３に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願の相互参照

10

20

30

40

50

本出願は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、2020年4月24日に出願された米国仮特許出願第63／015479号の米国特許法第119条(e)に基づく優先権の利益を主張する。

【0002】

本明細書で引用される全ての特許、特許出願及び刊行物は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。これらの刊行物の開示は、その全体が参照により本出願に組み込まれる。

【0003】

本特許開示は、著作権保護の対象となる資料を含む。著作権所有者は、米国特許商標庁の特許ファイル又は記録に記載されているように、特許文書又は特許開示のいずれかによるファクシミリ複製に異議を唱えないが、それ以外のあらゆる全ての著作権を留保する。

【0004】

政府支援

本発明は、国立衛生研究所によって授与された助成金A I 1 1 4 7 3 6及びA I 1 2 1 3 4 9の下で政府支援を受けてなされた。政府は、本発明における一定の権利を有する。

【背景技術】

【0005】

重症急性呼吸器症候群ウイルスSARS-CoV-2(COVID)ウイルスを含むコロナウイルスによる感染は、ウイルスエンベロープと肺細胞膜との間の膜融合を必要とする。融合プロセスは、スパイクタンパク質又はSとも呼ばれるウイルスのエンベロープ糖タンパク質によって媒介される。感染個体の予防又は治療のために現在利用可能な治療選択肢はない。新たに出現した病原性ウイルスSARS-CoV-2(COVID-19呼吸器疾患の原因)は、ヒトの健康及び社会秩序に対する世界的な脅威である。したがって、COVID-19の現在のパンデミックを考えると、これらのコロナウイルス、特にSARS-CoV-2に対する有効な抗ウイルス療法の開発は、全国的にだけでなく世界的にも最優先事項である。

【発明の概要】

【0006】

ある特定の態様では、本発明は、配列番号2若しくは配列番号3を含む又は有するペプチドを提供する。ある特定の態様では、本発明は、配列番号1、配列番号2又は配列番号3と80%超、85%超、90%超、95%超であり且つ100%未満である相同性を有する配列を含む又は有するペプチドを提供する。

【0007】

ある特定の態様では、SARS脂質-ペプチド融合物が、配列番号2若しくは配列番号3を含む若しくは有するペプチド、又は配列番号1、配列番号2若しくは配列番号3と80%超、85%超、90%超、95%超であり且つ100%未満である相同性を有する配列を含む若しくは有するペプチド、及び脂質タグを含む。

【0008】

いくつかの実施形態では、脂質タグがコレステロール、トコフェロール、又はパルミテートである。

【0009】

ある特定の態様では、脂質-ペプチド融合物であるSARS阻害剤が、配列番号2若しくは配列番号3を含む若しくは有するペプチド、又は配列番号1、配列番号2若しくは配列番号3と80%超、85%超、90%超、95%超であり且つ100%未満である相同性を有する配列を含む若しくは有するペプチド、脂質タグ、及びスペーサーを含む。

【0010】

いくつかの実施形態では、スペーサーがポリエチレングリコール(PEG)である。いくつかの実施形態では、スペーサーがPEG4である。いくつかの実施形態では、脂質タグがコレステロール、トコフェロール、又はパルミテートである。

【0011】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、脂質－ペプチド融合物であるSARS阻害剤が、細胞膜透過性ペプチド配列（CPP）をさらに含む。いくつかの実施形態では、CPPがHIV－TATである。

【0012】

ある特定の態様では、医薬組成物が、配列番号2若しくは配列番号3を含む若しくは有するペプチド、又は配列番号1、配列番号2若しくは配列番号3と80%超、85%超、90%超、95%超であり且つ100%未満である相同性を有する配列を含む若しくは有するペプチド、及び医薬的に許容される添加剤（excipient）を含む。

【0013】

ある特定の態様では、医薬組成物が、配列番号2若しくは配列番号3を含む若しくは有するペプチド、又は配列番号1、配列番号2若しくは配列番号3と80%超、85%超、90%超、95%超であり且つ100%未満である相同性を有する配列を含む若しくは有するペプチド、脂質タグ、医薬的に許容される添加剤を含む。

10

【0014】

いくつかの実施形態では、脂質タグがコレステロール、トコフェロール、又はパルミテートである。

【0015】

ある特定の態様では、医薬組成物が、配列番号2若しくは配列番号3を含む若しくは有するペプチド、又は配列番号1、配列番号2若しくは配列番号3と80%超、85%超、90%超、95%超であり且つ100%未満である相同性を有する配列を含む若しくは有するペプチド、脂質タグ、スペーサー、及び医薬的に許容される添加剤を含む。

20

【0016】

いくつかの実施形態では、スペーサーがポリエチレングリコール（PEG）である。いくつかの実施形態では、スペーサーがPEG4である。いくつかの実施形態では、脂質タグがコレステロール、トコフェロール、又はパルミテートである。

【0017】

いくつかの実施形態では、コロナウイルス脂質－ペプチド融合物阻害剤が、細胞膜透過性ペプチド配列（CPP）をさらに含む。いくつかの実施形態では、CPPがHIV－TATである。

【0018】

ある特定の態様では、SARS－COV－2（COVID－19）抗ウイルス組成物が、脂質－ペプチド融合物であるSARS－COV－2（COVID－19）阻害剤及び医薬的に許容される添加剤を含む。脂質－ペプチド融合物であるSARS－COV－2（COVID－19）阻害剤は、配列番号1、配列番号2及び配列番号3から選択されるペプチド、脂質タグ、スペーサー、並びにCPPをさらに含む。

30

【0019】

いくつかの実施形態では、ペプチドが配列番号2又は配列番号3である。

【0020】

ある特定の態様では、本発明は、抗ウイルス医薬組成物を患者に投与することを含む、COVID－19を治療する方法を提供する。抗ウイルス医薬組成物は、配列番号2若しくは配列番号3を含む若しくは有するペプチド、又は配列番号1、配列番号2若しくは配列番号3と80%超、85%超、90%超、95%超であり且つ100%未満である相同性を有する配列を含む若しくは有するペプチド、脂質タグ、スペーサー、CPP、及び医薬的に許容される添加剤を含む。

40

【0021】

いくつかの実施形態では、脂質タグがコレステロール、トコフェロール、又はパルミテートである。

【0022】

いくつかの実施形態では、抗ウイルス医薬組成物が気道を通じて投与されるか又は皮下投与される。いくつかの実施形態では、抗ウイルス医薬組成物が鼻腔内投与される。いく

50

つかの実施形態では、抗ウイルス医薬組成物が点鼻薬 (nasal drops) 又は噴霧薬 (spray) として投与される。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】S (スパイク) タンパク質を示した図である。反復セクションHRN及びHRCは、いずれかの端部において互いに認識し、互いにかみ合って折り畳み構造を形成する。融合阻害ペプチドは、反復セクションに結合し、折り畳み構造の形成を妨げて、ウイルスの融合及び侵入を阻止する。

【0024】

【図2】コロナウイルスによる感染及び細胞侵入を示した図である。

10

【0025】

【図3】エンドソーム経路を介したエボラウイルス侵入を示した図である。Falzarano D、Feldmann H. Virology. Delineating Ebola entry. Science 2015から。

【0026】

【図4】ウイルスエンベロープスパイク (S) タンパク質に由来するSARS-CoV-2阻害剤のモジュール設計を示した図である。

【0027】

【図5】脂質修飾HRCペプチドが早期コロナウイルス侵入及び後期コロナウイルス侵入の両方を阻止することを示した図である。これは、本発明者らの脂質コンジュゲートMERS由来ペプチドを使用して得られた結果の概略図である。Park及びGallagher、Lipidation increases antiviral activities of coronavirus fusion-inhibiting peptides、Virology 2017; 511、9~18からの図。

20

【0028】

【図6】MERS-S媒介融合に対するMERS-CoV-Sペプチドの融合阻害アッセイを示した図である。

【0029】

【図7】治療有効性を示した図である。マウス (N=5/群) を、10 LD50 MERS-CoV (10^2 TCID₅₀/マウス当たりi.n.) による感染の16時間後に、2mg/Kg i.p. のコレステロールタグ付きペプチド又はタグ無しペプチドの単回投与で治療した (又は未治療とした)。感染前に鼻腔内投与された場合、タグ無しペプチドでさえ100%防御性であることに留意されたい。

30

【0030】

【図8】TAT-EBOLA-dPEG4-ToCが、致死性 (MA-) ZEBOV感染からマウスを防御することを示した図である。5~6週齢のBALB/cマウスに、最初のペプチド治療の24時間後に (MA-) ZEBOVの腹腔内曝露を受けさせ、感染後5週間追跡した。ペプチド (等張水に溶解した10mg/kg) を15日間にわたって毎日腹腔内投与した。

【0031】

40

【図9】TAT及び脂質コンジュゲートペプチドの細胞内局在を示した図である。Vero細胞単層を、10µMの示されるペプチドと共に37℃で60分間インキュベートした。細胞を固定し、PBS中0.02% Tween-20で透過処理し、カスタムメイドのビオチンコンジュゲート抗ペプチド抗体で染色した。抗ペプチド抗体をストレプトアビジン-フィコエリトリン (PE) で検出した。細胞をDAPIで対比染色した (核染色)。PE (発光580nm) 及びDAPI (発光460nm) 蛍光を取得した。

【0032】

【図10】HRC由来Cペプチドの設計及び配列を示した図である。ソフトウェア (<http://www.uniprot.org/align/>) は、MERS-CoVのものに対する各HRN標的の類似度を示す。Cペプチドと相互作用する残基は太字フォント

50

で強調されており、非相互作用領域に位置する残基は灰色で陰影が付けられている。

【0033】

【図11】SARS-CoV-2 S由来のタグ付き脂質を示した図である。SARS-CoV-2 S HRC領域由来のCペプチドを合成する。3行目(DISG...QEL)は、本発明者らが最近試験し、EK1ペプチドと比較した配列である。

【0034】

【図12】SARS-CoV-2 Sタンパク質(PDB 6LXT)のHRCドメイン及びHRNDドメインによって形成される6HB集合体の結晶構造を示した図である。HRCでは、両側の中心ヘリックス及び拡張セグメントに注目されたい。

【0035】

【図13】D-1に表されるように、各末端にナンバリングが示されている、SARS-CoV-2 Sタンパク質のHRCドメインの配列(上)を示した図である。2つの「h」記号は、螺旋セグメントの境界を示す。D-2は、イオンペアリングアレイを最適化するための、2つの α -アミノ酸残基変更(赤色)を含む。D-3はMERSのHRCドメインに対応し、D-4はMERS HRCに由来するペプチドEK1である(変更を赤色で表示)。

【0036】

【図14】MERS-CoV-S CペプチドがSARS-CoV-2-S媒介融合を阻止することを、融合阻害アッセイによって示した図である。ペプチドaa配列を示す。対照ペプチド(パラインフルエンザ配列)を黒色で示す。

【0037】

【図15】ブランク減少アッセイを示した図である。図15A:細胞培養物において、生ウイルス及び本発明者らのMERS脂質-ペプチドを使用して、SARS-CoV-2感染の100%の減少が観察された。図15B: EBO融合についてのブランク阻害アッセイ。ペプチドを滅菌水に10倍段階希釈し(10 μ M~0.005 μ M)、各ペプチド用量を、MEMに希釈した500PFU/mLを含有する等量のウイルスと混合し、ペプチド/ウイルス混合物を37°Cで1時間インキュベートした。各ペプチド用量/ウイルス混合物を6ウェルプレート中、Vero E6細胞の3連ウェルに接種し(0.2mL/ウェル)、37°Cで1時間吸着させた。細胞単層をPBSで2回すすいだ後、MEM、5%ウシ胎児血清、抗生物質、及びMEアガロース(0.6%)を含有する培地オーバーレイを添加した。培養物を37°Cで6日間インキュベートし、染色剤としてニュートラルレッドを含有する培地を積層し、24~48時間後にブランクを計数した。ウイルス対照をペプチドの代わりに滅菌水と混合した。

【0038】

【図16】SARSペプチド及びMERSペプチドによるSARS-CoV-2糖タンパク質融合の阻害を示した図である。SARSペプチドは、ACE2ありだとIC50が約6nMであり、ACE2なしだとIC50がわずかに0.09nMである。

【0039】

【図17】示されるペプチドによるSARS-CoV-2糖タンパク質融合の阻害を示した図である。

【0040】

【図18】図17で使用される示されるペプチドの配列を示した図である。

【0041】

【図19】示されるタンパク質によるSARS-CoV-2糖タンパク質の阻害を示した図である。

【0042】

【図20】SARS-CoV-2ペプチドによるウイルス感染の阻害を示した図である。

【0043】

【図21】ヒト気道上皮(HAE)を示した図である。

【0044】

10

20

30

40

50

【図 2 2】経時的な（3 日間）H A E 中のヒトパラインフルエンザ－G F P を示した図である。

【0 0 4 5】

【図 2 3】E G F P を有する S A R S－C o V－2 によるヒト気道上皮（H A E）感染を示した図である。

【0 0 4 6】

【図 2 4】E G F P を有するパラインフルエンザウイルスに感染したヒト肺オルガノイドを示した図である。

【0 0 4 7】

【図 2 5】ゴールデンハムスターにおけるニパ（致死性ウイルス）感染に対するインビボ有効性が、脂質－ペプチドの 2 m g／k g／日の皮下送達が有効であったことを実証していることを示した図である。

10

【0 0 4 8】

【図 2 6】ゴールデンハムスターにおけるニパ（致死性ウイルス）感染に対するインビボ有効性を示した図である。脂質－ペプチドを鼻腔内投与した。1 日前、その日、1 日後の投与は、致死的な感染からの 6 0 % 防御を提供することができる。

【0 0 4 9】

【図 2 7】インフルエンザ感染に対するインビボ有効性を示した図である。ペプチドを、コットラットにおいて 1 0 0 0 倍低いウイルス力価で 1 日前、その日、1 日後の 3 回鼻腔内投与した。

20

【0 0 5 0】

【図 2 8】マウスの麻疹感染（致死性脳炎）を麻疹ペプチドを用いて予防することの、インビボ有効性を示した図である。皮下投与及び鼻腔内投与の両方を調査した。

【0 0 5 1】

【図 2 9】K i m らのようなフェレット試験の設計を示した図である。

【発明を実施するための形態】

【0 0 5 2】

本発明は、C O V I D－1 9 を予防及び治療するための脂質－ペプチド分子を網羅する。本発明は、細胞内への S A R S－C o V－2 侵入を阻止し、インビボで感染を予防及び／又は抑止し、伝染を予防する可能性が高い設計ペプチドを使用する。本発明者らは、このタイプの脂質－ペプチド分子が、麻疹、致死性ニパウイルス、インフルエンザなどの他のウイルスの致死的な感染を予防し、さらには治療するのに極めて有効であることを発見した。設計ペプチドは、培養細胞及びエキソビボでの生 S A R S－C o V－2（C O V I D）ウイルス感染の阻害に極めて有効である。

30

【0 0 5 3】

S A R S－C o V－2（C O V I D）ウイルスを含むコロナウイルスによる感染は、ウイルスエンベロープと肺細胞膜との間の膜融合を必要とする。融合プロセスは、スパイクタンパク質又は S と呼ばれるウイルスのエンベロープ糖タンパク質によって媒介される。本発明者らは、スパイクタンパク質の移行段階に結合し、その機能を妨げることによってウイルス融合及び感染を阻害する、脂質に連結された特異的ペプチドを設計した。重要なことに、本発明者らが標的とした他のウイルスからの証拠に基づいて、これら抗ウイルス薬は、気道を通じて、点鼻薬によって投与することができ、毒性がなく、肺において良好な半減期を有する。これらの抗ウイルス薬を鼻及び吸入を介して投与することができるということは、これらを広範な使用において適用することを可能にする。

40

【0 0 5 4】

本発明者らは、細胞培養物中の生 S A R S－C o V－2 に対する有効性をはるかに正確に予測する、B S L 2 実験室条件において効力及び機序を評価するためのいくつかのアッセイを設計した。プロトタイプペプチドは、培養細胞における S A R S－C o V－2 スパイクタンパク質融合及びウイルス侵入阻止アッセイ、並びにインビトロ及びエキソビボでの生 S A R S－C o V－2（C O V I D）ウイルス感染の阻害に極めて有効である。これ

50

らの抗ウイルス薬に対する改善は、これらの抗ウイルス薬を一層有効にし、肺又は血液中における分解に対する耐性を高め、より良好にスパイクタンパク質と相互作用してその移行状態を阻止することを可能とするであろう。動物モデルにおけるリード抗ウイルス薬の試験は、医療従事者の感染を予防するための点鼻薬又は噴霧薬としての治療を含む、感染の予防及び治療、並びに感染動物から健康な動物への接触感染の予防についての有用性を示す。

【0055】

ある特定の態様では、本発明は、配列番号2若しくは配列番号3を含む又は有するペプチドを提供する。ある特定の態様では、本発明は、配列番号1、配列番号2又は配列番号3と80%超、85%超、90%超、95%超であり且つ100%未満である相同性を有する配列を含む又は有するペプチドを提供する。

10

【0056】

ある特定の態様では、SARS脂質-ペプチド融合物が、配列番号2若しくは配列番号3を含む若しくは有するペプチド、又は配列番号1、配列番号2若しくは配列番号3と80%超、85%超、90%超、95%超であり且つ100%未満である相同性を有する配列を含む若しくは有するペプチド、及び脂質タグを含む。

【0057】

いくつかの実施形態では、脂質タグがコレステロール、トコフェロール、又はパルミテートである。

【0058】

ある特定の態様では、脂質-ペプチド融合物であるSARS阻害剤が、配列番号2若しくは配列番号3を含む若しくは有するペプチド、又は配列番号1、配列番号2若しくは配列番号3と80%超、85%超、90%超、95%超であり且つ100%未満である相同性を有する配列を含む若しくは有するペプチド、脂質タグ、及びスペーサーを含む。

20

【0059】

いくつかの実施形態では、スペーサーがポリエチレングリコール(PEG)である。いくつかの実施形態では、スペーサーがPEG4である。いくつかの実施形態では、脂質タグがコレステロール、トコフェロール、又はパルミテートである。

【0060】

いくつかの実施形態では、脂質-ペプチド融合物であるSARS阻害剤が、細胞膜透過性ペプチド配列(CPP)をさらに含む。いくつかの実施形態では、CPPがHIV-TATである。

30

【0061】

ある特定の態様では、医薬組成物が、配列番号2若しくは配列番号3を含む若しくは有するペプチド、又は配列番号1、配列番号2若しくは配列番号3と80%超、85%超、90%超、95%超であり且つ100%未満である相同性を有する配列を含む若しくは有するペプチド、及び医薬的に許容される添加剤を含む。

【0062】

ある特定の態様では、医薬組成物が、配列番号2若しくは配列番号3を含む若しくは有するペプチド、又は配列番号1、配列番号2若しくは配列番号3と80%超、85%超、90%超、95%超であり且つ100%未満である相同性を有する配列を含む若しくは有するペプチド、脂質タグ、医薬的に許容される添加剤を含む。

40

【0063】

いくつかの実施形態では、脂質タグがコレステロール、トコフェロール、又はパルミテートである。

【0064】

ある特定の態様では、医薬組成物が、配列番号2若しくは配列番号3を含む若しくは有するペプチド、又は配列番号1、配列番号2若しくは配列番号3と80%超、85%超、90%超、95%超であり且つ100%未満である相同性を有する配列を含む若しくは有するペプチド、脂質タグ、スペーサー、及び医薬的に許容される添加剤を含む。

50

【0065】

いくつかの実施形態では、スペーサーがポリエチレングリコール（PEG）である。いくつかの実施形態では、スペーサーがPEG4である。いくつかの実施形態では、脂質タグがコレステロール、トコフェロール、又はパルミテートである。

【0066】

いくつかの実施形態では、コロナウイルス脂質－ペプチド融合物阻害剤が、細胞膜透過性ペプチド配列（CPP）をさらに含む。いくつかの実施形態では、CPPがHIV-TATである。

【0067】

ある特定の態様では、SARS-COV-2（COVID-19）抗ウイルス組成物が、脂質－ペプチド融合物であるSARS-COV-2（COVID-19）阻害剤及び医薬的に許容される添加剤を含む。脂質－ペプチド融合物であるSARS-COV-2（COVID-19）阻害剤は、配列番号1、配列番号2及び配列番号3から選択されるペプチド、脂質タグ、スペーサー、並びにCPPをさらに含む。

10

【0068】

いくつかの実施形態では、ペプチドが配列番号2又は配列番号3である。

【0069】

ある特定の態様では、本発明は、抗ウイルス医薬組成物を患者に投与することを含む、COVID-19を治療する方法を提供する。抗ウイルス医薬組成物は、配列番号2若しくは配列番号3を含む若しくは有するペプチド、又は配列番号1、配列番号2若しくは配列番号3と80%超、85%超、90%超、95%超であり且つ100%未満である相同性を有する配列を含む若しくは有するペプチド、脂質タグ、スペーサー、CPP、及び医薬的に許容される添加剤を含む。

20

【0070】

いくつかの実施形態では、脂質タグがコレステロール、トコフェロール、又はパルミテートである。

【0071】

いくつかの実施形態では、抗ウイルス医薬組成物が気道を通じて投与されるか又は皮下投与される。いくつかの実施形態では、抗ウイルス医薬組成物が鼻腔内投与される。いくつかの実施形態では、抗ウイルス医薬組成物が点鼻薬又は噴霧薬として投与される。

30

【実施例】

【0072】

本発明のより完全な理解を容易にするために、実施例を以下に提供する。以下の実施例は、本発明を作製及び実施する例示的な様式を示す。しかしながら、代替の方法を利用して同様の結果を得ることができるので、本発明の範囲は、例示のみを目的とするこれらの実施例に開示される特定の実施形態に限定されない。

【0073】

実施例1 一般概念

コロナウイルス感染

コロナウイルス（CoV）は、生命を脅かす疾患を引き起こす可能性がある。この新型疾患は、最近、世界保健機関によってコロナウイルス感染症2019（「COVID-19」と略される）と命名された。COVID-19は、コロナウイルス株SARS-CoV-2によって引き起こされる。その前身であるSARS-CoV-1及び中東呼吸器症候群ウイルスMERS-CoVと同様に、SARS-CoV-2はベータコロナウイルスである。COVID-19に対しては利用可能なワクチンも治療もまだない。宿主細胞へのウイルス侵入を標的とする抗ウイルス薬は、広範囲のウイルス性疾患に対して有効であることが証明されている。

40

【0074】

標的細胞へのコロナウイルス侵入経路

コロナウイルスは、宿主細胞の細胞質へのアクセスを得るためにI型融合機序（type

50

I fusion mechanism) を使用する。I 型融合機序を使用する他の病原性ウイルスとしては、HIV、パラミクソウイルス及びニューモウイルスが挙げられる。ウイルスエンベロープと宿主細胞膜との融合が、三量体ウイルス融合タンパク質の重大な構造再編成によって駆動され；再編成プロセスを阻害することによって感染を抑止することができる。

【0075】

コロナウイルスによる感染は、ウイルスエンベロープと細胞膜との間の膜融合を必要とする。細胞型及びコロナウイルス株に応じて、融合は、細胞表面膜又はエンドソーム膜のいずれかで起こり得る。融合プロセスは、各単量体がいくつかのドメインを有する、大型ホモ三量体としての約1200残基の重グリコシル化I型内在性膜タンパク質である、ウイルスエンベロープ糖タンパク質(S)によって媒介される(図1、図2)。ウイルス膜の遠位にある受容体結合ドメイン(RBD)が、細胞表面付着を担う。膜融合は、近位細胞融合ドメイン(FD)によって媒介される。融合には、RBD及びFDによる協調作用が必要である。ウイルスが付着(及びある特定の場合には取り込み)すると、タンパク質リフォールディングを直接的に膜融合に結び付けるエネルギー的に安定な6ヘリックスバンドル(6HB)の形成によって駆動される、FDにおける大規模な立体構造再編成を、宿主因子(受容体及びプロテアーゼ)が誘起する。FDは、融合阻害ペプチドによって標的とされ得る高度に保存された三量体コイルドコイルコアで構成されるトランジェントなブレヘアピン中間体を形成すると考えられている(C末端ヘプタッドリピート、Cペプチド、又はHRCペプチドと呼ばれる)。

【0076】

インフルエンザHAと同様に、このSはビリオン表面上に三量体として存在し、付着、受容体結合及び膜融合を媒介する。これまでに識別されたベータコロナウイルスSタンパク質の宿主細胞受容体には、SARS-CoV-1に対するアンジオテンシン変換酵素2(ACE2)及びMERS-CoVに対するジペプチジルペプチダーゼ-4(DPP4)が含まれる。SARS-CoV-2は、侵入のためにヒトアンジオテンシン変換酵素2(hACE2)を使用することが分かった(そしてまだ知られていない他の受容体も使用し得る)。Sは、宿主プロテアーゼによって切断され、S₁及びS₂を生成する。受容体によるプライミング及び切断が共に膜融合に必要である。

【0077】

ウイルス侵入経路及び阻害戦略

膜融合をもたらす融合タンパク質の一連の立体構造変化を開始させる活性化工程は、ウイルスが細胞に侵入するために使用する経路に応じて異なる。多くのパラミクソウイルスでは、受容体結合時に、付着糖タンパク質が融合タンパク質(F)を活性化して、中性pHにおいて細胞表面でその融合準備のできた立体構造(fusion-ready conformation)をとる。本発明者ら及びその他は、(細胞膜で融合する)これらのウイルスについて、融合タンパク質エクトドメインのHRC領域に由来するCペプチドが様々な活性でウイルス侵入を阻害し、脂質コンジュゲーションがそれらの抗ウイルス効力を顕著に増強し、同時にそれらのインビボ半減期を増加させることを示してきた。脂質コンジュゲート融合阻害ペプチドに原形質膜を標的とさせることによって(By targeting lipid-conjugated fusion inhibitory peptides to the plasma membrane)、また増加したHRNペプチド結合親和性を設計することによって、本発明者らは抗ウイルス効力を数log増加させた。細胞表面上の脂質コンジュゲート阻害ペプチドは、ウイルス融合の膜部位を直接標的とする。ポリエチレングリコール(PEG)リンカー(PEG4など)を脂質部分とペプチドとの間で化合物に付加することによって、本発明者らはコンジュゲートの広域スペクトル活性及び効力をさらに増加させた。本出願の目的のために、「リンカー」及び「スペーサー」という用語は互換的に使用される。本発明者らは、ゴールデンハムスター及び非ヒト霊長類における致死性ニパウイルス感染、マウス及びコットンラットにおける麻疹ウイルス感染、並びにコットンラットにおけるヒトパラインフルエンザウイルス3型感染に対する脂質コンジュゲート融合阻害ペプチドのインビボ有効性を実証した。

【0078】

細胞膜で融合しないウイルスの場合、Cペプチドの標的にはアクセスできないと一般的に考えられている。これらのウイルスの例は、インフルエンザウイルス及びエボラウイルスである。インフルエンザの融合タンパク質（ヘマグルチニンタンパク質；HA）及びエボラの融合タンパク質（GP）は、細胞内内部移行後にのみ融合するように活性化される。本発明者らは、インフルエンザHAに由来する本発明者らの脂質コンジュゲートペプチドがインフルエンザによる感染を阻害することを示し、脂質コンジュゲーションに基づく戦略が、細胞内部で融合するウイルスに対する融合阻害ペプチドの使用を可能にすることを示唆した。本発明者らがインフルエンザに採用した第2の戦略は、細胞内標的の阻害を増強するためのHIV-TAT（周知の細胞膜透過性ペプチド、CPP）の付加である。これらの2つの戦略の組み合わせにより、HA由来ペプチドは、インフルエンザウイルスのヒト株に対してインビボで有効となる。

10

【0079】

同様の戦略により、エボラ感染に対して有効な抗ウイルスCペプチドが得られた。図3に、エボラウイルス侵入のプロセスを示す。エボラGP₂融合をもたらす活性化工程は、後期エンドソームとリソソームとの間で起こる。エボラGP₂では、HRN領域及びHRC領域は、CX₆CCモチーフ及び内部融合ループを含む25残基リンカーによって接続されている。エボラGP₂の融合コアの構造研究により、抗ウイルス薬としてのGP₂Cペプチドの提案された使用が導かれた。しかしながら、エボラ（EBOV）Cペプチドは、その標的がエンドソーム内でのみアクセス可能であり、細胞表面ではアクセス可能でないという考えと一致して、低い効力を示した。エボラ融合阻害剤へのCPP HIV TATのコンジュゲーション（局在を増強しようとした試みにおける）が、その抗ウイルス活性を改善し、約50 μMのIC₅₀値をもたらした。この情報に基づいて、脂質コンジュゲートインフルエンザHA由来ペプチドという本発明者らの発見と組み合わせて、本発明者らは表1に記載されるザイル（Z）EBOV GP₂由来Cペプチドを合成した。本発明者らは、脂質部分とペプチドとの間に挿入されたポリエチレングリコール（PEG）スペーサーが、増強された広域スペクトル活性及び効力をもたらすことを示した。脂質部分及びPEG4スペーサーは、CペプチドのC末端に位置する。本発明者らのインフルエンザ研究で、本発明者らは、抗ウイルスペプチドへのトコフェロール部分の付加がペプチドのインビボ効力を増加させることを見出したので、本発明者らは抗エボラCペプチドの設計にトコフェロール（Toc）を使用した。

20

30

【0080】

原理の証明：融合脂質－ペプチド

コロナウイルスに対するCペプチド融合阻害剤の開発における主要な課題は、コロナウイルスのウイルス侵入がいくつかの侵入経路をたどりうることであろう（図2）。一部のコロナウイルス株は細胞表面で融合することができるが、いくつかの他の株は最初にエンドサイトーシスを起こし、エンドソームで融合が誘起される。場合によっては、S切断部位及び標的宿主細胞プロテアーゼに応じて、同じ株が異なる経路を介して侵入することができる。ウイルスは、細胞表面又は細胞内部で融合することができる。

【0081】

このため、コロナウイルスに対する侵入阻害剤の設計は難題である。本発明者らは、エンドソーム局在を促進する細胞膜透過性ペプチド及び脂質部分を付加することで抗ウイルス効力が増加するかどうかを調査した。

40

【0082】

HRCペプチドは、プレヘアピン中間体に結合することによってウイルス融合及び侵入をドミナントネガティブ様式で阻害し、6HBの形成を妨げる。細胞膜で融合（早期侵入）する株の場合、追加の成分なしのHRCペプチドがウイルス侵入を妨げることができるが、これらのペプチドは、エンドソームで融合（後期侵入）する株には無効である。Sの細胞内隔離は、エンドソーム融合コロナウイルス株に対するHRCペプチド融合阻害剤の開発を困難にする可能性がある。SARS-CoV-2を含むエンドソーム融合コロナウイルスを標的とするために、証明されている脂質修飾及びペグ化戦略に加えて、本発明者

50

らは、細胞膜透過性ペプチド配列（図4のCPP）を組み込んで、それらのエンドサイトーシスをさらに促進した。

【0083】

脂質コンジュゲート阻害ペプチドに関する以前の研究で、脂質がペプチドを細胞膜に向かわせ、抗ウイルス有効性を高めることが実証されている。これらのコンジュゲートペプチドは、公開された研究において、コロナウイルスの早期侵入株及び後期侵入株の両方を阻害することが示されている（図5）。

【0084】

標的細胞膜で融合するウイルスの場合、HRCペプチドへの脂質コンジュゲーションは、抗ウイルス効力及びインビボ半減期を著しく増加させる。脂質コンジュゲーションはまた、エンドサイトーシスを介して取り込まれるまで融合しないウイルスに対する活性を可能にする。例えば、本発明者らは、MERSに由来する脂質コンジュゲートHRCペプチド（以下参照）がMERS感染を阻害することを示し、脂質コンジュゲーションに基づく戦略がエンドソーム膜との融合の阻害剤をもたらすことを示唆した。同様の戦略が、後期エンドソームとリソソームとの間で融合する、エボラ感染のための有効な抗ウイルスペプチドをもたらした。これらの脂質-ペプチドは、ウイルス「の後について」細胞内区画に入る。

10

【0085】

本発明者らは、肺内投与後にインビボで有効であることが示されたペプチド配列に基づいて、MERS-CoV特異的脂質コンジュゲートペプチドを設計及び作製した。2014年に、本発明者らの設計によって作製されたこれらのペプチドを、インビトロ（図6）及びインビボ（図7）でMERS-CoVに対して試験した。脂質部分は、融合アッセイにおいてペプチドの効力を増加させ（図6）、それらのインビボ活性を増加させた（図7）。より最近、Gallagherのグループが、脂質コンジュゲーション（本発明者らのペプチドを使用）がMERS-CoV由来ペプチドの抗ウイルス効力を最大1000倍増加させ、原形質膜及びエンドソーム区画の両方でCoV侵入阻害をもたらすことを見出した。

20

【0086】

原理の証明：インビトロでの生エボラ感染力の阻害

本発明者らは、UTMBのBSL4施設と協力して、インビトロでの生ZEBOV感染に対する上記Cペプチドの有効性を比較した（表1）。同じHRドメインに由来するがTAT（CPPモチーフ）配列を有さない対照エボラCペプチドは、脂質コンジュゲートした場合であっても効果がなかった（100 μ Mが試験された最高濃度であった）。したがって、エボラウイルスに対する阻害活性は、特に、TAT配列及び脂質コンジュゲーションの両方を必要とする。

30

【0087】

40

50

【表 1】

表 1：脂質修飾を有する EBOV ZAIR GP 由来ペプチドは生 ZEBOV 感染を阻害する。YGRKKRRQRRR 配列は HIV TAT 配列に対応する。3 連ウエルからのデータを 3 回繰り返した。

名称	配列及び修飾	インビトロでの生 ZEBOV	
		IC ₅₀ μM	IC ₅₀ μM
EBOLA	Ac-YIEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDK-GSSGG-C-NH ₂	>100	>100
EBOLA-dPEG4	Ac-IEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDK-GSSGG-dPEG4-C-NH ₂	~20	>100
EBOLA-dPEG4-Chol	Ac-IEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDK-GSSGG-dPEG4-C-(Cholesterol)	~10	>100
EBOLA-dPEG4-Toc	Ac-IEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDK-GSSGG-dPEG4-C-(Tocopherol)	~8	100
TAT-EBOLA	Ac-YGRKKRRQRRR-GSG-IEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDK-GSSGG-C-NH ₂	ND	ND
TAT-EBOLA-dPEG4	Ac-YGRKKRRQRRR-GSG-IEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDK-GSSGG-dPEG4-C-NH ₂	~10	>100
TAT-EBOLA-dPEG4-Chol	Ac-YGRKKRRQRRR-GSG-IEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDK-GSSGG-dPEG4-C-(Cholesterol)	~10	~100
TAT-EBOLA-dPEG4-Toc	Ac-YGRKKRRQRRR-GSG-IEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDK-GSSGG-dPEG4-C-(Tocopherol)	~0.8	~20

【0088】

原理の証明：インビボでのマウス適応（MA）－ZEBOVの阻害：

表 1 の 3 種の C ペプチド阻害剤（強調表示）を、最初に、忍容性の問題なしに、腹腔内（i. p.）送達によって 14 日間、20 mg / ml でマウスにおける急性毒性について試験した。マウス薬物動態試験により、血漿中の脂質コンジュゲート C ペプチド阻害剤の存在が少なくとも 24 時間確認された。図 8 に示されるインビボ試験のために、動物に 100 LD₅₀ のウイルスを感染させた。本発明者らは、5 ～ 6 週齢の BALB / c マウス、1 群当たり 5 匹を、感染後－1 日目から 15 日目まで 10 mg / kg i. p.（1 匹当たり約 100 μ l の等張水溶液）で処置した。全ての感染動物が有意な体重減少を示し

10

20

30

40

50

たが、T A T - E B O L A - d P E G 4 - T o c ペプチドで予防的に処置された 5 匹のうちの 4 匹が感染を生き延びた（未処置群のなしと比較して）。脂質を含まない T A T - E B O L A d P E G 4 は、5 匹のうちの 2 匹を部分的に防御した。コレステロールコンジュゲート C ペプチドで処置した動物は、いずれも生存しなかった。動物の対照群を、同じ T A T 配列、脂質部分、及び P E G リンカーを有する H P I V 3 C 由来ペプチドで処置した。生存している動物を再曝露したところ、全ての動物が 2 回目の曝露を生き延びたことから、C ペプチド融合阻害剤による処置が防御免疫の発達を可能にしたことが示された。

【0089】

原理の証明：脂質コンジュゲート阻害ペプチドは細胞内部移行を受ける

T A T E B O L A - d P E G 4 - T o c ペプチドはインビボで有効であるので（図 8）、本発明者らは、その細胞内局在が T A T - E B O L A - d P E G 4 - C h o l（又は他のペプチド）と異なるかどうかを求め、共焦点顕微鏡法を使用して細胞局在を分析した。ペプチド（D M S O に 1 0 0 0 μ M まで溶解）を P B S に 1 0 μ M まで希釈し、3 7 $^{\circ}$ C で生 V e r o 細胞に添加した。対照は、脂質を含まないペプチド、及び D M S O のみを含んでおり、ペプチドはビオチンコンジュゲート抗ペプチド抗体で検出した。T A T - E B O L A - d P E G 4 - T o c 処理細胞は、強い細胞内蛍光スポットを示す。E B O L A - d P E G 4 - C h o l（T A T なし）は、最小限の細胞内部移行で細胞膜上に主に局在する；T A T の付加によって、膜局在が増加し、部分的な細胞内局在がもたらされる。T A T - E B O L A - d P E G 4 は、脂質タグ付きペプチドと比較して、細胞膜及び細胞内部で非常に低いレベルでしか検出されなかった。図 9 は、T A T - E B O L A - d P E G 4 - T o c ペプチドが細胞内に局在することを示しており、G P 2 由来ペプチドがインビボで有効であるために細胞内局在を必要とするという本発明者らの仮説を裏付けている。インフルエンザ H A 由来ペプチド 1 1 でも同様の結果が得られ、脂質部分及び T A T がこれら 2 つのウイルスの細胞内局在の主要な駆動因子であることが示された。

【0090】

要約すると、本発明者らは、T A T 配列及び脂質部分の両方が、細胞内融合ウイルスの効率的な細胞内局在及びインビボ有効性を促進し、両方が様々な組み合わせでコロナウイルスに有用となり得ることを示した。科学的前提：標的細胞へのコロナウイルス侵入経路は乱雑（promiscuous）である。

【0091】

実施例 2 S A R S - C o V H R C 抗ウイルスペプチドの設計

改善された阻害性 S A R S - C o V - 2 S 特異的 C ペプチドの設計、作製及び特徴解析

本発明者らは、M E R S を有効に阻止する脂質派生体化 M E R S - C o V - S 由来侵入阻害剤を識別した（図 6 及び図 7 参照）。C ペプチド阻害剤を、S A R S - C o V - 2 に対する有効性のために設計及び最適化する。融合遮断がエンドソームにおいて起こることを考えると、ペプチドが最適な細胞内局在及びインビボ有効性を達成するためには、C P P 配列及び脂質コンジュゲーションの両方が必要である。本発明者らは、インフルエンザ及びエボラについてこの仮説の実験的証拠を提供する。他の箇所でも論じられるように、コロナウイルスについては、融合が細胞膜又は細胞内局在後のいずれかで起こり得る。C P P の付加及び脂質部分の修飾によるエンドソーム局在の改善が S A R S - C o V - 2 に対する抗ウイルス効力を増加させるかどうかを試験する。

【0092】

S A R S C o V - 2 S タンパク質の H R C ドメインの配列

S A R S - C o V - 2 6 H B 集合体（図 1 2）は、S A R S - C o V - 2 膜融合の骨格修飾阻害剤を設計するための優れた基礎を提供する。H R C ドメインは、中心の 5 ターン α -ヘリックス及び両側のヘリックスに隣接する拡張領域を特徴とする。天然 H R C ドメインは、S A R S - C o V - 2 S タンパク質の残基 1 1 6 8 ~ 1 2 0 3 に対応する。

【0093】

ペプチド D - 1（図 1 3）は S A R S - C o V - 2 H R C ドメイン（S A R S - C o V - 1 H R C ドメインと同一）に対応し；X i a らは最近、D - 1 がシュードウイルス

10

20

30

40

50

に基づく細胞アッセイにおけるSARS-CoV-2感染の弱力な(modest)阻害剤であることを報告した(IC₅₀約1 μM)。中心αヘリックスを形成する残基が示される。提案されるペプチドD-2は、D-1に対して2つの変更：ヘリックスの溶媒に面する側に沿った、交互のカチオン性側鎖及びアニオン性側鎖(alternation of cationic and anionic side chains)をもたらす、Lys118からGluへの変更及びAsp1184からLysへの変更、を含む。したがって、D-2は、ヘリックス23を安定化する一連のイオン対を特徴とするはずであり、本発明者らは、D-2がSARS-CoV-2感染の阻害剤としてD-1よりも優れていると予測する。D-3はMERS S H R Cドメインに対応し、D-4はSARS-CoV-2感染の阻害剤としてD-1に匹敵するD-3の派生体(derivative)である。

10

【0094】

一般的なアプローチを使用してこのプログラムで作製されたHRCベースのペプチドを評価する。円偏光二色性(CD)測定は、HRC派生体がHRNペプチドと共集合するかどうかを示し、そうである場合、集合安定性を評価する。有望なHRC派生体の場合、HRNペプチドとの共結晶化が、図12の構造と類似の構造を提供する。抗ウイルス活性を、最初に細胞アッセイで評価し；有望な候補をヒトエキソビボアッセイ及びげっ歯類インビボアッセイで評価する。

【0095】

20

30

40

50

【表 2】

構造誘導突然変異誘発の使用

表 2. 脂質がコンジュゲートされたエボラ GP₂ 由来ペプチドと、プラーク減少アッセイにおけるザイールエボラウイルスに対してのその IC₅₀

名称	配列及び修飾	MW	IC ₅₀ , μ M (95%CI)
TAT-EBO-dPEG4	Ac-YGRKKRRQRRR-GSG-IEPHDWTKNIDKIDQIHDFVDK-GSGSG-dPEG4-C-NH ₂	5212	>50
TAT-EBO-PEG4-Chol	Ac-YGRKKRRQRRR-GSG-IEPHDWTKNIDKIDQIHDFVDK-GSGSG-dPEG4-C-(Chol)	5827	0.05 (0.029 - 0.071)
TAT-EBO-PEG4-Toco	Ac-YGRKKRRQRRR-GSG-IEPHDWTKNIDKIDQIHDFVDK-GSGSG-dPEG4-C-(Toc)	5873	0.70 (0.43 - 1.121)
TAT-EBO-PEG4-Chol	Ac-YGRKKRRQRRR-GSG-IEPHDWTKNIDKIDQIHDFVDK-GSGSG-C-(PEG4-Chol)-NH ₂	5827	0.09 (0.055 - 0.153)
Chol-PEG4-TAT-EB0	C-(Chol-PEG4)-YGRKKRRQRRR-GSG-IEPHDWTKNIDKIDQIHDFVDK-NH ₂	5785	0.07 (0.031 - 0.158)*
TAT-EBO-PEG24-Chol	Ac-YGRKKRRQRRR-GSG-IEPHDWTKNIDKIDQIHDFVDK-GSGSG-C-(PEG24-Chol)-NH ₂	6709	0.51 (0.280 - 0.946)
Chol-PEG24-TAT-EB0V	C-(Chol-PEG24)-YGRKKRRQRRR-GSG-IEPHDWTKNIDKIDQIHDFVDK-NH ₂	6667	3.04 (1.329 - 6.945)*

【0096】

ここで論じる SARS-CoV-2 の研究を支持する一例としての、EBOV C ペプチド融合阻害剤の抗ウイルス効力及びバイオアベイラビリティを最適化するための構造誘導突然変異誘発及びタンパク質工学の使用。本発明者らは、脂質部分（C 末端又は N 末端のいずれか）及び／又はポリエチレングリコール（PEG）スペーサー（サイズ及び起源）に修飾を有するいくつかのペプチドの IC₅₀ を評価した。結果を上記の表 2 に示す。

【0097】

本発明者らはまた、エボラウイルスのいくつかの株を使用して表 3 のデータを拡げた。予備データは、いくつかのエボラウイルス株に対してナノモル範囲内で効力があることを

10

20

30

40

50

示す（表 3 参照）。

【 0 0 9 8 】

【表 3】

表 3. 天然エボラウイルスに対しての、脂質コンジュゲート G P₂ C ペプチド阻害剤の活性

ペプチド	ZEBOV Mayinga		ZEBOV Guéckedou C07		Bundibugyo EBOV	
	IC ₅₀ (μM)	最大阻害%	IC ₅₀ (μM)	最大阻害%	IC ₅₀ (μM)	最大阻害%
TAT-EBO-PEG4-Chol	0. 05	97. 9	0. 02	97. 5	0. 07	98. 5
TAT-EBO-PEG4-Toco	0. 70	96. 9	0. 10	100	0. 31	100

10

【 0 0 9 9 】

本発明者らが設計した新たに識別された配列を生ウイルスに対して試験した（以下の表 4 参照）。生物物理学的データに基づいて、配列 I E P（表 2 で強調表示）を I A A I L P（表 4 で強調表示）に改変した。本発明者らの仮説に反して、T A T－E B O－I A A I L P－P E G 4－C h o l（表 4 参照）は、同様の構造（P E G 4 及びコレステロール）を有する T A T－E B O－P E G 4－C h o l 及び T A T－E B O－d P E G 4－C h o l（表 2 参照）の両方よりも約 1 0 倍高い、0 . 6 μ M の I C₅₀ を有していた。本発明者らは、配列改変が抗ウイルス活性に有害であると結論付けた。しかしながら、本発明者らは、P E G 4 リンカーなしの T A T－E B O－I A A I L P－C h o l が、これまでに識別された最も強力なペプチドよりも約 2 0 倍優れた、3 n M の I C₅₀ を有することを見出した。さらに、I C₉₀ は 2 7 n M－この時点までの本発明者らの最良のペプチドの I C₅₀ のおよそ半分であった。

20

【 0 1 0 0 】

30

40

50

【表 4】

ペプチド名	配列及び修飾	IC ₅₀ (μM)	IC ₉₀ (μM)
TAT-EBO-IAAILP-Chol	Ac-YGRKKRRQRRR-GSG-IAAILPHDWTKNITDKIDQIHDFVDK-GSGSG-C-(Chol)-NH ₂	0.003	0.027
TAT-EBO-IAAILP-PEG4-Chol	Ac-YGRKKRRQRRR-GSG-IAAILPHDWTKNITDKIDQIHDFVDK-GSGSG-C-(PEG4-Chol)-NH ₂	0.609	0.733
EBO-IAAILP-Chol	Ac-IAAILPHDWTKNITDKIDQIHDFVDK-GSGSG-C-Chol-NH ₂	>10	-
EBO-IAAILP-PEG4-Chol	Ac-IAAILPHDWTKNITDKIDQIHDFVDK-GSGSG-C-(PEG4-Chol)-NH ₂	>10	-

表 4. 野生型 EBOV M a y i n g a に対する修飾ペプチドの活性

【0101】

本発明者らは、TAT-EBO-Chol（表 2 の元の配列であるが PEG がない）を調製した。本発明者らは元の配列を試験し、それを図 15 B の新たな修飾配列と比較した。PEG 4 なしの TAT-EBO-Chol は、TAT-EBO-PEG4-Chol よりも有意に強力である（表 2 参照）が、PEG 4 リンカーなしの TAT-EBO-IAAILP-Chol は、本発明者らがこれまでに設計した最も強力なペプチドである。データは、配列改変及び PEG 除去の両方が効力の増加に寄与していることを示している。

【0102】

実施例 3 SARS-CoV HRC ペプチドのさらなる修飾

有効性と細胞内標的化とを改善するための、脂質及び細胞膜透過性ペプチド配列の付加

本発明者らは、SARS-CoV-2 S 特異的 C ペプチドを設計した（図 11 参照）。合計 5 つの重複 C ペプチド（SARS-CoV-2 S HRC ドメインから）を合成する（細胞膜透過性ペプチドあり及びなし）。広域スペクトル活性 1 を有することが上で示された MER S 配列（TAT をあり及びなし）を含める。SARS-CoV-2 融合を阻害する別の広域スペクトル HRC 由来配列（EK1、TAT あり及びなし）も含める（この配列は本発明者らの MER S 配列との 5 aa の相違を有する）。これらの 14 個のペプチド（レギュラー 7 つ及び TAT あり 7 つ）を最初に 2 つの脂質とコンジュゲートする。2 つの脂質は、(i) コレステロール（最も強力な MER S ペプチドはコレステロールコンジュゲートであるので、図 6 参照）及び (ii) トコフェロール（トコフェロールコンジュゲーションは、TAT 配列と組み合わせると、エボラ及びインフルエンザについてインビボで最も強力なペプチドをもたらしたので、表 1）とする。PEG 4 リンカーを使用する（図 8 及び図 11 において上に示されるペプチドのように）。この 28 個のペプチドのセット（14 個のペプチド × 2 つの脂質）を、（上記の発明者らの研究及び融合アッセイのように）VSV シュードタイプウイルスに基づく系を使用して CUMC で試験する。最も有効な 10 個のペプチドを、生 SARS-CoV-2 試験（Vero 細胞におけるブラック減少アッセイ及び Calu-3 細胞における確認）のために UTM B に送る。この予備スクリーニングの結果は、機序試験及び広域スペクトル評価に進む 5 つの最も強力なペプチドの選択を導く。これらの 5 つのペプチドはまた、エンドソーム局在及びエキソビボ有効性にも進む。

10

20

【0103】

これらのデータは、7 つの配列（上記の図 11 の 5 つ及び広域スペクトル活性を示した 2 つの MER S 系ペプチド）の中で最も有効な HRC S 由来 aa 配列に関する情報を提供する。

【0104】

単層細胞培養物におけるペプチド毒性の評価：以前の研究⁵と同様に、5 つのペプチドを毒性について評価する。毒性を V y b r a n t（登録商標）MTT 細胞増殖アッセイ（Invitrogen）によって評価する。

【0105】

実施例 4 細胞培養物における HRC 由来ペプチドの有効性の評価

Calu-3 細胞で確認して、最初に Vero 細胞で SARS-CoV-2 感染を実施し、これらの細胞で生ウイルスに対する有効性を示すペプチドを HAE（商業的に入手）での実験に移す。ペプチド阻害剤の段階希釈物を感染前又は感染後のいずれかに添加して、ウイルス侵入防止におけるペプチドの効果、及びペプチドが感染後に組織内のウイルス拡散を阻止するかどうかを評価する。さらに、本発明者らは、確立されたプロトコルを使用して、ペプチドの毒性の証拠について HAE 組織を試験する。本発明者らは、約 5 個以下のペプチド阻害剤を使用してエキソビボ活性を試験する。本発明者らは、HAE が融合阻害ペプチド活性を評価するための理想的なモデルであることを示した。本発明者らはまた、最近、ヒト発達肺オルガノイドモデルが発達中の肺を表し、呼吸器感染症のいくつかの態様をモデル化することができ、将来このモデルを SARS-CoV-2 に使用することができることを示した。これら 2 つのモデルを、SARS-CoV-2 に対するペプチド有効性を評価するための本発明者らの公開された研究と同様に使用する。HAE（又は将来の研究ではオルガノイド）における増殖から出現するウイルスを配列決定して、本発明者らが以前に行ったように進化を評価し、出現するペプチド耐性変異株を評価する。

30

40

【0106】

中東呼吸器症候群（MER S-CoV によって引き起こされる MER S）は、2012 年に初めて報告された際、ヒトにとって新規な呼吸器疾患である。本発明者らは、肺内投与後にインビボで有効であることが示されたペプチド配列に基づいて、いくつかの MER S-CoV 特異的脂質コンジュゲートペプチドを設計及び作製した。

【0107】

50

2014年に、本発明者らによって設計されたこれらのペプチドを、融合アッセイ（図6）及びインビボ（図7）でMERSCoVに対して試験した。これらの所見は、侵入ウイルスがCoVスパイク指向性膜融合を活性化することが知られている細胞プロテアーゼによって標的とされた後であってもMERSC脂質-ペプチドが有効であることを実証した。これらの所見は、C脂質ペプチドがCoV侵入を阻止するためにエンドソームに蓄積しなければならないかどうか、及び抗CoV活性のスペクトルがCoV膜融合のタンパク質分解活性化のための要件に関連するかどうかに関して疑問を提起する。注目すべきことに、カモスタット及びナファモスタットなどのセリンプロテアーゼ阻害剤がSARS-CoV-2の有用な阻害剤となり得ることを示唆する新たな報告がある。これらのセリンプロテアーゼ阻害剤はCoV融合活性化を抑止する又は遅延させるので、同じ応答をもたらすが機序的に異なる様式でC脂質-ペプチドと相乗作用し得る。

10

【0108】

本発明者らは最近、SARS-CoV-2 Sタンパク質を使用した融合アッセイにおいてこれらのMERSC由来ペプチドを試験した。細胞膜透過性配列がなくても、脂質部分の付加によって、融合アッセイにおけるペプチドの効力が増加した（図14）。この実験において、本発明者らは、最良のペプチド（コレステロールコンジュゲート）が約33nMのIC50及び200nMのIC90を有することを見出した。IC50及びIC90は、同様のアッセイにおいて本発明者らの麻疹ペプチドよりも優れている。これらの麻疹ペプチドは、予防的に与えることができ、鼻腔内投与された場合、インビボで感染を阻止することができる。

20

【0109】

細胞培養物において、生ウイルス及び本発明者らのMERSC脂質-ペプチドを使用して、SARS-CoV-2感染の100%の減少が観察された（図15A）。Vero-E6細胞におけるプラーク減少中和試験では、細胞を、ペプチドを用いて又は用いないで感染させ、感染3日後にプラークを計数した。結果を、ペプチドとインキュベートしなかったウイルスと比較した減少パーセントとして表す。値は3連ウェルからの平均±標準偏差である。同様の設定を利用して、上に論じられるTAT-EBO-Chol融合物を試験し（表2～表4）、結果を図15Bに示す。

【0110】

SARS-CoV-2に基づく脂質-ペプチドは、MERSC脂質-ペプチドよりもさらに有効であった。

30

【0111】

示されるペプチドによるSARSCoV-2糖タンパク質融合の阻害

示される突然変異及びβ-ガラクトシダーゼのα-サブユニットを有するSARSCoV-2糖タンパク質を発現する293T細胞と、β-ガラクトシダーゼのω-サブユニットでトランスフェクトされており、且つA)トランスフェクトされたhACE2受容体を有する、又はB)トランスフェクトされたhACE2受容体を有さない、293T細胞と、の細胞間融合を、濃度が上昇する、示されるペプチドの存在下で、β-Gal相補アッセイによって評価した。β-ガラクトシダーゼから得られた発光を、Tecan Infinite M1000 Proを使用して定量した。融合の阻害パーセント（ペプチドで処理していない対照細胞についての結果と比較）を、ペプチドの濃度の関数として示す。値は1つの実験からの結果の平均（±SD）である。ペプチドの配列を以下の図に示す（図18）。

40

【0112】

SARSC脂質-ペプチドは、SARSC生ウイルスに対して有効であった。IC50は約5～10nMと推定され、必要なレベルが人において達成可能であることを示している。注目すべきことに、図20は、MERSCウイルス及びSARSCウイルスの両方がプロトタイプSARSCペプチドによって阻害されることを示している。

【0113】

実施例5 抗ウイルス活性及びCペプチド融合阻害剤に対する耐性の分子基盤を試験する

50

ためのエキソピボ抗ウイルス活性及びウイルス進化実験

自然宿主における感染の決定因子を理解するために、本発明者らは、極性及び細胞特異性を特徴解析するために使用されているHAEモデルを使用する。本発明者らは、パラインフルエンザ感染についてこのモデルを使用し、これがヒト肺におけるウイルス-HAE相互作用を反映することを確認した。本発明者ら及びその他は、不死化単層細胞の結果がインピボに移行された場合に適用可能でない可能性があることを実証しており、したがって、天然宿主をより厳密に表すモデルにおいて本発明者らの仮説を試験することが重要である。HAEは、臨床シナリオを再現する実験において野外分離株を評価するのに理想的である。

【0114】

ヒト気道上皮(HAE)は、大部分が気液界面で成長した大きな気道組織からなる(図21)。本発明者らは、パラインフルエンザウイルスを含む他のウイルスについての信頼すべきウイルス増殖及び抗ウイルス評価のためにヒト肺モデルを検証した(図22)。SARS-CoV-2実験のために、HAEを、EGFPを有するSARS-CoV-2に感染させて感染を可視化した(図23)。対照組織は処置せず、治療組織は、感染の開始後、200nmにおいてSARS-CoV-2 HRCで処置した。HRC処置は感染を有効に除去した。

【0115】

本発明者らはまた、ヒト肺オルガノイドをモデルとして利用することができる(図24)。両方のヒト肺エキソピボモデルを、信頼すべきウイルス増殖及び抗ウイルス評価について検証した。(HAEは既にSARS-CoV-2で検証されており、オルガノイドは図のようにRSV、インフルエンザ、パラインフルエンザで検証されており、SARS-CoV-2で試験する)。

【0116】

HIV-1に対するFuzeon(著作権)の臨床使用は、薬剤耐性HIV-1変異株の出現をもたらした。エスケープ変異ウイルスはまた、Fuzeon(著作権)の存在下でのHIV-1のインビトロ継代の際にも出現した。耐性ウイルス集団は、3つのHRNアミノ酸の高度に保存された伸長、グリシン-イソロイシン-バリン(GIV)内で突然変異を獲得した。このGIVモチーフの耐性突然変異は、Fuzeon(著作権)療法の患者のウイルス準種内にも存在する。耐性は、ウイルスHRNとFuzeon(著作権)との間の相互作用の減少、又はウイルスHRNとHRCとの間の相互作用の増加のいずれかによるものであった。融合のキネティクスの増加は、耐性をもたらしたのみならず、増殖が薬物に依存するウイルスももたらした。抗SARS-CoV-2療法はHIVよりも短期間である(急性疾患治療vs.慢性疾患治療)が、インフルエンザの場合と同様に、耐性が臨床的に重要となり得る。HIV及びインフルエンザにおける結果に基づいて、耐性の出現に関するインビトロデータは、治療の選択圧下でのウイルスのインピボ挙動に直接適用され、耐性を予測し、Cペプチド融合阻害剤設計を先制的に改善するために使用することができる。

【0117】

戦略：SARS-CoV-2感染をHAEで実施する。近年、EGFP遺伝子を有する組換えSARS-CoV-2ウイルス(EGFP-SARS-CoV-2)が作製されている。このウイルスを使用して、Cペプチドの選択圧下でリアルタイムでウイルス進化を監視する。ペプチド阻害剤の段階希釈物を感染前又は感染後のいずれかに添加して、(i)ウイルス侵入防止におけるペプチドの効果；(ii)ペプチドが感染後に組織内のウイルス拡散を阻止するかどうかを評価する。さらに、本発明者らは、確立されたプロトコルを使用して、ペプチドの毒性の証拠についてHAE及びオルガノイド組織を試験する。HAEにおける抗ウイルス活性の評価後、最適化されたCペプチド融合阻害剤の選択圧下で感染を実施して、潜在的な耐性の分子基盤の分析；Cペプチド耐性ウイルスの進化の可能性の予測；及び耐性について選択する可能性が最も低いCペプチド融合阻害剤の識別、のために使用される情報を提供する。

10

20

30

40

50

【0118】

エキソビボ抗ウイルス活性：本発明者らは、HAEが融合阻害ペプチド活性を評価するための理想的なモデルであることを示した。このモデルを使用して、図23のように、SARSCoV-2に対してのCペプチドの有効性を評価する。これらのモデルにおける評価は、有効なヒトエキソビボモデル（HAE）において、エンドソーム局在がSARSCoV-2抗ウイルス活性に有益であるかどうかを決定することを可能にする。HAEからの上清流体を2つのアリコートに分け、qPCR／ゲノム配列分析及びウイルス力価のために処理する。

【0119】

耐性変異株の生成：本発明者らは、本発明者らの実験室で日常的に実施されるプロトコルを使用して、低分子の阻害効果に対する耐性のあるSARSCoV-2ウイルスを誘発することを試みる。手短に述べると、3～4日間、いくつかの濃度のCペプチド（IC₅₀の5倍～40倍の範囲）の存在下、HAE中でSARSCoV-2のいくつかの希釈物を継代する。最初の感染後にCペプチドを添加して、ウイルスポリメラーゼ複合体が複製され、選択のための表現型変異株を産生することを可能にすることに留意されたい。耐性ウイルスは、Cペプチドの存在下であっても拡散するであろう。ウイルスの収量をプラークアッセイ及び／又はqRT-PCRによって決定する。ウイルスが阻害剤の存在下及び非存在下で拡散するにつれて、阻害剤の濃度を徐々に増加させて耐性ウイルスの集団を得る。継代されたウイルスを配列決定すると同時に、プラーク減少アッセイにおいて阻害剤感受性について試験する。ウイルス進化のために選択圧を適用するこの戦略は、ノイラミニダーゼ耐性変異株及び低分子阻害剤耐性変異株について本発明者らの実験室で実施された有益な実験と同様である。

【0120】

インビトロでの耐性変異株の分析：（HAEによる）増殖の前及び増殖後の突然変異耐性ウイルスを配列決定する。本発明者らは、高深度の全ウイルスゲノムシーケンシングによって耐性ウイルス突然変異株を分析する。HAE増殖ウイルスの配列を、ウイルス進化の縦断的分析のために特別に作成されたカスタムバイオインフォマティクスソフトウェアを使用して、選択実験の期間中に生成された集団由来配列と比較する。このアプローチは、選択プロセス中又は後に共存し得る、ゲノムにわたって存在する潜在的に重要なウイルス亜集団又は対立遺伝子を見逃すことを防ぐだろう。本発明者らは、各変異株の適応度が親ウイルスの適合度と類似しているかどうか、又は変異株が生存能力のために阻害剤の存在を必要とするかどうか、を決定する。本発明者らは、広範な経験及び以前に検証された両方のアプローチを有し、対立遺伝子頻度が、イヌジステンパーウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス3（HPiV3）、及び呼吸器合胞体ウイルスなどのパラミクソウイルス科（Paramyxoviridae）による2つのアプローチに適合することを示している。ショットガンシーケンシングは、全てのRNAウイルスについて単純なワークフロープロトコルを可能にし、タイリングRT-PCRは、複雑な試料型からのウイルス配列の特異的選択を可能にする。本発明者らは、これらのウイルスを最小平均深度200Xまで配列決定し、対立遺伝子頻度4%超を有する全ての変異株を呼び出す。配列リードを、各試料のリードを0日／継代0ウイルスゲノム（day/passage 0 viral genome）のデノボアセンブリーコンセンサス参照に整列させる、ウイルス対立遺伝子の縦断的分析のための本発明者らのカスタム生物情報パイプラインを使用して分析する。

【0121】

Sが突然変異を含む場合、本発明者らは突然変異遺伝子を本発明者らの発現ベクターに導入し、本発明者らの機能アッセイにおいて糖タンパク質機能を評価する。複数の突然変異が見出された場合、部位特異的突然変異誘発を使用して、突然変異をSバックグラウンドに導入し、同じインビトロアッセイを使用して、単一突然変異遺伝子をそれらの表現型について分析する。突然変異の位置及び保存は、異なるペプチドに対する耐性機序が類似している程度を明らかにするだろう。異なるペプチドに由来する突然変異株が著しく異なる場合、本発明者らは各寄与を精査するために特定の突然変異の寄与を分析する。

【0122】

インビボでの耐性変異株の分析：本発明者らは、インビトロ及びエキソビボで良好に増殖する耐性変異株を識別した場合、それらのインビボ適応度を評価する。耐性変異株の病原性を親ウイルスとインビボで比較する。動物の総数は、耐性変異株の数に依存する。ここで耐性変異株及びペプチドの有効性を評価するために使用する1つのマウスモデルは、ヒトアンジオテンシン変換酵素2 (ACE2) トランスジェニックマウス (hACE2マウス) である。このモデルは、SARS-CoV-1の致死モデルであることが示されている。最近の報告は、SARS-CoV-2については、モデルが致死ではないが、体重減少及び病理学的徴候が観察されることを示している。肉眼病理学及び組織病理学の両方を、感染後3日目及び5日目の両方で容易に観察することができる。10⁶~10⁷ pfu/mlのウイルス力価が感染後1~3日後に得られた。本発明者らは、Jax実験室からこれらのマウスを事前注文しており、2020年6月にマウスが得られると予想している。この感染の動物モデルを使用して、ペプチド耐性変異株がwtに対して変化した病理学を引き起こすかどうか、及び耐性突然変異の結果としてそれらの適応度が減少又は増加するかどうかを評価する。hACE2マウスを抗ウイルス有効性の評価に使用する。本発明者らは、合計5つのウイルスに対して約4つの変異株ウイルス+1つのwtを試験することを予測する (1群当たり10匹；雄5匹及び雌5匹、合計n=50匹のマウス)。

10

【0123】

試料採取及び分析：組織病理学評価及びウイルス負荷 (qRT-PCRによる) のために、全ての主要器官の組織試料を各マウスから採取する。ウイルス分離を、qRT-PCRによってEGFP-SARS-CoV-2について陽性の標本からのみ行う。ウイルス滴度をブラックアッセイによって実施する。試料を配列決定してインビボでのウイルス進化も評価する。

20

【0124】

Sにおける配列変化は、機能的変化に関連付けられ、この情報を使用して耐性機序を理解する。パラインフルエンザの場合、融合キネティクスの増強はインビトロでペプチド阻害剤に対する部分的耐性をもたらしたが、本発明者らは、融合キネティクスを増加させる突然変異が天然の宿主組織における増殖に悪影響を及ぼすことを示した；これらの耐性突然変異はインビボでの適応度を有意に低下させる可能性がある。本発明者らは、耐性CoV変異株がインビボで病原性が低いと予想している。本発明者らは、抗ウイルス薬開発の早期にこれらの機序を評価することによって、より病原性の高いウイルスをもたらし得る抗ウイルス薬戦略の前進を回避することを提案する。変異株の生成の容易さ及び耐性突然変異を含むSARS-CoV-2の適応度を決定することによって、臨床的に関連する耐性変異株の進化の可能性を予測することが可能になる。耐性が4~5継代以内に獲得される場合、本発明者らは、併用治療が耐性に対するより高い障壁を提供するという仮説を試験するために、Cペプチドを他の箇所で論じられるプロテアーゼ阻害剤と組み合わせることを検討する。本発明者らはまた、耐性が誘発されない可能性も考慮する—これはありそうもないが—、これは、適応度コストが高すぎて、その特定のCペプチドに耐性のある生存可能な変異株が生成されないことを示唆するだろう。このようなCペプチドは、前進するための理想的な候補であろう。ここで得られた情報を使用して、耐性を誘発する可能性が最も低いCペプチドを選択する。エキソビボで有効であり、インビボで耐性を誘発する可能性が最も低いCペプチドをインビボ有効性について試験する。

30

40

【0125】

考察：主な焦点は、SARS-CoV-2ウイルスに対して有効なCペプチドを得ることであるが、同時にこれらの実験から、コロナウイルス科が1つのCペプチドによって阻害され得るかどうか分かる。本発明者らは、1つのペプチドがSARS-CoV-2及びMERSの両方を阻害することを既に示している (図20)。SARS-CoV-1のHRCはSARS-CoV-2と同じであるので、本発明者らはペプチドがSARS-CoV-1にも作用すると予想している。本発明者らは、これが広域スペクトルコロナウイ

50

ルス阻害剤が得られることを示唆すると主張する。本発明者らは、大流行での使用及び備蓄のための極めて有効な抗コロナウイルスペプチドを識別する。本発明者らは、Cペプチドの阻害活性の分子基盤の詳細な理解を得て、最適な阻害の基礎に対処する。これらの結果は、構造特性及び安定性特性と阻害効力との間の相関を明らかにし、ペプチド設計を導くために使用される。細胞内部のペプチド局在の決定因子を識別し、ペプチドのエンドソーム局在を増強するために活用する。本発明者らの出願の強みは、改善された融合阻害剤の特定の特性が、インビボ有効性を評価することによって試験されることである。その結果は、有効性、エンドソーム標的化及び毒性の欠如を支持する生化学的因子及び構造的因子並びに最適な製剤に対する我々の理解を、理想的な抗ウイルス化合物の設計のために使用することを可能にする。本発明者らは、耐性の分子基盤についての情報が得られると予想している。耐性突然変異株における配列変化は、機能的変化に関連付けられ、この情報を使用して耐性機序を理解する。耐性試験、特に耐性機序の理解は、基本的なコロナウイルス融合生物学への洞察を提供する。

10

【0126】

実施例6 SARS-CoV-2感染のマウスモデルにおけるペプチド融合阻害剤のインビボ効力の評価

本発明者らは、マウスにおける薬物動態試験及び安全性試験を行う。本発明者らは、識別されたインビトロ改善ペプチドが所望の血清半減期及び組織体内分布プロファイルを有するかどうか、並びにこれらがインビボで安全で忍容性が高いかどうかを決定する。本発明者らは、ヒトアンジオテンシン変換酵素2 (ACE2) トランスジェニックマウス50-52 (hACE2マウス) を使用して、インビボ抗SARS-CoV-2有効性を評価する。最近の報告は、SARS-CoV-2については、モデルが致死性ではないが、体重減少及び病理学的徴候が観察されることを示している (<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.07.939389v3>)。肉眼病理学及び組織病理学の両方を、感染後3日目及び5日目の両方で容易に観察することができる。106~107 pfu/mlのウイルス力価が感染後1~3日後に得られる。

20

【0127】

本発明者らは、脂質修飾がリードSARS-CoV-2融合阻害ペプチドの抗ウイルス有効性を増加させるだけでなく、ペプチド薬物の典型的に不十分な薬物動態も克服し、ペプチドの循環半減期を臨床的に有用なレベルまで延長することを示した。本発明者らは、抗SARS-CoV-2効力及びプロテアーゼ耐性を増加させるように設計された突然変異及び骨格修飾が、選択された改善されたSARS-CoV-2ペプチドの薬物動態特性に影響を及ぼす程度を決定する。本発明者らの目標は、改善されたペプチドがインビボで有効濃度に達することを確実にし、(i) 最小投与量及び(ii) それを維持するのに必要な投与頻度を評価することである。ここで、本発明者らはまた、潜在的な副作用及び薬物クリアランスのキネティクスを評価する。本発明者らのインビボパラミクソウイルス実験及び予備的薬物動態試験において、20 mg/kgで最大21日間治療したマウス及びハムスターで毒性効果が観察されなかったことは励みになる。

30

【0128】

本発明者らが同様のペプチド阻害剤について以前行ったように、マウスにおいて(又は以下に論じられる、本発明者らが有利であると考え他の動物モデルにおいて) 選択された改善されたペプチドの薬物動態(PK)を評価する。本発明者らは4つのペプチドを評価する。マウス(1群当たり6匹、性別を変数として捕捉するために雄3匹+雌3匹)に皮下(s.q.)、腹腔内(i.p.)、鼻腔内(i.n.)、及び(i.t.)注射する(最初に4つの経路全てを試験する)。本発明者らの予備データは、i.p.送達でMER5治療に有効であることを示している(図7参照)。ここで、本発明者らはi.p.をs.q.、i.n.及びi.t.と比較するが、これは後者の3つの送達経路が臨床用途に好ましいためである(i.n.は医療現場以外での予防に好ましいが、s.q./i.t.投与は、病気の患者又はi.n.投薬に耐えられない患者に使用することができる

40

50

）。動物に融合阻害ペプチド（6 mg / kg）を接種し、12時間後、24時間後、36時間後及び48時間後に殺す。本発明者らは、体内分布試験のためのELISA及び免疫蛍光を実施する。マウスにおけるSARS-CoV-2 HRCペプチド毒性の評価：急性、15日目及び慢性毒性。

【0129】

本発明者らの公開データは、ニパウイルス、麻疹ウイルス（MV）、及びインフルエンザに対するインビボでの脂質修飾ペプチドの予防有効性及び治療有効性の両方を示しており、エボラ（ここには示さず）及びMERS（図7）についての予備データもインビボでの脂質修飾ペプチドの有効性を示す。提案される曝露実験は、予防有効性のための最小必要用量及びペプチド阻害剤有効性のための治療時間枠を決定する。有効性を評価するために使用するマウスモデルは、他の箇所に記載されているhACE2マウス50-52である（<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.07.939389v3>）。この感染の動物モデルは、ウイルス複製及び拡散に対するペプチド有効性の評価に理想的である。必要に応じて、他の動物モデルを含める、又は置換する。

10

【0130】

ゴールデンハムスターにおけるニパ（致死性ウイルス）感染に対するインビボ有効性：脂質-ペプチドの2 mg / kg / 日の皮下送達が有効であった（図25）。

【0131】

ゴールデンハムスターにおけるニパ（致死性ウイルス）感染に対するインビボ有効性：脂質-ペプチドを鼻腔内投与した。1日前、その日、1日後の投与は、致死的な感染からの60%防御を提供することができる（図26）。

20

【0132】

インフルエンザ感染に対するインビボ有効性。ペプチドを、コットンラットにおいて1000倍低いウイルス価で1日前、その日、1日後の3回鼻腔内投与した（図27）。

【0133】

マウスの麻疹感染（致死性脳炎）を麻疹ペプチドを用いて予防することの、インビボ有効性。皮下投与及び鼻腔内投与の両方を調査した（図28）。

【0134】

hACE2受容体の異なる発現レベルでの定量的融合アッセイの比較。これらのデータ（図16の上側に示される）は、ACE2が少ない鼻／上気道においてペプチドが非常に有効であることを示している。

30

【0135】

好ましい毒性／体内分布プロファイルを有するインビトロで最も有効な2つのペプチド融合阻害剤を、hACE2マウスにおける、及び／又は他の関連する動物モデルが必要かつ有利になるのでこれらにおける、SARS-CoV-2感染において試験する。本発明者らは、最初に、感染前、感染と同時、又は感染最大10日後のi.n.ペプチド投与によって防御がもたらされるかどうかを決定し、最適な投与量を確認する。本発明者らは、これらのデータに基づいて、代替的送達経路（s.q.）を使用して予防試験及び治療試験に着手する。

40

【0136】

投与：2つの最適化されたペプチド阻害剤の最初のスクリーニングのため、及び最適用量を決定するために、10匹の動物の群を、3つの異なる用量のペプチドで、曝露の1日前、次いで、最大2日間にわたって毎日i.n.及びs.q.で治療する。感染を、105 TCID₅₀のSARS-CoV-2によりi.n.で実施する。

【0137】

有効性：本発明者らは、有効用量を決定したら、曝露後治療のための治療域を決定することに焦点をあてる。これは、大流行を管理するために重要であり可能性が高いであろう本製品の使用であるため、重要である。本発明者らは、感染の何日後にペプチド治療が防御を提供することができるかを決定する。VAの節を参照されたい。

50

【0138】

動物数：投与について：（2ペプチド＋スクランブル＋モック治療）×10匹のマウス×2接種経路×3用量＝240匹のマウス。有効性：2ペプチド×10匹のマウス×1接種経路×4時点＝80匹＋10匹の未治療マウス。

【0139】

肺からのウイルス負荷をブランクアッセイ及びqRT-PCRによって決定する。治療された動物及び未治療動物からの試料組織も配列決定のために送って、治療中にウイルス進化が起こったかどうかを決定する。

【0140】

モデルの読み取りは明確であり、統計学的に有意な群が形成される。両性別の動物を使用して、性別を変数として捕捉することを確実にする。本発明者らは、ペプチドの予防的投与が感染から防御すると予想している。ペプチドが曝露後レジメンにおいても有効であるかどうかを決定する。鼻腔内送達は、予防のためにうまく働く可能性が高いが、初期感染後にはs. q. がより良く働くことが可能であり、結果に応じて、本発明者らはs. q. 注射を介して曝露後に治療することを決定することができる。

【0141】

本発明者らは、ある特定の器官におけるペプチドの評価にはHPLC-MSでは検出限界が高すぎることを見出したので（データは示さず）、ペプチド濃度の定量はELISAによって行う。本発明者らのペプチドなどのブロック両親媒性物質は界面活性剤特性を有し、上皮刺激をもたらす可能性がある；したがって、毒性を試験することが重要である。毒性効果を示さないペプチドのみが有効性試験に進む。コロナウイルスの治療は短期間であると予想される；しかしながら、治療中に、治療に影響を及ぼし得る、ペプチドに対する抗体が産生され得る可能性がある。本発明者らは、ニパ感染ハムスター、麻疹感染マウス及びコットンラットを試験している間、このような効果を観察しなかった。治療に対する抗体拮抗作用の可能性を試験するために、本発明者らは、上に概説される毒性試験に使用した動物から血清を採取し、ペプチドの阻害活性との干渉を評価する。本発明者らは、hACEマウスにおけるSARS-CoV-2のインビボ感染の非致死性の説明が動物の老齢（6～11月齢）に起因し得る可能性を考慮する。本発明者らは、若齢マウスが致死感染モデルを可能にし得るかどうかを決定する。生存曲線は、有効性についてのより統計学的に有意な読み取りとなるだろう。

【0142】

これらの実験から、本発明者らは、現在循環しているCoVに対する有効なSARS-CoV-2阻害剤を有するかどうか（及びコロナウイルス科ウイルスが1つのペプチドによって阻害され得るか）を知るであろう。本発明者らは、ペプチド設計を導くのに有用な、ペプチドの阻害活性の分子基盤、並びに構造特性及び安定性特性と阻害効力との間の相関についての良好な理解を得る。提案された研究の結果として、本発明者らは、ここに提示されるデータ及び本発明者らの公開データに基づいて、有効な予防レジメンが達成されると確信している。感染後治療の開発はより困難である；しかしながら、予防自体が極めて重要である。医療従事者は、本発明者らの予防的アプローチが、容易に投与することができ（例えば、1日1回i. n.）、即時に及び少なくとも24時間有効である（長期ワクチン戦略に対して）から、この予防的アプローチから直接利益を得るであろう。リスクのある人々も、このような予防的治療から利益を得る。このプロジェクトの終わりに、本発明者らは、（1）SARS-CoV-2ペプチド融合阻害剤を識別しており、（2）インビトロ及びエキソビボでのこれらの抗ウイルス活性を最適化しており、（3）関連する動物モデルにおけるこれらの新規な融合阻害剤の有効性を試験しているだろう。

【0143】

実施例7 SARS-CoV-2 HRCペプチド融合阻害剤のインビボ体内分布及び毒性の分析

本発明者らは、SARS-CoV-2 Cペプチドの抗SARS-CoV-2効力、プロテアーゼ耐性、及び薬物動態特性を決定する。本発明者らの目標は、HRCペプチドが

インビボで有効濃度に達することを確実にし、(i) 最小投与量及び(ii) それを維持するのに必要な投与頻度を評価することである。ここで、本発明者らはまた、潜在的な副作用及び薬物クリアランスのキネティクスを評価する。

【0144】

本発明者らが同様のペプチド阻害剤について以前行ったように、マウスにおけるHRCペプチドの薬物動態(PK)を評価する。マウスにおける気管内(i. t.) 送達、i. n. 送達と比較して一貫した結果を提供し、これは体内分布試験に役立ち、必要に応じて気道を介した送達を表す予防試験に使用される。本発明者らは4つのペプチドを評価する。マウス(1群当たり6匹、性別を変数として捕捉するために雄3匹+雌3匹)に皮下(s. q.)、腹腔内(i. p.)、鼻腔内(i. n.)、及び(i. t.) 注射する(最初に4つの経路全てを試験する)。本発明者らの予備データは、i. p. 送達がMER S治療に有効であることを示している(図7参照)。本発明者らはここで、i. p. とs. q.、i. n. 及びi. t. を比較する。動物に融合阻害ペプチド(6mg/kg)を接種し、12時間後、24時間後、36時間後及び48時間後に殺する。血清及び器官(肺、肝臓、脾臓、及び脳)を採取する。器官を分割し、免疫蛍光のためにドライアイス上で冷イソペンタンにより凍結するか、又は半定量的ELISA分析のためにホモジナイズする。

10

【0145】

免疫蛍光：凍結切片を特定のウサギ抗SARS-CoV-2 HRC抗体(本発明者らが定期的に行っているように、契約会社を使用して作製する)で染色する。組織切片を、共焦点顕微鏡法を使用して分析する。

20

【0146】

体内分布試験のためのELISA：「BeadBug」ホモジナイザーを使用して器官をホモジナイズする。組織試料及び血清中のペプチド濃度を、本発明者らが5、7、8以前に行ったように決定する。試験試料と同じELISA条件を使用して、リードペプチドの標準曲線を確立する(これは本発明者らが以前使用したLC/MS/MSよりも感度が高いことに留意されたい)。

【0147】

マウスにおけるSARS-CoV-2 Cペプチド毒性の評価：本発明者らは、マウスにおける急性全身毒性試験(最良の体内分布プロファイルを有するペプチドについて)を行って、改善されたSARS-CoV-2ペプチドの毒性及び用量耐性を評価する。研究用に繁殖された(purpose-bred)非近交系マウス(n=6/群、雄3匹及び雌3匹)に、5、20又は200mg/kgの融合阻害Cペプチドの単回s. q. 注射を受けさせる。Harlan等容生理食塩水が対照として働く。生存及び/又は苦痛の徴候について動物を綿密に監視する。15日間の毒性試験のために、動物にペプチド(20mg/kg)を15連続日間s. q. 接種し、毎日監視する。慢性毒性のために、ペプチドを、30日間(すなわち、8回の接種)又は60日間(すなわち、16回の接種)、20mg/kgの用量で1週間に2回、マウス(n=6/群)にs. q. 及びi. n. 投与する。30日目及び60日目に、体重及び器官重量の測定及び肉眼的病理検査(記載通り；5、7、52~54)並びに組織病理学のために動物を殺する。対照群の平均と比較した治療群の平均の統計学的有意性を、一元配置分散分析、引き続いてPrismプログラム(Graphpad、サンディエゴ)を使用したDunnettの多重比較検定によって分析する。p<0.05の場合、差は統計学的に有意であると考えられる。

30

40

【0148】

これらの実験は、マウスにおけるSARS-CoV-2ペプチド阻害剤の治療用量及び全体的な体内分布についての有効半減期、並びに(本発明者らが予想するように)SARS-CoV-2ペプチド融合阻害剤が可能性の高い治療用量で非毒性であるかどうかを決定する。より強力な阻害剤は、より低い投与量を可能にする。毒性を示さないペプチドのみが有効性試験に進む。本発明者らは、異なる送達経路(s. q.、i. p.、i. t.、及びi. n.)の組み合わせが、最小限の有害な副作用で、体内分布プロファイルと使

50

用の容易さとの間の好ましいバランスをもたらし得る可能性を考慮する。粘膜表面への送達（例えば、i. n. / i. t.）は、予防的に治療する簡単で有効な方法となり、この戦略は、現場又は病院で適用可能となるだろう（例えば、医療従事者を防御するために）。重症患者又は i. n. 投薬に耐えられない他の患者には、非経口投与が好ましいだろう。本発明者らは、大量（すなわち、50 µl）の i. n. が一貫した肺送達をもたらすことを示すと予想し i. t. が気道を介した送達を模倣することが示されているため、i. n. を i. t. との比較によって評価する。（特に予防の場合）全ての動物が i. n. を介して一貫した投与量を受けるべきであるため、これはインビボ負荷にとって重要である。i. n が i. t. と同様の分布を一貫してもたらさない場合、本発明者らは少なくとも単回予防投与について i. t. を検討する。このことから、本発明者らは、肺における最も長い体内分布に基づいてペプチドを選択する。

10

【0149】

ペプチド免疫原性試験：反復投与毒性試験を行う場合に、ペプチドの投与に関連する抗体の測定を実施する。抗ペプチド抗血清を使用して、上記の慢性毒性試験中に産生された抗体をアッセイする。本発明者らは、薬物動態、有害効果の発生率及び／若しくは重症度、補体活性化、又は免疫複合体の形成及び沈着に関連する病理学的変化に対する抗体応答の効果を評価することを試みる。

【0150】

実施例 8 フェレットモデル

マウス以外にも、様々な動物モデルが解明され、利用可能になっているので、本発明者らはこれらも使用する（www.sciencemag.org/news/2020/04/mice-hamsters-ferrets-monkeys-which-lab-animals-can-help-defeat-new-coronavirus）。

20

【0151】

本発明者らのプロトタイプペプチドが感染動物から非感染直接接触動物への SARS-CoV-2 の直接伝染を妨げるかどうかを評価するために、本発明者らが使用する最初の動物モデルは、フェレットである（Kimら、Infection and Rapid Transmission of SARS-CoV-2 in Ferrets、Cell Host & Microbe（2020））。フェレットは、予防及び伝染を試験するための理想的なモデルである。この動物は、直接接触、又はケージからケージへのいずれかによって、SARS-CoV-2 を非感染フェレットに非常に容易に伝染させる（Kimら）。フェレットを点鼻薬で治療し、SARS-CoV-2 感染接触動物との接触中の感染からの防御について評価する。全ての直接接触動物は2日以内に感染する。フェレットを点鼻薬で治療し、SARS-CoV-2 感染接触動物との接触中の感染からの防御について評価する（図29）。

30

【0152】

実施例 9 ヒト試験

本発明者らは、動物試験から許容可能な結果を得ることができた後、最初に医療従事者及び他の初期対応者におけるヒト安全性／有効性に目を向ける。

40

【0153】

配列表

配列番号 1（野生型 SARS-CoV-2-HRC）

DISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQEL

配列番号 2（ペプチド 1、修飾 SARS-CoV-2-HRC）

DISQINASVVNIEYEIKKLEEVAKKLEESLIDLQEL

配列番号 3（ペプチド 2、修飾 SARS-CoV-2-HRC）

SIDQINATFVDIEYEIKKLEEVAKKLEESYIDLKEL

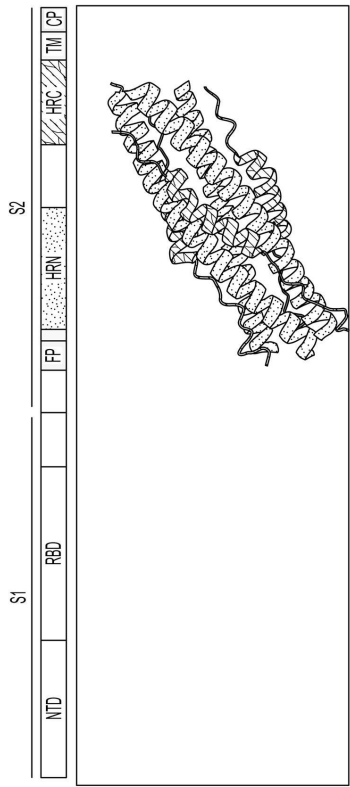
配列番号 4（ペプチド 4、エボラウイルス GP2 由来）

IEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDK

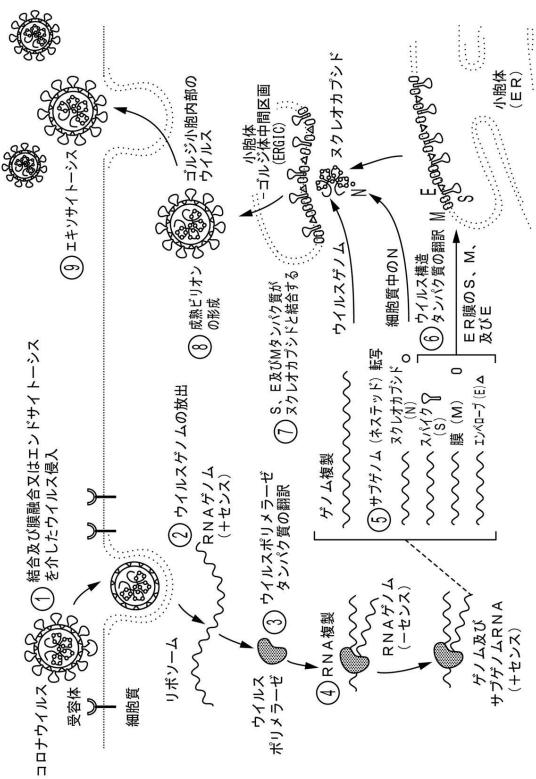
50

配列番号 4 (ペプチド 5、エボラウイルス G P 2 由来)
IAALPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDK

【図面】
【図 1】



【図 2】



10

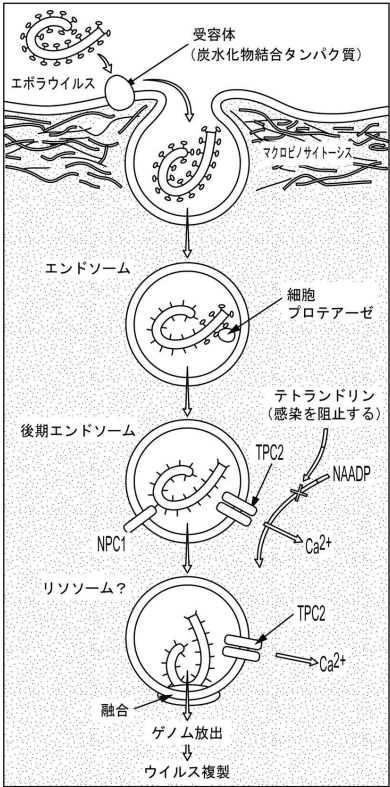
20

30

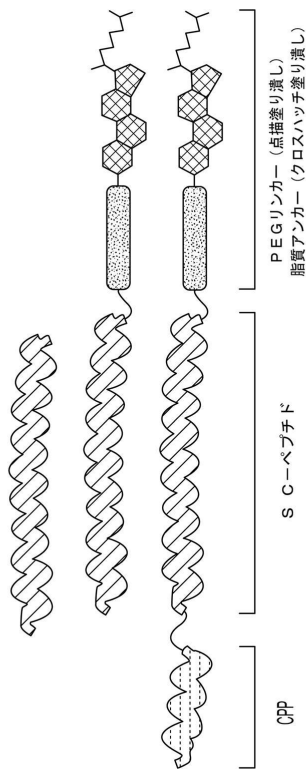
40

50

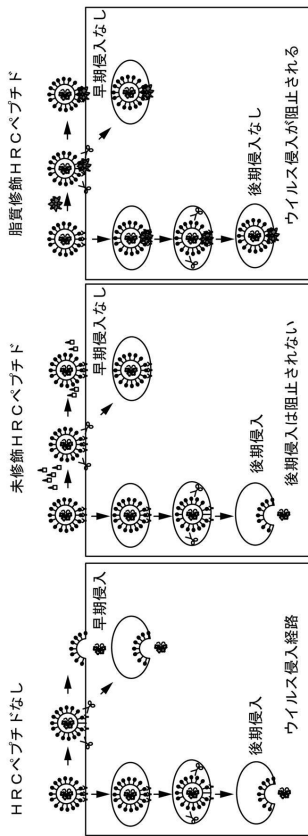
【 図 3 】



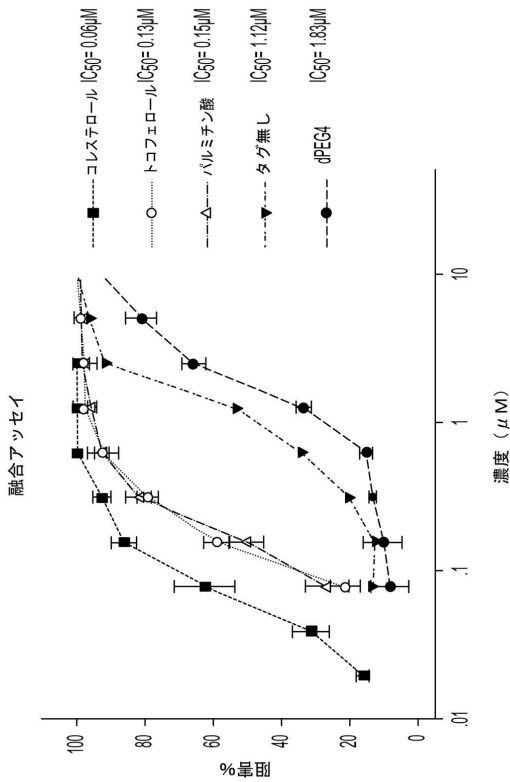
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



10

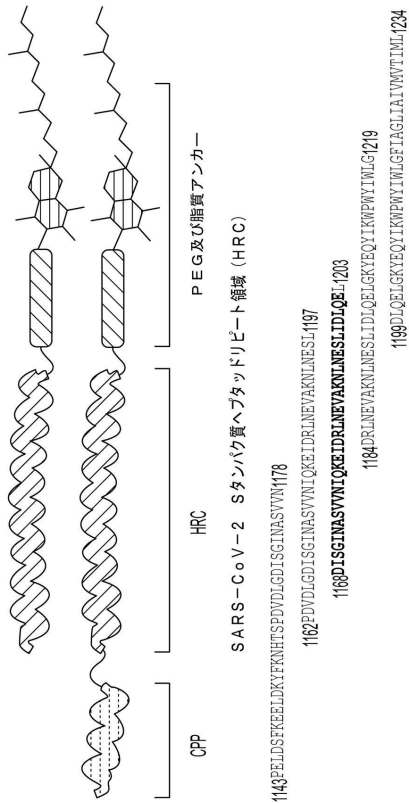
20

30

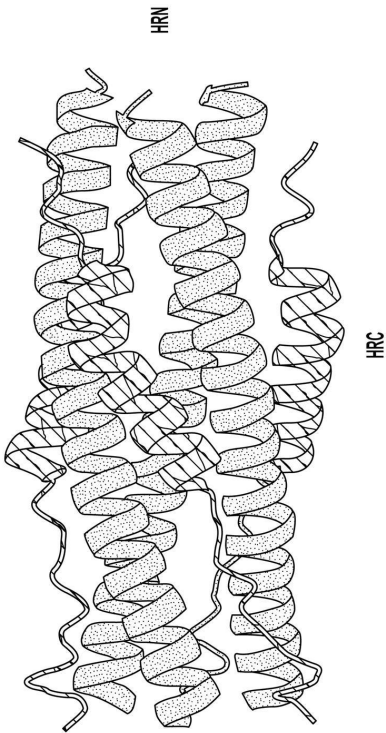
40

50

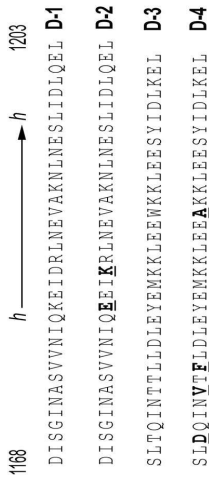
【図 1 1】



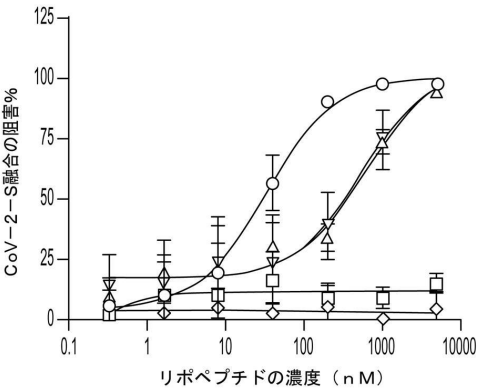
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】



ペプチド		IC ₅₀ (nM)	IC ₉₀ (nM)
○	SLTQINTTLLNLEYEMKKLEEVVKKLEESYIDLKEL-dPEG4-コレステロール	33±6	162±62
△	SLTQINTTLLNLEYEMKKLEEVVKKLEESYIDLKEL-dPEG4-パルミチン酸	507±198	>5000
▽	SLTQINTTLLNLEYEMKKLEEVVKKLEESYIDLKEL-dPEG4-トコフェロール	524±88	>5000
□	SLTQINTTLLNLEYEMKKLEEVVKKLEESYIDLKEL-dPEG4-脂質なし	>5000	>5000
◇	VALDPIDLSIVLNKIKSQLEESKEWIRRSNKILDST-dPEG4-コレステロール	>5000	>5000

10

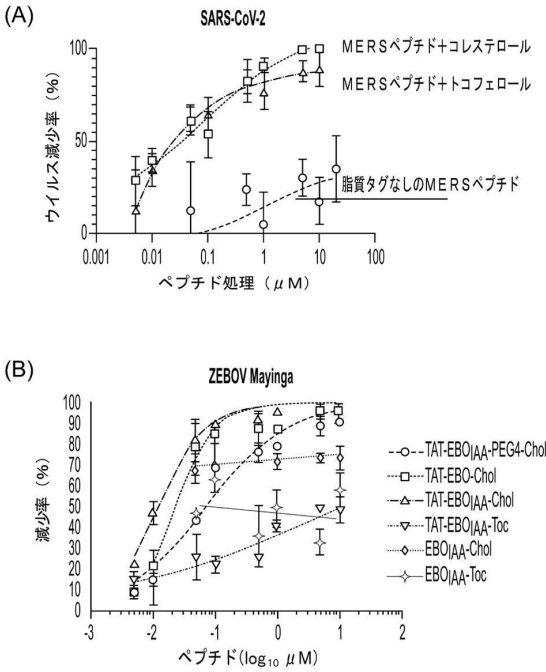
20

30

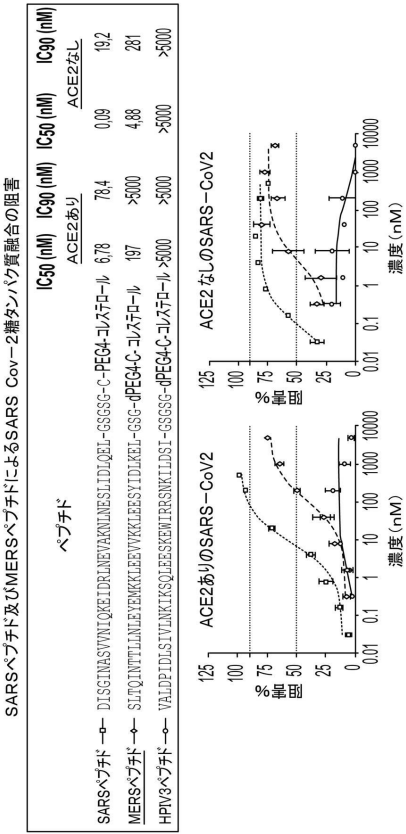
40

50

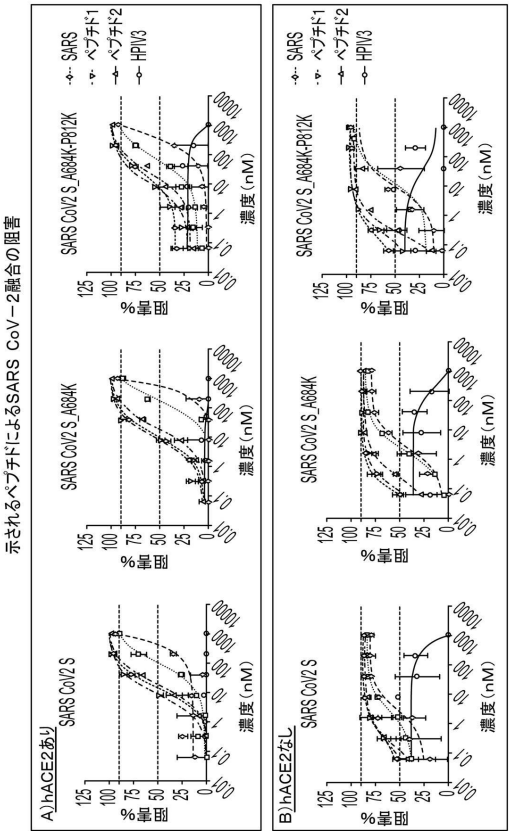
【図 15】



【図 16】



【図 17】



【図 18】

SARS-CoV2 HR2 DISGNASVNNIQKEIDRLNEVAKNLSLIDLQELGSGSGC

ペプチド1 DISQINASVNNIEYEIKKLEEVAKKLEESLIDLQELGSGSGC

ペプチド2 SIDQINATFVDIEYEIKKLEEVAKKLEESYIDLKEL (PEG4)C

10

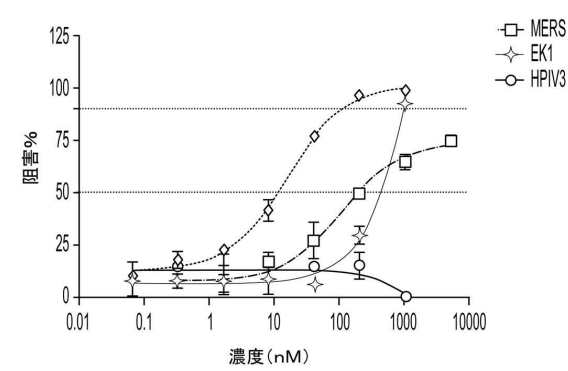
20

30

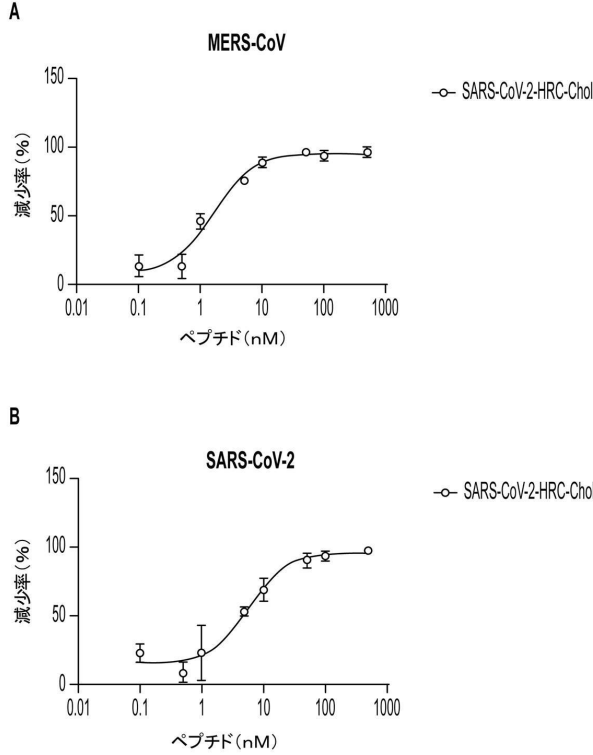
40

50

【図 19】



【図 20】



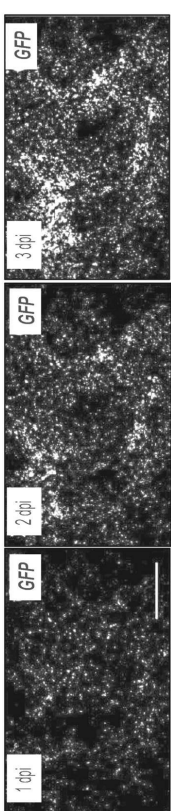
10

20

【図 21】



【図 22】

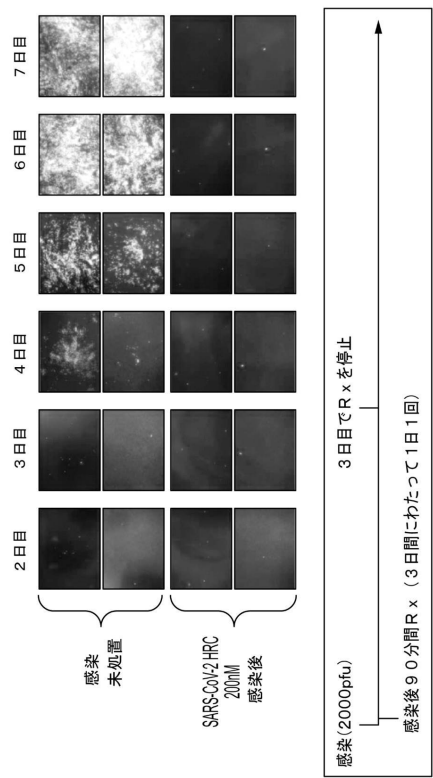


30

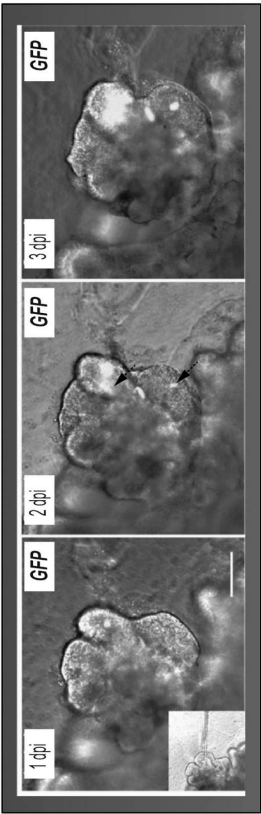
40

50

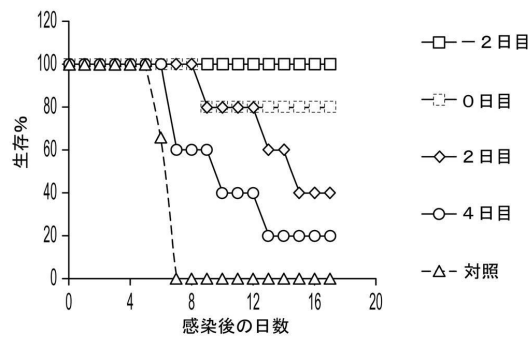
【図 2 3】



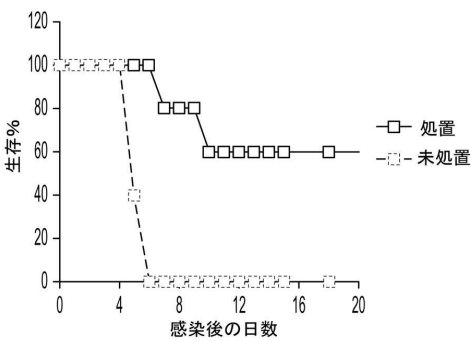
【図 2 4】



【図 2 5】



【図 2 6】



10

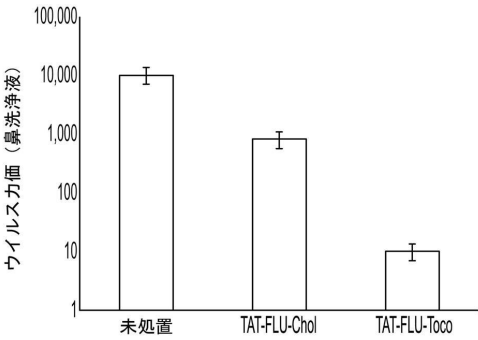
20

30

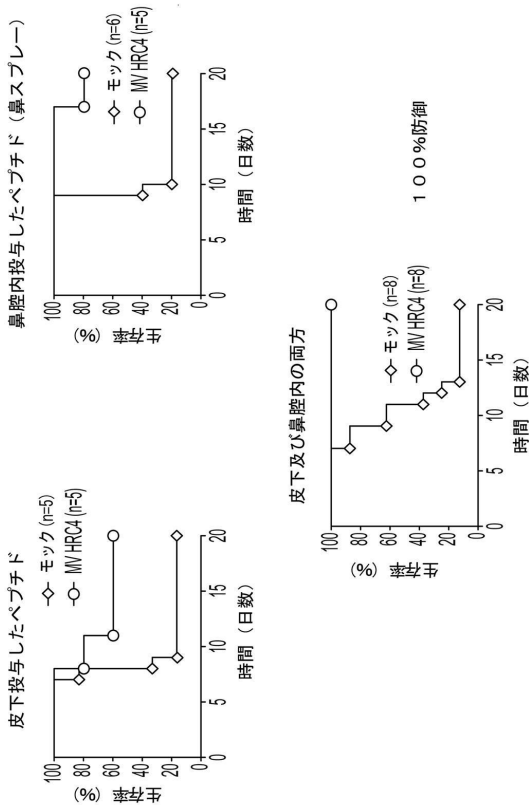
40

50

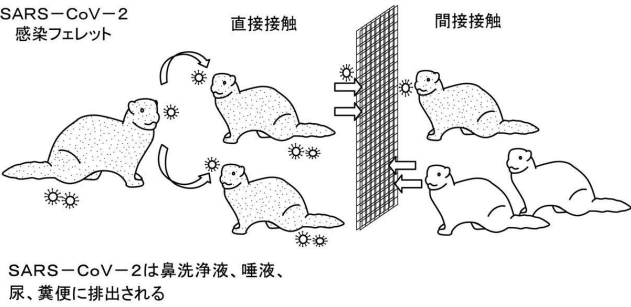
【図 2 7】



【図 2 8】



【図 2 9】



【配列表】

2023524911000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/28667

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - C07K 14/08, A61K 38/00, A61K 47/48, A61K 31/355, A61K 38/16, C07K 14/12 (2020.01) CPC - A61K 38/00, A61K 47/554, A61K 47/551, C07K 14/005, A61K 38/162, C12N 2760/16122, C12N 2760/16133, C12N 2760/18022, A61K 31/355, A61K 9/127, A61K 47/42, A61K 47/24, A61K 47/645, A61K 47/65, A61K 47/02, A61K 47/26, A61K 47/10, A61K 47/16 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	XIA, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion. Cell Research ePub 30 March 2020, Vol. 30, No. 4, pp. 343-355; Abstract; pg 349, col 1; pg 354, col 1	1-7, 11-16, 20-26, 32
A	US 2008/0027006 A1 (TRIPET, et al.) 31 January 2008 (31.01.2008) claims 8, 11, 13, 16, 17, SEQ ID NO: 48, 74.4% identity to SEQ ID NO: 2	1-7, 11-16, 20-26, 32
A	UniProt A0A023PUW9_CVHSA. Spike glycoprotein (11 December 2019) [online]. [Retrieved on 19 July 2021] Retrieved from the Internet <URL: https://www.uniprot.org/uniprot/A0A023PUW9.txt?version=16 >; amino acids 1154-1189, 76.2% identity to SEQ ID NO: 2	1-7, 11-16, 20-26, 32
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 July 2021		Date of mailing of the international search report OCT 15 2021
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Karl Rodriguez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/28667

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☐ forming part of the international application as filed:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/28667

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 8-10, 17-19
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

***** See Supplemental Sheet to continue *****

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-7, 11-16, 20-26, 32, restricted to SEQ ID NO: 2

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/28667

In Continuation of

Box III. Observations where unity of invention is lacking:

Group I+, claims 1-7, 11-16, 20-32, directed to a peptide of a specified amino acid sequence, a pharmaceutical composition comprising said peptide, and a method of using thereof. The peptide, pharmaceutical composition, and the method will be searched to the extent that the amino acid sequence encompasses SEQ ID NO: 2. It is believed that claims 1-7, 11-16, 20-26, 32 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the peptide encompasses SEQ ID NO: 2. Additional peptide(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected peptide(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a peptide of SEQ ID NO: 4, i.e., claims 1-7, 11-16, 27-31.

The inventions listed as Group I+ do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of some inventions of Group I+ is a specific amino acid sequence recited therein.

Some inventions of Group I+ share the technical features of a SARS antiviral composition comprising a lipid peptide fusion inhibitor (claim 19) and a method of using thereof (claim 22). However, this shared technical feature does not represent an improvement over prior art as being obvious over a paper titled "Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion" by Xia, et al. (Cell Research 30 March 2020, volume 30, pages 343-355 (hereinafter Xia) in view of a paper titled "Effective in Vivo Targeting of Influenza Virus through a Cell-Penetrating/Fusion Inhibitor Tandem Peptide Anchored to the Plasma Membrane" by Figueira, et al. (Bioconjug Chem. 2018, 29(10): 3362-3376) (hereinafter "Figueira").

Xia discloses a SARS-COV-2 (COVID-19) antiviral composition, comprising a SARS-COV-2 (COVID-19) lipid-peptide fusion inhibitor comprising a peptide, a lipid tag, a spacer, and a pharmaceutically acceptable excipient (pg 354, col 1, "To test the protective effect of peptides on HCoV-infected mice, EK1C4 (0.5 mg/kg), EK1 (20 mg/kg) in 2 ml 28% Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HBC), or phosphate-buffered saline (PBS) solution, were administered intranasally"; pg 345, col 1, "By conjugating the cholesterol molecule to the EK1 peptide, we found that one of the lipopeptides, EK1C4, exhibited highly potent inhibitory activity against SARS-CoV-2 S-mediated membrane fusion and PsV infection, about 240- and 150-fold more potent than EK1 peptide, respectively. EK1C4 is also highly effective against in vitro and in vivo infection of some live HCOVs, such as SARS-CoV-2, HCoV-OC43 and MERS-CoV"; pg 349, col 1, "... changing "GSG" in EK1C3 to a longer 5-amino acid linker "GSGSG" significantly increased the inhibitory potency of the hybrid molecule, and EK1C4 had IC50 value of 1.3 nM, which was 43-fold more potent than EK1C1. These findings indicate that the linker length has a significant effect on the overall activity of lipopeptides. Comparison of increasing PEG-based arm lengths in EK1C4 shows that inhibitors potency slightly decreased in the cell?cell fusion assay (Fig. 4e). The data suggest that "GSGSG-PEG4" linker was optimal to bridge both parts of the conjugates. Similarly, EK1C4 showed the most potent inhibitory activity against SARS-CoV-2 PsV infection, with IC50 value of 15.8 nM, providing 149-fold stronger anti-SARS-CoV-2 activity than that of EK1 (IC50 = 2,375 nM) (Fig. 4f)").

Xia does not specifically disclose that said SARS-COV-2 (COVID-19) lipid-peptide fusion inhibitor comprises a CPP.

Figueira discloses an influenza virus lipid-peptide fusion inhibitor comprising a peptide, a lipid tag, a spacer, and a CPP (Abstract, "... lipid tagged peptides derived from the C-terminal region of influenza hemagglutinin (HA) were effective influenza fusion inhibitors. In this study, we modified the influenza fusion inhibitors by adding a cell penetrating peptide sequence [CPP] to promote intracellular targeting. These fusion-inhibiting peptides self-assemble into ~15-30 nm nanoparticles (NPs), target relevant infectious tissues in vivo, and reduce viral infectivity upon interaction with the cell membrane. Overall, our data show that the CPP and the lipid moiety are both required for efficient biodistribution, fusion inhibition, and efficacy in vivo").

It would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to combine, in the course of routine experimentation and with a reasonable expectation of success, Xia and Figueira by incorporating the CPP disclosed by Figueira (pg 3363, col 2, "To further improve the intracellular localization of the peptide, we added a cell-penetrating peptide (CPP) sequence... derived from HIV-1 TAT... We show here that TAT-derived CPP sequence and the lipid moiety enhance the in vitro and in vivo efficacy via efficient intracellular localization and fusion inhibition"), to improve therapeutic efficiency of the SARS-COV-2 (COVID-19) lipid-peptide fusion inhibitor disclosed by Xia.

Xia in view of Figueira discloses a method of treating COVID-19 by administering to a subject said antiviral pharmaceutical composition (Xia, Abstract, "Intranasal application of EK1C4 before or after challenge with HCoV-OC43 protected mice from infection", pg 349, col 2, "Intranasally applied EK1C4 showed strong protection of mice against HCoV-OC43 infection").

As the technical features would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the inventions.

***** See the Following Supplemental Sheet to continue *****

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/28667

In Continuation of

Box III. Observations where unity of invention is lacking and the Preceding Supplemental Sheet:

Some inventions of Group I+ share the technical features of an Ebola antiviral composition comprising a lipid peptide fusion inhibitor (claim 27) and a method of using thereof (claim 29). However, these shared technical features do not represent an improvement over prior art as being US 2017/0216448 A1 to CORNELL UNIVERSITY, et al. (03 August 2017) (hereinafter "CORNELL").

CORNELL discloses an Ebola antiviral composition comprising a lipid peptide fusion inhibitor comprising a peptide, a lipid tag, a spacer, and a pharmaceutically acceptable excipient (claim 11, claim 19, "... the inhibitor is TAT-Ebola-PEG4-toco"; para [0030], "FIG. 13 shows that TAT-EBOLA-dPEG4-tocopherol protects mice from the lethal (MA-)ZEBOV infection... Peptide (10 mg/kg dissolved in isotonic water) was administered i.p.").

CORNELL discloses a method of treating Ebola by administering to a subject said antiviral composition (claims 22, 30, "The method of claim 26, wherein the subject is infected with Ebola virus and the inhibitor is TAT-Ebola-PEG4-toco"; para [0030], "FIG. 13 shows that TAT-EBOLA-dPEG4-tocopherol protects mice from the lethal (MA-)ZEBOV infection. 5-6 weeks old BALB/c mice received the intraperitoneal challenge of MA-EBOV 24 h after the first peptide treatment, and were followed for 5 weeks post infection. Peptide (10 mg/kg dissolved in isotonic water) was administered i.p. daily for 15 days"; para [0130], "Example 12—Inhibition of (MA-)ZEBOV In Vivo [0130] The effectiveness of the peptides in FIG. 13A were confirmed against live virus. The peptides in Table 2 highlighted in grey (TAT and PEG linked Ebola and HPIV3 peptides) were then tested in mice for acute toxicity at 20 mg/ml for 14 days (intraperitoneal delivery), and tolerability issues were not observed. Mouse pharmacokinetic studies were performed by Apredica for the 6 peptides highlighted in Table 3 to confirm sustained plasma presence of the lipid conjugated peptides for at least 24 hours. For the in vivo study presented in FIG. 14, 5-6 week old BALB/c mice were used, 5 animals per group treated from day -1 to day 15 post-infection with 10 mg/kg i.p. (about 100 ul isotonic aqueous solution per animal). The animals were infected with 100LD.sub.50. Significant weight loss was observed for all infected animals... 4 out of the 5 animals treated prophylactically with the TAT-EBOLA-dPEG4-Tocopherol survived... These data were recently confirmed in a second challenge experiment in which all the surviving animals from the experiment presented in FIG. 2 were re-challenged. All the animals survived the second challenge indicating that the treatment with peptides did not provide sterilizing immunity and allowed for development of protective immunity").

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the inventions.

Therefore, inventions of Group I+ lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/54 (2017.01)	A 6 1 K 47/54	
A 6 1 K 47/60 (2017.01)	A 6 1 K 47/60	
A 6 1 K 9/12 (2006.01)	A 6 1 K 9/12	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

弁理士法人太陽国際特許事務所

- (72)発明者 ポロット、マッテオ
アメリカ合衆国 1 0 0 2 5 ニューヨーク ニューヨーク、ウェスト 1 0 2 ストリート、2 3 5
ナンバー 5ティ
- (72)発明者 モスコーナ、アン
アメリカ合衆国 1 0 0 2 4 ニューヨーク ニューヨーク、ウェスト 8 9 ストリート、2 0 1
ナンバー 5エフ
- (72)発明者 ゲルマン、サミュエル
アメリカ合衆国 5 3 7 0 6 ウィスコンシン マディソン、ユニバーシティ アベニュー 1 1 0 1
ルーム 7 1 3 2エー
- (72)発明者 アウトロウ、ヴィクター
アメリカ合衆国 5 3 7 0 6 ウィスコンシン マディソン、ユニバーシティ アベニュー 1 1 0 1
ルーム 7 1 3 2エー
- (72)発明者 ユイ、チェン
アメリカ合衆国 5 3 7 0 6 ウィスコンシン マディソン、ユニバーシティ アベニュー 1 1 0 1
ルーム 7 1 3 2エー
- F ターム (参考) 4C076 AA11 AA24 AA25 BB16 BB25 CC35 DD41 DD59 DD70 FF68
4C084 AA02 BA01 BA32 BA36 BA37 MA13 MA17 MA59 MA66 NA14
ZB33 ZC75
4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 BA55 BA57 CA01 CA05 DA86 EA20