



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116801908 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 22

(21) 申请号 202180070311.3

(22) 申请日 2021.10.14

(30) 优先权数据

63/091,769 2020.10.14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.04.13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/054954 2021.10.14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/081827 EN 2022.04.21

(71) 申请人 丹娜法伯癌症研究院

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 H·D·埃尔塞 L·D·瓦伦斯基

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所

11517

专利代理师 吴瑜 张璐

(51) Int.Cl.

A61K 47/64 (2006.01)

权利要求书6页 说明书55页

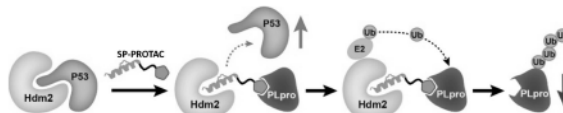
序列表26页 附图12页

(54) 发明名称

用于降解病毒和宿主蛋白的嵌合缀合物和使用方法

(57) 摘要

本申请描述了靶向必需病毒蛋白或病毒发病机理中涉及的宿主蛋白并使所述必需病毒蛋白或所述宿主蛋白降解的嵌合体。具体地，本申请的嵌合体将与靶蛋白（如冠状病毒木瓜蛋白酶样蛋白酶（PLpro）、主蛋白酶（Mpro）或其它非结构蛋白（例如NSP9或NSP12）；或宿主蛋白（如溴结构域2、溴结构域3或溴结构域4））结合的部分与募集蛋白降解剂的部分组合，从而使所述靶蛋白降解。在一些情况下，所述嵌合体通过接合作为所述蛋白降解剂的HDM2，同时诱导本身具有抗病毒活性的p53。本公开还涉及将此类嵌合体用于预防和治疗病毒感染，特别是由冠状病毒（如SARS-CoV-2）引起的病毒感染（如COVID-19）的方法。



1. 一种嵌合体,其包括:

第一部分,所述第一部分附接到第二部分,其中所述第一部分和所述第二部分彼此直接附接或通过连接子彼此附接;

其中所述第一部分与靶向降解的第一蛋白结合,其中所述第一蛋白选自冠状病毒蛋白酶、冠状病毒非结构蛋白(NSP)或溴结构域和超末端结构域(BET)蛋白;并且

所述第二部分与第二蛋白结合,其中所述第二蛋白是蛋白降解剂或者募集蛋白降解剂。

2. 根据权利要求1所述的嵌合体,其中所述第二蛋白是E3泛素连接酶。

3. 根据权利要求1所述的嵌合体,其中所述第一部分和所述第二部分通过连接子彼此附接,任选地其中所述连接子是肽连接子、化学连接子、甘氨酸-丝氨酸连接子、(G4S)₃(SEQ ID NO:26)、(G4S)₅(SEQ ID NO:27)、β-丙氨酸(Z)连接子、β-丙氨酸和丙氨酸(ZA)连接子或聚乙二醇连接子。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的嵌合体,其中所述第一部分包括小分子、用弹头衍生的小分子、肽、装订肽、用弹头衍生的肽、用弹头衍生的装订肽或核苷酸类似物。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的嵌合体,其中所述冠状病毒蛋白酶是木瓜蛋白酶样蛋白酶(PLpro)或主蛋白酶(Mpro);所述冠状病毒NSP是NSP9或NSP12;并且所述BET蛋白是溴结构域2(BRD2)、溴结构域3(BRD3)或溴结构域4(BRD4)。

6. 根据权利要求5所述的嵌合体,其中所述冠状病毒蛋白酶是PLpro,并且所述第一部分与PLpro结合。

7. 根据权利要求6所述的嵌合体,其中与PLpro结合的所述第一部分是PLpro抑制剂。

8. 根据权利要求7所述的嵌合体,其中所述PLpro抑制剂是GRL-0617或其PLpro结合类似物、双硫仑或PLpro结合硫嘌呤类似物。

9. 根据权利要求5所述的嵌合体,其中所述冠状病毒蛋白酶是Mpro,并且所述第一部分与Mpro结合。

10. 根据权利要求9所述的嵌合体,其中与Mpro结合的所述第一部分是Mpro抑制剂。

11. 根据权利要求10所述的嵌合体,其中所述Mpro抑制剂是洛匹那韦、利托那韦、地瑞那韦、ASC09、GC376、GC813、依布硒啉羧酸或包括与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3中所示的序列具有至少30%同一性的氨基酸序列的肽,其中所述肽与Mpro结合。

12. 根据权利要求5所述的嵌合体,其中所述BET蛋白是BRD4,并且所述第一部分与所述BET蛋白结合。

13. 根据权利要求12所述的嵌合体,其中与所述BET蛋白结合的所述第一部分是BET蛋白抑制剂。

14. 根据权利要求13所述的嵌合体,其中所述BET蛋白抑制剂是JQ1、ABBV-075、I-BET151、I-BET726、OTX015或PFI-1或其与BRD4、BRD3和/或BRD2结合的类似物。

15. 根据权利要求5所述的嵌合体,其中所述冠状病毒NSP是NSP9,并且所述第一部分与NSP9结合。

16. 根据权利要求15所述的嵌合体,其中与NSP9结合的所述第一部分是NSP9抑制剂。

17. 根据权利要求16所述的嵌合体,其中所述第一部分是包括与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5中所示的序列具有至少30%同一性的氨基酸序列的肽,其中所述肽与NSP9结合。

18. 根据权利要求5所述的嵌合体,其中所述冠状病毒NSP是NSP12,并且所述第一部分与NSP12结合。

19. 根据权利要求18所述的嵌合体,其中与NSP12结合的所述第一部分是NSP12抑制剂。

20. 根据权利要求19所述的嵌合体,其中所述第一部分是瑞德西韦酸或其与NSP12结合的类似物、或索非布韦酸或其与NSP12结合的类似物。

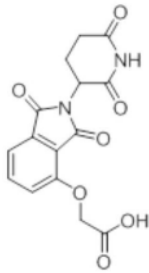
21. 根据权利要求1至20中任一项所述的嵌合体,其中所述第二蛋白是人双微体2 (HDM2)、Von Hippel-Lindau (VHL)、Cereblon、X连锁凋亡抑制蛋白 (XIAP)、细胞凋亡抑制蛋白 (cIAP) 或组成型光形态建成1 (COP1)。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的嵌合体,其中所述第二部分包括与所述蛋白降解剂结合或募集所述蛋白降解剂的肽、装订肽或小分子。

23. 根据权利要求1至22中任一项所述的嵌合体,其中所述第二部分包括作为小分子的cereblon结合部分,所述cereblon结合部分任选地选自下组:沙利度胺、泊马度胺、来那度胺、阿伐度胺和其与cereblon结合的类似物。

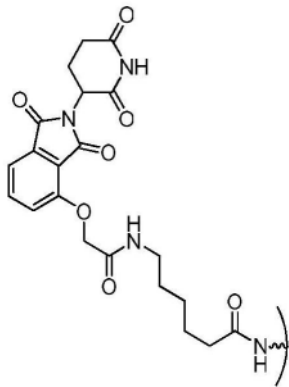
24. 根据权利要求23所述的嵌合体,其中所述第二部分包括沙利度胺部分。

25. 根据权利要求24所述的嵌合体,其中所述沙利度胺部分包括以下提供的结构:



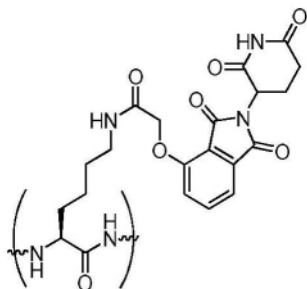
或其cereblon结合类似物。

26. 根据权利要求24所述的嵌合体,其中所述沙利度胺部分包括以下提供的结构:



或其cereblon结合类似物。

27. 根据权利要求24所述的嵌合体,其中所述沙利度胺部分包括以下提供的结构:

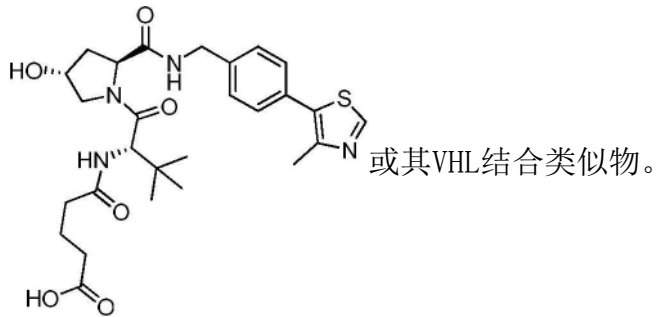


或其cereblon结合类似物。

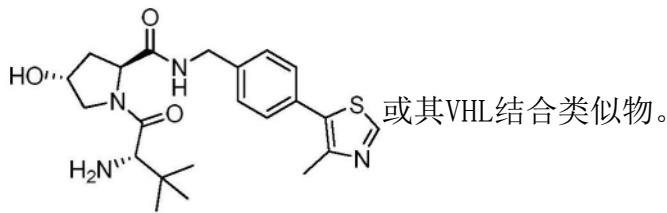
28. 根据权利要求1至22中任一项所述的嵌合体,其中所述第二部分包括VHL结合部分,

所述VHL结合部分任选地选自下组:VH 032和其VHL结合类似物。

29. 根据权利要求28所述的嵌合体,其中所述VHL结合部分包括以下结构:



30. 根据权利要求28所述的嵌合体,其中所述VHL结合部分包括以下结构:



31. 根据权利要求1至22中任一项所述的嵌合体,其中所述第二部分包括HDM2结合部分。

32. 根据权利要求31所述的嵌合体,其中所述HDM2结合部分包括与HDM2和/或HDMX结合的p53的反式激活结构域的肽或装订肽或其它化学稳定的肽。

33. 根据权利要求32所述的嵌合体,其中所述HDM2结合部分是装订肽,所述装订肽是ATSP-7041、SP645或其HDM2结合变体。

34. 根据权利要求33所述的嵌合体,其中所述装订肽包括序列LTF (R8) EYWAQ# (S5) SAA (SEQ ID NO:7)或包括以下的肽:

(a) 与SEQ ID NO:7中所示的序列具有至少30%同一性的氨基酸序列,或者

(b) 与SEQ ID NO:7中所示的序列具有至少30%同一性的氨基酸序列,其中所述肽的相互作用面上的氨基酸未被取代;或者

(c) 与SEQ ID NO:7中所示的序列具有至少30%同一性的氨基酸序列,其中所述肽的相互作用面上的氨基酸中的一个或多个氨基酸被保守氨基酸取代;其中(R8)是(R)-2-(7'-辛烯基)丙氨酸,#是环丁基丙氨酸,并且(S5)是(S)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸,或其HDM2结合变体;

其中所述肽与HDM2结合。

35. 根据权利要求33所述的嵌合体,其中所述装订肽包括序列LTF (R8) EYWAQL (S5) SAA (SEQ ID NO:1)或其HDM2结合变体或包括以下的肽:

(a) 与SEQ ID NO:1中所示的序列具有至少30%同一性的氨基酸序列,或者

(b) 与SEQ ID NO:1中所示的序列具有至少30%同一性的氨基酸序列,其中所述肽的相互作用面上的氨基酸未被取代;或者

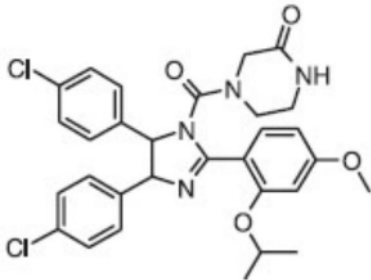
(c) 与SEQ ID NO:1中所示的序列具有至少30%同一性的氨基酸序列,其中所述肽的相互作用面上的氨基酸中的一个或多个氨基酸被保守氨基酸取代;

其中(R8)是(R)-2-(7'-辛烯基)丙氨酸,并且(S5)是(S)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸,并且

其中所述肽与HDM2结合。

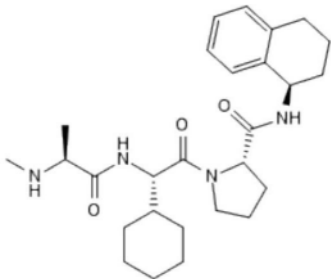
36. 根据权利要求31所述的嵌合体,其中所述HDM2结合部分是Nutlin-3a或其HDM2结合类似物。

37. 根据权利要求36所述的嵌合体,其中所述HDM2结合部分包括以下结构:



38. 根据权利要求1至21中任一项所述的嵌合体,其中所述第二部分包括XIAP结合部分,所述XIAP结合部分是A410099.1或其XIAP结合类似物。

39. 根据权利要求38所述的嵌合体,其中所述XIAP结合部分包括以下结构:



40. 根据权利要求1至21中任一项所述的嵌合体,其中所述第二部分包括cIAP结合部分,所述cIAP结合部分是SM-1295、SM-1280或其cIAP结合类似物。

41. 根据权利要求1至40中任一项所述的嵌合体,其中所述第二部分包括与WD40重复蛋白结合的肽,所述WD40重复蛋白是E3泛素连接酶的底物衔接子,其中所述肽包括与所述WD40重复蛋白结合的天然结合序列的经修饰版本或氨基酸序列的天然结合共有序列,其中所述经修饰版本包括在所述天然结合共有序列内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其任何组合。

42. 根据权利要求41所述的嵌合体,其中所述WD40重复蛋白是E3泛素连接酶HDM2或VHL的底物衔接子。

43. 根据权利要求41所述的嵌合体,其中所述天然结合共有序列SEQ ID NO.:14或15或其变体,其中所述变体在一个至六个氨基酸位置处与所述共有序列不同。

44. 根据权利要求1至21中任一项所述的嵌合体,其中所述第二部分包括COP1结合部分。

45. 根据权利要求44所述的嵌合体,其中所述COP1结合部分是肽,所述肽是Tribbles假激酶1(Trib1)肽或其COP1结合变体。

46. 根据权利要求45所述的嵌合体,其中所述肽包括序列DQIVPEY(SEQ ID NO:6)或包括与SEQ ID NO:6中所示的序列具有至少30%同一性的氨基酸序列的肽。

47. 根据权利要求1至46中任一项所述的嵌合体,其中所述蛋白降解剂使所述第一蛋白降解。

48. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至47中任一项所述的嵌合体和药学上可接受的载体。

49. 根据权利要求48所述的药物组合物,其中所述药物组合物被调配用于口服、静脉内、局部、口腔、直肠、肠胃外、腹膜内、皮内、皮下、肌肉内、经皮、鼻内、经肺或气管内施用。

50. 一种治疗或预防有需要的受试者的由冠状病毒引起的病毒感染的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1至45中任一项所述的嵌合体或根据权利要求47或48所述的药物组合物。

51. 一种用于阻断有需要的受试者中冠状病毒的病毒复制并且降低所述受试者中冠状病毒的病毒传染性的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1至47中任一项所述的嵌合体或根据权利要求48或49所述的药物组合物。

52. 根据权利要求50或51所述的方法,其中所述冠状病毒是中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)、严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)或SARS-CoV-2。

53. 一种用于阻断有需要的受试者中SARS-CoV或SARS-CoV-2复制的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1至47中任一项所述的嵌合体或根据权利要求48或49所述的药物组合物。

54. 一种用于治疗或预防有需要的受试者的RNA病毒感染的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1至45中任一项所述的嵌合体或根据权利要求48或49所述的药物组合物。

55. 根据权利要求50至54中任一项所述的方法,其进一步包括向所述受试者施用一种或多种选自下组的药剂:皮质类固醇、氢化可的松、甲泼尼龙、地塞米松、瑞德西韦、IL-6抑制剂、IL-1抑制剂、激酶抑制剂、补体抑制剂、伊维菌素、羟氯喹、法匹拉维、干扰素β和艾替班特。

56. 根据权利要求50至55中任一项所述的方法,其中所述受试者选自下组:人、灵长类动物、蝙蝠、鸟、小鼠、火鸡、牛、猪、猫和狗。

57. 一种肽,其包括SEQ ID NO.:2或3中所示的氨基酸序列或其变体,其中所述肽结合并抑制Mpro。

58. 一种稳定肽,其包括肽,所述肽包括具有1、2、3、4、5或6个氨基酸取代的SEQ ID NO.:2或3中所示的氨基酸序列,其中至少两个氨基酸取代用非天然氨基酸替代由三个或六个氨基酸所间隔的氨基酸,并且其中所述肽结合并抑制Mpro。

59. 根据权利要求57或58所述的肽或稳定肽,其长度小于50、40、35、30或25个氨基酸。

60. 一种肽,其包括SEQ ID NO.:4或5中所示的氨基酸序列或其变体,其中所述肽与NSP9结合。

61. 一种稳定肽,其包括肽,所述肽包括具有1、2、3、4、5或6个氨基酸取代的SEQ ID NO.:4或5中所示的氨基酸序列,其中至少两个氨基酸取代用非天然氨基酸替代由三个或六个氨基酸所间隔的氨基酸,并且其中所述肽与NSP9结合。

62. 根据权利要求60或61所述的肽或稳定肽,其长度小于50、40、35、30或25个氨基酸。

63. 一种药物组合物,其包含根据权利要求58至62中任一项所述的肽或稳定肽和药学上可接受的载体。

64. 一种治疗或预防有需要的受试者的冠状病毒感染的方法,所述方法包括向所述受

试者施用治疗有效量的根据权利要求58至62中任一项所述的肽或稳定肽或根据权利要求63所述的药物组合物。

65. 一种嵌合体,其包括具有图7或图14A中所描绘的分子中的任一分子的结构化合物。

66. 一种药物组合物,其包含根据权利要求65所述的嵌合体和药学上可接受的载体。

67. 一种治疗或预防有需要的受试者的由冠状病毒引起的病毒感染的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量根据权利要求65所述的嵌合体或根据权利要求66所述的药物组合物。

68. 一种用于阻断有需要的受试者中冠状病毒的病毒复制并且降低所述受试者中冠状病毒的病毒传染性的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求65所述的嵌合体或根据权利要求66所述的药物组合物。

69. 一种用于阻断有需要的受试者中SARS-CoV或SARS-CoV-2复制的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求65所述的嵌合体或根据权利要求66所述的药物组合物。

70. 一种用于治疗或预防有需要的受试者的RNA病毒感染的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求65所述的嵌合体或根据权利要求66所述的药物组合物。

71. 根据权利要求67至70中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

用于降解病毒和宿主蛋白的嵌合缀合物和使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2020年10月14日提交的美国临时申请第63/091,769号的优先权的权益,所述美国临时申请的内容通过引用整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本说明书与序列表的计算机可读形式(CRF)副本一起提交。创建于2021年10月14日且大小为25,132个字节的标题为00530-0409W01_SL.txt的CRF通过引用整体并入本文。

技术领域

[0005] 本公开涉及嵌合缀合物,即蛋白水解靶向嵌合体(PROTAC),其靶向病毒蛋白,例如必需病毒蛋白,如冠状病毒木瓜蛋白酶样蛋白酶(PLpro)、主蛋白酶(Mpro)、其它非结构蛋白(例如NSP9或NSP12);或病毒发病机理中涉及的宿主蛋白,如溴结构域和超末端结构域(BET)蛋白(例如,溴结构域2、溴结构域3或溴结构域4)的降解。本公开还涉及将此类嵌合缀合物用于治疗 and 预防病毒感染,特别是由冠状病毒引起的病毒感染的方法。还公开了抑制如冠状病毒木瓜蛋白酶样蛋白酶(PLpro)、主蛋白酶(Mpro)以及其它非结构病毒蛋白(例如NSP9或NSP12)等病毒蛋白的肽,所述肽用于抑制病毒成熟和复制。这些肽可以用于治疗病毒感染(例如,冠状病毒感染)。

背景技术

[0006] PLpro和Mpro是RNA病毒的生命周期中的必需酶,所述RNA病毒包括如SARS-CoV-2等冠状病毒。PLpro是一种病毒复制所需的多功能半胱氨酸蛋白酶,其通过水解病毒和细胞基质中的肽键和异肽键来加工病毒多聚蛋白和宿主细胞蛋白(Baez-Santos, Y.M.等人《病毒学杂志(J Virol)》88,12511-27(2014))。Mpro是SARS-CoV-2的主要蛋白水解加工酶,其在产生病毒生命周期所必需的成熟蛋白(NSP5-16)的自动加工蛋白水解反应中发挥主要作用(Chang, G.G.《SARS冠状病毒的分子生物学(Molecular Biology of the SARS-Coronavirus)》,115-128(2009))。冠状病毒非结构蛋白如NSP9和NSP12是病毒复制中涉及的必需蛋白。已经开发了几种化合物来抑制PLpro和Mpro的蛋白酶活性并抑制其它病毒NSP(参见例如,Baez Santos等人2014, Jin Z《自然(Nature)》2020;Anand, K.等人《科学(Science)》300,1763-7(2003);Ghosh, A.K.等人,《药物化学杂志(J Med Chem)》52,5228-40(2009);Baez-Santos, Y.M.等人《抗病毒研究(Antiviral Res)》115,21-38(2015))。然而,这些抑制剂的效力不足,并且因此只能实现部分抑制。迫切需要开发靶向如冠状病毒(例如SARS-CoV-2)等病毒并使宿主系统能够抵抗如COVID-19等感染的有效治疗剂。

发明内容

[0007] 本公开涉及嵌合缀合物(“嵌合体”),即靶向病毒蛋白或病毒发病机理中涉及的宿主蛋白的降解的蛋白水解靶向嵌合体(PROTAC)的表征和用途。在一些情况下,这些病毒蛋白是病毒复制、传染性 or 发病机理的必需蛋白。这种嵌合体可以用于使任何RNA病毒的必需

病毒蛋白降解,从而治疗由这种RNA病毒引起的感染。具体地,本公开的嵌合体可以用于使必需的冠状病毒蛋白,如木瓜蛋白酶样蛋白酶(PLpro)、主蛋白酶(Mpro)或另一种非结构蛋白(例如NSP9和NSP12)降解。本公开的嵌合体还可以靶向病毒发病机理中涉及的宿主蛋白,具体地溴结构域2、溴结构域3和溴结构域4(分别为BRD2、BRD3和BRD4)的降解。例如,本公开涵盖图7和图14A中所示出的分子中的每种分子。

[0008] 本公开还描述了将此类嵌合体用于治疗病毒感染,特别是由冠状病毒引起的病毒感染(例如,COVID-19)的方法。本公开的嵌合体将病毒或宿主蛋白靶向部分(例如,肽、装订肽、小分子、用弹头衍生的小分子或核苷酸类似物)和蛋白降解诱导部分(例如,与蛋白降解剂结合或募集蛋白降解剂的肽、装订肽或小分子)组合。因此,此类嵌合体可以是用于靶向任何所关注的病毒蛋白(例如,冠状病毒PLpro、Mpro、NSP9、NSP12等)或病毒发病机理中涉及的任何宿主蛋白(例如,BRD2、BRD3、BRD4等)的双功能的装订肽-小分子缀合物、肽-小分子缀合物、装订肽-肽缀合物,肽-装订肽缀合物、装订肽-装订肽缀合物、肽-肽缀合物、小分子-装订肽缀合物和小分子-小分子缀合物等。

[0009] 本公开提供了不仅用于使所关注的病毒蛋白(例如,冠状病毒PLpro、Mpro、NSP9、NSP12等)或病毒发病机理中涉及的任何宿主蛋白(例如,BRD2、BRD3、BRD4等)降解,而且用于增加未与HDM2和/或HDMX复合的p53蛋白的量的组合物和方法。这允许p53介导的病毒复制和/或发病机理的抑制。因此,本发明组合物提供了抗病毒(例如,抗SARS)活性的相加性或协同性增加。

[0010] 还公开了可以结合和抑制病毒蛋白如Mpro和NSP9的肽。

[0011] 在第一方面,本公开的特征在于一种嵌合体,所述嵌合体包括第一部分,所述第一部分附接到第二部分,其中所述第一部分和所述第二部分彼此直接附接或通过连接子彼此附接;所述第一部分与靶向降解的第一蛋白结合。在一些情况下,所述第一蛋白选自冠状病毒蛋白酶、冠状病毒非结构蛋白(NSP)或溴结构域和超末端结构域(BET)蛋白。所述第二部分与第二蛋白结合,其中所述第二蛋白是“蛋白降解剂”或者募集“蛋白降解剂”。在一些情况下,所述第二蛋白是E3泛素连接酶。

[0012] 在另一方面,本公开涉及一种嵌合体,其包括用于与病毒蛋白(Mpro、PLpro、NSP9、NSP12)或宿主蛋白(例如,BRD2、BRD3或BRD4)结合的装置,所述装置直接附接到第二部分或通过连接子附接到第二部分。所述第二部分与第二蛋白结合,其中所述第二蛋白是“蛋白降解剂”或者募集“蛋白降解剂”。在一些情况下,所述第二蛋白是E3泛素连接酶。

[0013] 在另一方面,本公开提供了第一部分,其与靶向降解的第一蛋白(例如,冠状病毒蛋白酶、冠状病毒非结构蛋白(NSP)或溴结构域和超末端结构域(BET)蛋白)结合,所述第一部分直接或通过连接子附接到用于与E3连接酶(例如,HDM2、VHL、cereblon、XIAP、cIAP、COP1)结合的装置。

[0014] 在一些情况下,所述第一部分和所述第二部分通过连接子彼此附接。例如,所述连接子可以是肽连接子、化学连接子、甘氨酸-丝氨酸连接子(如(G4S)₃(SEQ ID NO:26)或(G4S)₅(SEQ ID NO:27))、β-丙氨酸(Z)连接子、β-丙氨酸和丙氨酸(ZA)连接子或聚乙二醇连接子。

[0015] 在某些情况下,所述第一部分包括小分子、用弹头衍生的小分子、肽、装订肽、用弹头衍生的肽、用弹头衍生的装订肽或核苷酸类似物。

[0016] 在一些情况下,所述冠状病毒蛋白酶是木瓜蛋白酶样蛋白酶(PLpro)或主蛋白酶(Mpro);所述冠状病毒NSP是NSP9或NSP12;并且所述BET蛋白是溴结构域2(BRD2)、溴结构域3(BRD3)或溴结构域4(BRD4)。

[0017] 在一种情况下,所述冠状病毒蛋白酶是PLpro,并且所述第一部分与PLpro结合。与PLpro结合的所述第一部分可以是PLpro抑制剂。在一些情况下,所述PLpro抑制剂是GRL-0617或其PLpro结合类似物、双硫仑或PLpro结合硫嘌呤类似物。

[0018] 在某些情况下,所述冠状病毒蛋白酶是Mpro,并且所述第一部分与Mpro结合。在一些情况下,所述Mpro抑制剂是洛匹那韦(Lopinavir)、利托那韦(Ritonavir)、地瑞那韦(Darunavir)、ASC09、ASC09F、GC376、GC813、依布硒啉(Ebselen)羧酸或肽。在某些情况下,所述肽包括与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3中所示的序列具有至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%同一性的氨基酸序列,其中所述肽结合并抑制Mpro。在某些情况下,除了1个至5个氨基酸取代之外,所述肽包括SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列,其中所述肽结合并抑制Mpro。所述取代可以用保守氨基酸进行。在一些情况下,所述取代可以用非保守氨基酸进行,只要所述肽结合并抑制Mpro即可。

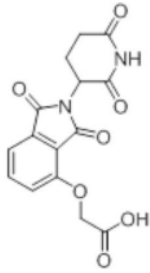
[0019] 在一些情况下,所述BET蛋白是BRD4,并且所述第一部分与所述BET蛋白结合。在一些情况下,与所述BET蛋白结合的所述第一部分是BET蛋白抑制剂。在某些情况下,所述BET蛋白抑制剂是JQ1、ABBV-075、I-BET151、I-BET726、OTX015或PFI-1或其与BRD4、BRD3和/或BRD2结合的类似物。

[0020] 在一些情况下,所述冠状病毒NSP是NSP9,并且所述第一部分与NSP9结合。在一些情况下,与NSP9结合的所述第一部分是NSP9抑制剂。在某些情况下,所述第一部分是包括与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5中所示的序列具有至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%同一性的氨基酸序列的肽,其中所述肽与NSP9结合。在某些情况下,除了1个至5个氨基酸取代之外,所述肽包括SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列,其中所述肽与NSP9结合。所述取代可以用保守氨基酸进行。在一些情况下,所述取代可以用非保守氨基酸进行,只要所述肽与NSP9结合即可。

[0021] 在某些情况下,所述冠状病毒NSP是NSP12,并且所述第一部分与NSP12结合。在一些情况下,与NSP12结合的所述第一部分是NSP12抑制剂。在某些情况下,所述第一部分是瑞德西韦(remdesivir)酸或其与NSP12结合的类似物、或索非布韦(sofosbuvir)酸或其与NSP12结合的类似物。

[0022] 在一些情况下,所述第二蛋白是人双微体2(HDM2)、Von Hippel-Lindau(VHL)、Cereblon、X连锁凋亡抑制蛋白(XIAP)、细胞凋亡抑制蛋白(cIAP)或组成型光形态建成1(COP1)。在一些情况下,所述第二部分包括与所述蛋白降解剂结合或募集所述蛋白降解剂的肽、装订肽或小分子。在一些情况下,所述第二部分包括cereblon结合部分,所述cereblon结合部分是小分子。在一些情况下,所述小分子选自下组:沙利度胺(thalidomide)、泊马度胺(pomalidomide)、来那度胺(lenalidomide)、阿伐度胺(avadomide)和其与cereblon结合的类似物。在一些情况下,所述第二部分包括沙利度胺部分。在一种情况下,所述沙利度胺部分包括以下提供的结构:

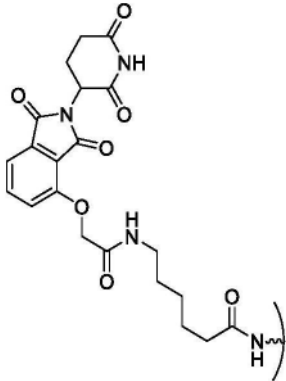
[0023]



[0024] 或其cereblon结合类似物。

[0025] 在一些情况下,所述沙利度胺部分包括以下提供的结构:

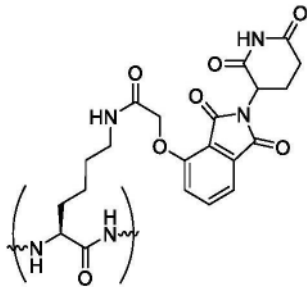
[0026]



或其cereblon结合类似物。

[0027] 在某些情况下,所述沙利度胺部分包括以下提供的结构:

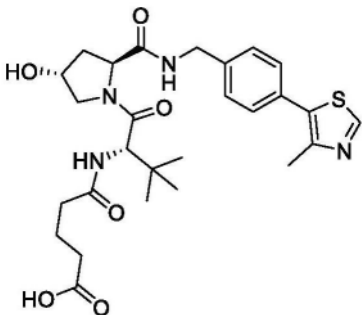
[0028]



或其cereblon结合类似物。

[0029] 在一些情况下,所述第二部分包括VHL结合部分,所述VHL结合部分任选地选自下组:VH 032和其VHL结合类似物。在某些情况下,所述VHL结合部分包括以下结构:

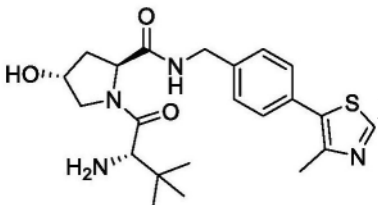
[0030]



或其VHL结合类似物。

[0031] 在一些情况下,所述VHL结合部分包括以下结构:

[0032]



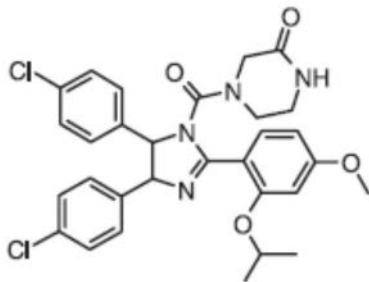
或其VHL结合类似物。

[0033] 在一些情况下,所述第二部分包括HDM2结合部分。在某些情况下,所述HDM2结合部分包括与HDM2和/或HDMX结合的p53的反式激活结构域的肽或装订肽或其它化学稳定的肽。在一些情况下,所述HDM2结合部分是装订肽,所述装订肽是ATSP-7041、SP645或其HDM2结合变体。

[0034] 在某些情况下,所述装订肽包括序列LTF (R8) EYWAQ# (S5) SAA (SEQ ID NO:7),其中(R8)是(R)-2-(7'-辛烯基)丙氨酸,#是环丁基丙氨酸,并且(S5)是(S)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸;或其HDM2结合变体。在某些情况下,所述装订肽包括与SEQ ID NO:7中所示的序列具有至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%同一性的氨基酸序列,其中所述装订肽与HDM2结合。在一些情况下,所述装订肽包括与SEQ ID NO:7中所示的序列具有至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%同一性的氨基酸序列,其中所述肽的相互作用面上的氨基酸未被取代,并且其中所述装订肽与HDM2结合。在一些情况下,所述装订肽包括与SEQ ID NO:7中所示的序列具有至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%同一性的氨基酸序列,其中所述肽的相互作用面上的氨基酸中的一个或多个氨基酸被保守氨基酸取代并且其中所述装订肽与HDM2结合。在某些情况下,除了1、2、3、4、5或6个氨基酸取代之外,所述装订肽包括SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列,其中所述装订肽与HDM2结合。所述取代可以用保守氨基酸进行。在一些情况下,所述取代可以用非保守氨基酸进行,只要所述肽与HDM2结合即可。

[0035] 在某些情况下,所述装订肽包括序列LTF (R8) EYWAQL (S5) SAA (SEQ ID NO:1),其中(R8)是(R)-2-(7'-辛烯基)丙氨酸,#是环丁基丙氨酸,并且(S5)是(S)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸;或其HDM2结合变体。在某些情况下,所述装订肽包括与SEQ ID NO:1中所示的序列具有至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%同一性的氨基酸序列,其中所述装订肽与HDM2结合。在一些情况下,所述装订肽包括与SEQ ID NO:1中所示的序列具有至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%同一性的氨基酸序列,其中所述肽的相互作用面上的氨基酸未被取代,并且其中所述装订肽与HDM2结合。在一些情况下,所述装订肽包括与SEQ ID NO:1中所示的序列具有至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%同一性的氨基酸序列,其中所述肽的相互作用面上的氨基酸中的一个或多个氨基酸被保守氨基酸取代并且其中所述装订肽与HDM2结合。在某些情况下,除了1、2、3、4、5或6个氨基酸取代之外,所述装订肽包括SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列,其中所述装订肽与HDM2结合。所述取代可以用保守氨基酸进行。在一些情况下,所述取代可以用非保守氨基酸进行,只要所述肽与HDM2结合即可。

[0036] 在一些情况下,所述HDM2结合部分是Nutlin-3a或其HDM2结合类似物。在一些情况下,所述HDM2结合部分包括以下结构:

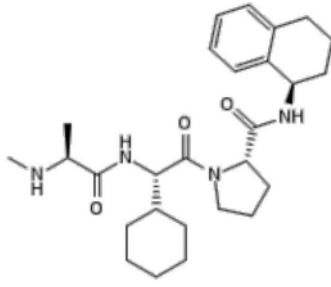


[0037]

[0038] 在某些情况下,所述第二部分包括XIAP结合部分,所述XIAP结合部分是A410099.1

或其XIAP结合类似物。在一些情况下,所述XIAP结合部分包括以下结构:

[0039]



[0040] 在某些情况下,所述第二部分包括cIAP结合部分,所述cIAP结合部分是SM-1295、SM-1280或其cIAP结合类似物。

[0041] 在一些情况下,所述第二部分包括与WD40重复蛋白结合的肽,所述WD40重复蛋白是E3泛素连接酶的底物衔接子。所述肽包括与所述WD40重复蛋白结合的天然结合序列的经修饰版本或氨基酸序列的天然结合共有序列。所述经修饰版本包括在天然结合共有序列内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其任何组合。在某些情况下,所述WD40重复蛋白是E3泛素连接酶HDM2或VHL的底物衔接子。在一些情况下,所述天然结合共有序列SEQ ID NO.:14或15或其变体,其中所述变体在一个至六个氨基酸位置处与所述共有序列不同。

[0042] 在某些情况下,所述第二部分包括COP1结合部分。在一些情况下,所述COP1结合部分是肽,所述肽是Tribbles假激酶1(Trib1)肽或其COP1结合变体。在一些情况下,所述肽包括序列DQIVPEY(SEQ ID NO:6)或包括与SEQ ID NO:6中所示的序列具有至少30%同一性的氨基酸序列的肽。

[0043] 在一些情况下,所述蛋白降解剂促进了所述第一蛋白的降解。例如,E3泛素连接酶促进所述第一蛋白的泛素化和降解。

[0044] 在另一方面,本公开涉及一种嵌合体,其包括具有图7或图14A中所描绘的分子中的任一分子的结构分子。

[0045] 在另一方面,本公开的特征在于一种药物组合物,其包含本文公开的肽或嵌合体和药学上可接受的载体。在一些情况下,所述药物组合物被调配用于口服、静脉内、局部、口腔、直肠、肠胃外、腹膜内、皮内、皮下、肌肉内、经皮、鼻内、经肺或气管内施用。

[0046] 在又另一方面,本公开提供了一种治疗或预防有需要的受试者的由冠状病毒引起的病毒感染的方法。所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的肽、嵌合体或本文公开的药物组合物。

[0047] 在另一方面,本公开的特征在于一种用于阻断有需要的受试者中冠状病毒的病毒复制并且降低所述受试者中冠状病毒的病毒传染性的方法。所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的肽、嵌合体或本文公开的药物组合物。在一些情况下,所述冠状病毒是中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)、严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)或SARS-CoV-2。

[0048] 在另一方面,本公开提供了一种用于阻断有需要的受试者中SARS-CoV或SARS-CoV-2的复制的方法。所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的肽、嵌合体或本文公开的药物组合物。

[0049] 在另一方面,本公开的特征在于一种用于治疗或预防有需要的受试者的RNA病毒

感染的方法。所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的肽、嵌合体或本文公开的药物组合物。

[0050] 在一些情况下,以上方法可以进一步包括向所述受试者施用一种或多种选自下组的药剂:皮质类固醇(corticosteroid)、氢化可的松(hydrocortisone)、甲泼尼龙(methylprednisolone)、地塞米松(dexamethasone)、瑞德西韦、IL-6抑制剂、IL-1抑制剂、激酶抑制剂、补体抑制剂、伊维菌素(ivermectin)、羟氯喹、法匹拉维(favipiravir)、干扰素 β 和艾替班特(icitibant)。

[0051] 在一些情况下,所述受试者选自下组:人、灵长类动物、蝙蝠、鸟、小鼠、火鸡、牛、猪、猫和狗。在一种情况下,所述受试者是人。

[0052] 在另一方面,本公开提供了一种包括在SEQ ID NO.:2或3中所示的氨基酸序列的肽或其变体(例如,通过1、2、3、4、5、6或7个氨基酸取代或缺失与SEQ ID NO.:2或3不同的肽),其中所述肽结合并抑制Mpro。

[0053] 在另一方面,本公开的特征在于一种稳定(例如,装订或缝合)肽,其包括肽,所述肽包括具有1、2、3、4、5或6个氨基酸取代的SEQ ID NO.:2或3中所示的氨基酸序列,其中至少两个氨基酸取代用非天然氨基酸替代由三个或六个氨基酸分开的氨基酸,并且其中所述肽结合并抑制Mpro。当所述氨基酸取代用非天然氨基酸替代由三个氨基酸分开的氨基酸时,所述非天然氨基酸都是S5。当所述氨基酸取代用非天然氨基酸替代由六个氨基酸分开的氨基酸时,所述非天然氨基酸分别为R8[(R)-2-(7'-辛烯基)丙氨酸]和S5[(S)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸],或R5[(R)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸]和S8[(S)-2-(7'-辛烯基)丙氨酸]。

[0054] 在一些情况下,所述肽或所述稳定肽的长度小于50、40、35、30、25、24、23或21个氨基酸。

[0055] 在另一方面,本公开的特征在于一种肽,其包括SEQ ID NO.:4或5中所示的氨基酸序列或其变体,其中所述肽与NSP9结合。在一些情况下,所述肽抑制NSP9的二聚化。

[0056] 在另一方面,本公开提供了一种稳定(例如,装订、缝合)肽,其包括肽,所述肽包括具有1、2、3、4、5或6个氨基酸取代的SEQ ID NO.:4或5中所示的氨基酸序列,其中至少两个氨基酸取代用非天然氨基酸替代由三个或六个氨基酸分开的氨基酸,并且其中所述肽与NSP9结合。在一些情况下,所述稳定肽抑制NSP9的二聚化。

[0057] 在一些情况下,所述肽或所述稳定肽的长度小于50、40、35、30、25、24、23、22或21个氨基酸。

[0058] 在另一方面,本公开的特征在于一种药物组合物,其包含本文公开的肽或稳定肽和药学上可接受的载体。

[0059] 在又另一方面,本公开提供了一种治疗或预防有需要的受试者的冠状病毒感染的方法。所述方法涉及向所述受试者施用治疗有效量的本文描述的肽、稳定肽或药物组合物。在一些情况下,所述受试者是人受试者。在一些情况下,所述受试者是猫、狗、马、羊、鸡或牛。

[0060] 本公开的特征还在于一种药物组合物,其包含用于抑制Mpro或NSP9的手段和药学上可接受的载体。

[0061] 除非另外定义,否则本文使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理解的含义相同的含义。尽管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,但是下面描述了示例性方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献通过引用整体并入本文。如有冲突,以本申请(包括定义)为准。这些材料、方法和实施例仅是说明性的并且不旨在是限制性的。

[0062] 为避免任何疑问,强调“在一些实施方式中”、“在某些实施方式中”、“在某些情况下”、“在一些情况下”、“在另外的实施方式中”、“在一个实施方式中”和“在另外的实施方式中”等表达被使用并且意味着使得在阅读其中描述的实施方式中的任何实施方式时,要考虑结合这些实施方式的特征中的每个特征,并且必须以与将在一个实施方式中阐述那些实施方式的特征的组合相同的方式来处理本公开。对于所附权利要求的并且在实施例中说明的实施方式和特征的任何组合也是如此,它们也旨在与说明书中公开的对应实施方式的特征相结合,其中仅为了一致性和简明性,实施方式的特征在于依赖性,而事实上,由于(多个)依赖性而可以解释的每个实施方式和特征的组合必须被视为字面上公开的,而不被认为是不同选择中的选择。在该上下文中,本领域技术人员将理解,实施例中公开的实施方式和特征旨在被概括为具有与其中例示的功能相同的等同物。

[0063] 本发明的其它特征和优点将根据以下详细描述和权利要求书而显而易见。

附图说明

[0064] 图1是示出了PLpro和HDM2导向的装订肽蛋白水解靶向嵌合体(SP-PROTAC)使PLpro蛋白(SARS-CoV-2的必需蛋白酶)降解并增加宿主细胞中p53水平的机制的示意图。HDM2结合装订肽从HDM2/HDMX-p53复合物中替代p53,从而增加游离p53的水平(由向上箭头表示),而SP-PROTAC的PLpro结合部分与PLpro结合并使其接近E3泛素连接酶HDM2,这引起PLpro的泛素化和最终降解(由向下箭头表示)。Ub:泛素;Hdm2:人双微体2;p53:肿瘤蛋白p53;PLpro:木瓜蛋白酶样蛋白酶;E2:泛素缀合酶。

[0065] 图2顶部小图示出了用于生成各种装订肽的示例性非天然氨基酸的化学结构。

[0066] 图2中部小图示出了用沿着肽螺旋的长度跨越离散距离($i, i+3; i, i+4$ 和 $i, i+7$)的不同长度的装订生成装订肽。

[0067] 图2底部小图展示了如何沿着肽序列实现装订行走(staple walk)。

[0068] 图3示出了各种双重装订和三重装订策略以及用于生成装订肽的示例性装订行走。

[0069] 图4展示了用于生成装订肽的示例性装订行走。

[0070] 图5示出了SP-PROTAC的肽配体组分可以通过诱变、不同的装订或缝合插入以及通过分所、缺失、添加或衍生化进行的肽序列突变来优化的各种方式。

[0071] 图6示出了可以用于生成装订肽(在这种情况下为 $i, i+7$ 装订肽)的示例性闭环复分解(RCM)装订反应。

[0072] 图7描绘了被设计用于靶向必需SARS-CoV-2蛋白(PLpro)和与SARS-CoV-2蛋白结合的宿主蛋白(BRD4和/或BRD2)的两种装订肽嵌合体的结构:BRD4(JQ1/SP645 SP-PROTAC, 顶部)和PLpro(GRL0617/SP645 SP-PROTAC, 底部)。掺入装订肽(SP645LTF(R8)EYWAQL(S5)SAA(SEQ ID NO:1))以结合并募集HDM2(一种E3连接酶),并且包括小分子(JQ1或GRL0617)以与靶蛋白(分别为BRD4或PLpro)结合。可变长度和组成的连接子安装在嵌合体的两个结合组分之间,以确保蛋白质靶标的最佳接合。

[0073] 图8A示出了与野生型p53₁₄₋₂₉(SEQ ID NO:11)相比,各种HDM2结合装订p53肽(SAH-p53-1至4;分别为SEQ ID NO.:40至43)的 α -螺旋稳定水平。

[0074] 图8B描绘了与野生型p53₁₄₋₂₉(SEQ ID NO:11)相比,各种装订p53肽(SAH-p53-1至4;SEQ ID NO.:40至43)对HDM2的亲合力。

[0075] 图9A表示抗HIV治疗剂恩夫韦地(Enfuvirtide)、单重装订恩夫韦地和双重装订恩夫韦地随时间的衰减绘图,其突出显示了装订赋予肽蛋白酶抗性的能力。

[0076] 图9B示出了用于针对各种分子和嵌合体确定如通过尺寸排阻色谱法(SEC)评估的复合物形成的迹线。BRD4导向的SP-PROTAC+HDM2(第五迹线)诱导复合物形成,而HDM2单独(顶迹线);仅BRD4(第二迹线);HDM2+BRD4(第三迹线);HDM2+BRD4+SP645+JQ1(第四迹线)没有诱导复合物形成。

[0077] 图10A的图像示出了与用媒剂处理的HeLa细胞不同(顶排),用SP-PROTAC-BRD4处理的细胞表现出HDM2从细胞溶质(扩散染色)重新定位到实验锚定BRD4的核纤层(底排)。

[0078] 图10B是如通过体外泛素化测定所确定的在媒剂或SP-PROTAC-PLpro的存在下PLpro蛋白和泛素化PLpro蛋白水平的蛋白质印迹图像。

[0079] 图11A是在暴露于不同浓度的SP-PROTAC-BRD4的SJSA-1细胞中BRD4和p53水平的蛋白质印迹图像。肌动蛋白抗体用作负载对照。

[0080] 图11B是在选择性蛋白酶体抑制剂卡非佐米(carfilzomib)的存在下暴露于不同浓度的SP-PROTAC-BRD4的SJSA-1细胞中BRD4和p53水平的免疫印迹图像。肌动蛋白抗体用作负载对照。

[0081] 图12A示出了单独用SP645处理的细胞中BRD蛋白(BRD2/3/4)和p53转录靶标HDM2的水平。

[0082] 图12B描绘了单独用JQ1处理的细胞中BRD蛋白(BRD2/3/4)和p53转录靶标HDM2的水平。

[0083] 图12C描绘了用SP-PROTAC-BRD4处理的细胞中BRD蛋白(BRD2/3/4)和p53转录靶标HDM2的水平。

[0084] 图13A示出了在SP645、JQ1或SP-PROTAC-BRD4的存在下SJSA-1细胞的活力(%)。数据表示平均值 \pm SEM,每组成对 $*p<0.05$ 。

[0085] 图13B描绘了在不同浓度的SP-PROTAC-PLpro1的存在下感染了SARS-CoV-2的Vero E6细胞的百分比(%)。数据表示平均值 \pm SEM,前三个条柱对后两个条柱 $*p<0.05$ 。

[0086] 图14A描绘了被设计成通过受感染宿主细胞的MDM2诱导病毒NSP9的靶向降解的两种SP-PROTACS,即SP-PROTAC-NSP9-1(SEQ ID NO:54)和SP-PROTAC-NSP9-2(SEQ ID NO:55)的组成。

[0087] 图14B展示了SP-PROTAC-NSP9-1和SP-PROTAC-NSP9-2可以募集MDM2以泛素化病毒靶蛋白USP9,如通过体外泛素化测定所证明的。

具体实施方式

[0088] 本公开基于蛋白水解靶向嵌合体(PROTAC)(例如,装订肽蛋白水解靶向嵌合体(SP-PROTAC))可以用于使病毒蛋白(例如,对病毒发病机理至关重要的必需病毒蛋白)降解的发现。在一些情况下,这些PROTAC同时在宿主细胞中诱导p53激增,以阻止病毒复制和发

病机理发生。本公开的特征在于使E3泛素连接酶接近RNA病毒(例如,冠状病毒)蛋白靶标以诱导降解(例如用于治疗目的)的分子。要降解的病毒靶标可以是任何病毒蛋白(例如,必需病毒蛋白,如冠状病毒蛋白酶或其它非结构蛋白(NSP)),或促进病毒发病机理的宿主蛋白(例如溴结构域和超末端结构域(BET)蛋白)。在一些情况下,病毒蛋白是冠状病毒木瓜蛋白酶样蛋白酶(PLpro)或主蛋白酶(Mpro);冠状病毒NSP是NSP9或NSP12。在某些情况下,BET蛋白是溴结构域2(BRD2)、溴结构域3(BRD3)或溴结构域4(BRD4)。在其它情况下,宿主蛋白是Sec61(一种内质网膜蛋白易位子)。

[0089] 本公开提供了通过将靶向病毒蛋白靶标(例如,与病毒蛋白(例如,必需病毒蛋白)或促进病毒发病机理的宿主蛋白结合)的第一部分与和作为或募集“蛋白降解剂”的蛋白质结合的第二部分(例如,配体)组合来充当蛋白质降解诱导部分的嵌合体。例如,第二部分募集催化靶标泛素化的酶或复合物,以这种方式标记要降解的靶标,所述靶标进而被蛋白酶体降解。在一些情况下,“蛋白降解剂”是泛素化并且因此靶向要降解的病毒蛋白的E3连接酶。

[0090] 第一部分可以包括小分子、用弹头衍生的小分子、肽、装订肽、用弹头衍生的肽或装订肽,或与必需病毒蛋白或宿主蛋白结合的核苷酸类似物。在一些情况下,第一部分是PLpro结合剂如GRL-0617或其PLpro结合类似物、双硫仑或PLpro结合硫嘌呤类似物。在其它情况下,第一部分是Mpro结合剂,如洛匹那韦、利托那韦、地瑞那韦、ASC09、GC376、GC813、依布硒啉羧酸或肽,所述肽包括与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3中所示的序列至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些情况下,第一部分是NSP9结合剂,如包括与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5中所示的序列至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的肽。在其它情况下,第一部分是NSP12结合剂,如瑞德西韦酸、索非布韦酸或其类似物。在某些情况下,第一部分是BET蛋白结合剂,如JQ1、ABBV-075、I-BET151、I-BET726、OTX015或PFI-1或其类似物。在其它情况下,第一部分是Sec61蛋白结合剂,如PS3061或其类似物。

[0091] 第二部分可以包括与E3泛素连接酶结合或募集E3泛素连接酶的配体(例如,肽、装订肽或小分子),或与WD40重复蛋白结合的肽,所述WD40重复蛋白是E3泛素连接酶的底物衔接子。E3泛素连接酶可以是人双微体2(HDM2)、Von Hippel-Lindau(VHL)、Cereblon、X连锁凋亡抑制蛋白(XIAP)、细胞凋亡抑制蛋白(cIAP)或组成型光形态建成1(COP1)。在某些情况下,HDM2结合部分可以包括与HDM2和/或HDMX结合的p53的反式激活结构域的肽或装订肽,或小分子(例如Nutlin-3a或Nutlin-3a的衍生物,如RG7112和RG7388(依达奴林(Idasanutlin)))或其HDM2结合类似物。在一些情况下,Cereblon结合部分是沙利度胺、泊马度胺、来那度胺、阿伐度胺或其Cereblon结合类似物。在其它情况下,VHL结合部分是VH032或其VHL结合类似物。在一些情况下,XIAP结合部分可以是A410099.1或XIAP结合类似物。在某些情况下,cIAP结合部分可以是SM-1295或SM-1280,或cIAP结合类似物。在其它情况下,COP1结合部分可以包括来自Tribbles假激酶1(Trib1-UniProtKB-Q96RU8)的肽或装订肽8至50个氨基酸序列。通过将有效结合并募集降解蛋白的肽或小分子与靶向必需病毒蛋白或有助于病毒发病机理的宿主蛋白的小分子、肽或核苷酸类似物相组合,这类新的降解决定子嵌合体提供了新的化合物来对抗病毒感染。在一些情况下,病毒感染是冠状病毒

感染,如SARS-CoV-2。本公开还提供了包含所描述的降解决定子嵌合体的药物组合物。进一步地,本公开提供了使用所描述的嵌合体和组合物治疗病毒感染、阻断病毒复制并降低病毒传染性的方法。因为PLpro也参与逃避宿主免疫系统的病毒机制,所以本公开的嵌合体的关键优点是它们被设计成既阻断病毒复制又恢复免疫系统杀死受感染细胞的能力。

[0092] 本公开所涵盖的嵌合体的非限制性实例包括图7和14A中所示出的分子中的每种分子。

[0093] I. 靶向降解的第一蛋白

[0094] 靶向降解的第一蛋白可以是在病毒发病机理中起作用的任何蛋白。在一些情况下,病毒蛋白是必需病毒蛋白。在一些情况下,靶向降解的蛋白是宿主蛋白,所述宿主蛋白有助于病毒的一些活动。

[0095] I. (a) 必需病毒蛋白

[0096] 可以用本公开的嵌合体靶向的必需病毒蛋白包括在病毒复制和/或发病机理(包括病毒进入细胞)中起作用的任何病毒蛋白。在一些实施方式中,必需病毒蛋白是来自RNA病毒的病毒蛋白,所述RNA病毒如严重急性呼吸综合征相关冠状病毒-2(SARS-CoV)、SARS-CoV2和中东呼吸综合征相关冠状病毒(MERS-CoV)。例如,病毒蛋白是NSP,如来自SARS-CoV2的冠状病毒蛋白酶。在一些实施方式中,冠状病毒蛋白酶是PLpro或Mpro。在一些实施方式中,NSP是NSP9或NSP12。在其它实施方式中,必需病毒蛋白是来自RNA病毒的病毒蛋白,所述RNA病毒如丙型肝炎病毒(HCV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)、单纯疱疹病毒(HSV)、寨卡病毒(Zika virus)和肠道病毒。

[0097] I. (a) (1) 冠状病毒蛋白酶

[0098] 本文所描述的冠状病毒蛋白酶包括主蛋白酶(Mpro)和木瓜蛋白酶样蛋白酶(PLpro),它们是加工冠状病毒基因组RNA复制所必需的复制酶多聚蛋白所需要的。这些冠状病毒蛋白酶通过广泛的蛋白水解加工以协调的方式将两种翻译的病毒多聚蛋白(PP1A和PP1AB)切割成单独的功能组分(Chen Y.W.等人《F1000研究(F1000Research)》,2020,9:129)。

[0099] 作为SARS-CoV-2的主要蛋白水解加工酶,Mpro在产生病毒生命周期所必需的成熟蛋白(NSP5-16)的自动加工蛋白水解反应中发挥主要作用(Chang,G.G.等人《SARS冠状病毒的分子生物学》,115-128(2009))。Mpro(也称为3C样蛋白酶(3CLpro))在病毒复制中的功能重要性,加上人类缺乏密切相关的同源物,使得Mpro成为抗病毒药物设计的有吸引力的靶标。

[0100] PLpro是一种加工病毒复制所需的病毒多聚蛋白和宿主细胞蛋白的多功能半胱氨酸蛋白酶(Baez-Santos,Y.M.等人,《病毒学杂志》88,12511-27(2014))。PLpro还涉及促进p53降解(Ma-Lauer,Y.等人《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci U S A)》113,E5192-201(2016))和逃避宿主免疫系统(去泛素化和去ISG化(deISGylating)活性(Ratia,K.,等人《公共图书馆:病原体(PLoS Pathog)》10,e1004113(2014))的病毒机制。因此,用抗病毒药物靶向PLpro的优点不仅可以在于抑制病毒复制,而且可以在于抑制受感染细胞中可能导致周围未感染细胞的细胞死亡的信号传导级联的失调。

[0101] I. (a) (2) 冠状病毒非结构蛋白

[0102] 本文所描述的冠状病毒非结构蛋白(NSP)是可以使用本公开的嵌合体靶向的必需

蛋白。这些非结构蛋白包括冠状病毒蛋白酶、NSP9和NSP12。冠状病毒复制和转录由复制酶基因中编码的15或16个病毒NSP驱动,其中任何一个NSP都可以被本公开的嵌合体靶向。这些NSP是在PP1a和PP1ab复制酶多聚蛋白的共翻译和翻译后加工期间产生的 (te Velthuis, Aartjan J.W.等人《核酸研究 (Nucleic acids research)》38,1 (2010):203-14)。多亚基冠状病毒RNA合成机制是NSP的复合物 (Kirchdoerfer, R.N., Ward, A.B.《自然通讯 (Nat Commun)》10,2342 (2019))。

[0103] NSP9是病毒复制复合物的必需蛋白。其活性还取决于其由含有蛋白质-蛋白质相互作用基序GXXXG (SEQ ID NO:8)的平行 α 螺旋介导的二聚化。NSP12是冠状病毒RNA复制复合物的具有RNA依赖性RNA聚合酶 (RdRp)活性的催化亚基。NSP12具有阻断病毒RNA复制的所有病毒聚合酶和核苷酸类似物所共有的结构。

[0104] I. (a) (3) 促进病毒发病机理的宿主蛋白

[0105] 可以用本公开的嵌合体靶向的蛋白的另一个实例可以是在病毒发病机理中起作用的宿主蛋白。例如,宿主蛋白可以是人蛋白,如溴结构域和超末端结构域 (BET) 蛋白。在一些实施方式中,BET蛋白是溴结构域2 (BRD2) 或溴结构域4 (BRD4)。在其它实施方式中,BET蛋白是溴结构域3 (BRD3)。

[0106] II. 嵌合体的第一部分

[0107] 本公开的嵌合体的第一部分与靶向降解的蛋白质 (例如冠状病毒蛋白酶) 结合。第一部分可以包括小分子、用弹头衍生的小分子、肽、装订肽、用弹头衍生的肽或装订肽或核苷酸类似物。例如,第一部分可以靶向病毒蛋白 (例如,病毒复制或发病机理所需的必需病毒蛋白)。在一些情况下,第一部分可以靶向有助于病毒发病机理的宿主蛋白。第一部分可以完全或部分充当“分子胶”,其可以与靶向降解的蛋白结合,但其本身不一定具有任何抑制或激动作用。

[0108] 在一些实施方式中,第一部分是或包括Mpro结合剂,如Mpro抑制剂。在其它实施方式中,第一部分是或包括PLpro结合剂,如PLpro抑制剂。在某些实施方式中,第一部分是或包括NSP结合剂,如NSP抑制剂 (例如NSP9或NSP12抑制剂)。在其它实施方式中,第一部分是或包括BET结合剂,如BRD抑制剂 (例如,BRD2、BRD3或BRD4抑制剂)。

[0109] II. (a) Mpro结合剂

[0110] 本公开所涵盖的Mpro结合剂包括与Mpro直接相互作用的药剂,如Mpro抑制剂。Mpro抑制剂可以抑制Mpro二聚化和/或Mpro酶活性。Mpro抑制剂,如以下文献中所描述的那些可以用于本公开:Jin Z等人《自然》2020 582:289-293;Zumla A等人;《自然评论药物发现 (Nat.Rev.Drug Disc.)》2016 (10):327;Li G和Clercq ED.《自然评论药物发现》2020年2月;Ghosh A.K.等人,《药物化学 (ChemMedChem)》2020 15 (11):907-932。

[0111] 在一些实施方式中,Mpro结合剂是肽 (例如,重组或合成产生的肽)。此类肽可以是非交联的、装订的或缝合的,只要所述肽与如本文所描述的Mpro相互作用即可。Mpro的酶活性依赖于形成由以下 α 螺旋序列介导的同二聚体:TVNVLAWLYAAVINGD (SEQ ID NO:9)。SEQ ID NO:9可以用于产生基于肽的二聚化抑制剂。在一些情况下,Mpro结合剂肽可以包括SEQ ID NO:9中的至少六个 (例如7、8、9、10、11、12、13、14、15或16个) 相邻氨基酸。在一些情况下,Mpro结合剂肽可以是SEQ ID NO:9的变体,例如,通过1、2、3、4、5或6个氨基酸取代、缺失和/或插入与SEQ ID NO:9不同,其中变体仍然可以与Mpro二聚。

[0112] 在一些实施方式中，Mpro结合剂肽可以包括例如SEQ ID NO:2或3中的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。在一些实施方式中，所述肽可以包括与例如SEQ ID NO:2或3的氨基酸序列的一部分或多部分相关或具有同一性的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。

[0113] 在一些情况下，所述肽可以与SEQ ID NO:2或3中的那些氨基酸具有至少或约30%、至少或约40%、至少或约50%、至少或约60%、至少或约70%、至少或约75%的同一性、至少或约80%、至少或约85%、至少或约90%、至少或约95%、至少或约98%、至少或约99%或100%的同一性，其中所述肽与Mpro结合。可替代地或另外，所述肽可以包括氨基酸取代和/或缺失，无论是否保守。例如，所述肽可以包括0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、少于10、少于5、少于4、少于3或少于2个氨基酸取代、缺失和/或添加，无论保守与否，前提是所述肽仍然可以与Mpro结合。因此，只要变体肽与Mpro结合，本文公开的任何Mpro结合肽的氨基酸序列就可以改变。

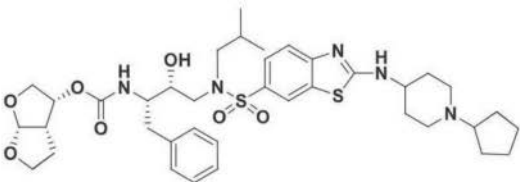
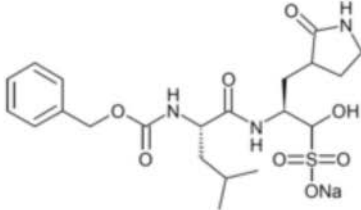
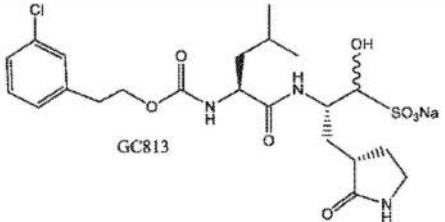
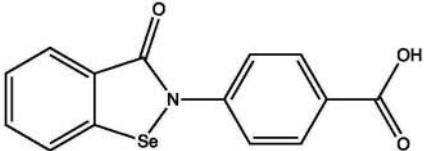
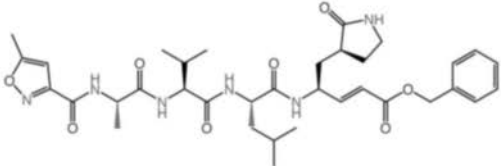
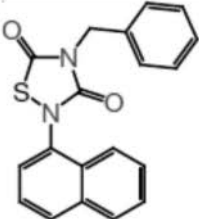
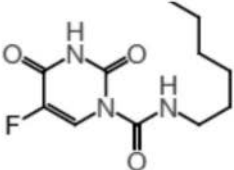
[0114] 在某些实施方式中，所述肽与SEQ ID NO:2或3的肽的不同之处在于，它们因具有1至4（例如，1、2、3、4）个氨基酸取代而与SEQ ID NO:2或3不同。例如，标记为“X”的位置可以在SEQ ID NO:2或3中如下取代：ATXNVLXWLYXAVIXGD（SEQ ID NO:51）。X可以是保守或非保守的氨基酸残基。在一些情况下，每个X是具有烯属侧链的非天然氨基酸（例如，S5）。

[0115] 可以用于本文所描述嵌合体的示例性Mpro结合剂具有以下提供的结构：

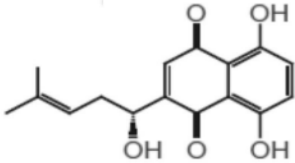
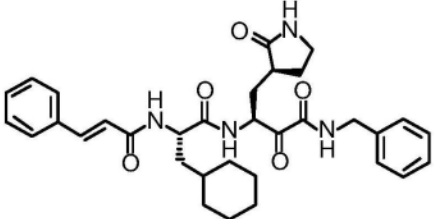
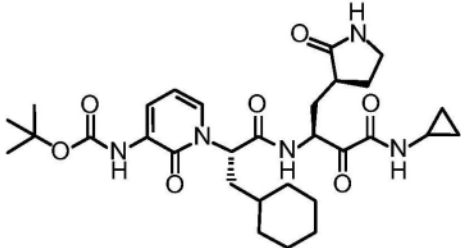
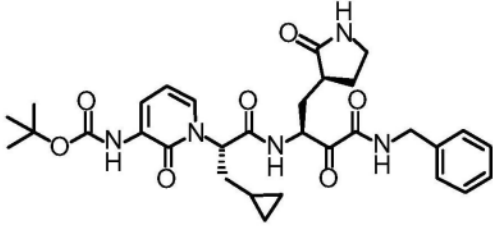
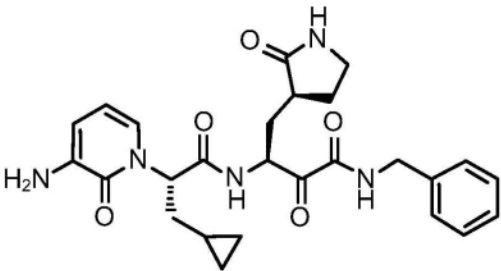
[0116] 表1：Mpro结合剂和其结构

Mpro 结合剂	结构
洛匹那韦 (ABT-378)	<p>The chemical structure of Lopinavir (ABT-378) is shown. It features a central chiral core with a hydroxyl group and a benzyl group. The core is substituted with a 3,4-dimethoxybenzyl group, a benzyl group, and a piperidine ring. The piperidine ring is further substituted with a methyl group and a carbonyl group.</p>
利托那韦 (诺韦)	<p>The chemical structure of Ritonavir (诺韦) is shown. It features a central chiral core with a hydroxyl group and a benzyl group. The core is substituted with a benzyl group, a thiazole ring, and a piperidine ring. The piperidine ring is further substituted with a methyl group and a carbonyl group.</p>
地瑞那韦	<p>The chemical structure of Darunavir is shown. It features a central chiral core with a hydroxyl group and a benzyl group. The core is substituted with a benzyl group, a sulfonamide group, and a piperidine ring. The piperidine ring is further substituted with a methyl group and a carbonyl group.</p>

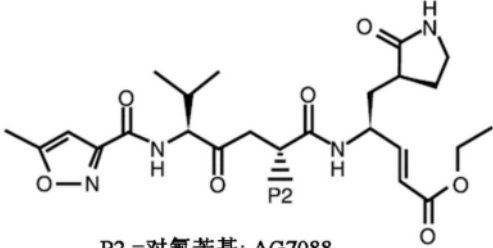
[0117]

Mpro 结合剂	结构
ASC09 (HIV 蛋白酶抑制剂)	
GC376 (ANIV-19)	
GC813	
[0118] 依布硒啉羧酸	
N3	
泰德格西布 (Tideglusib)	
卡莫氟 (Carmofur)	

[0119]

Mpro 结合剂	结构
Shikonon	
α -酮酰胺抑制剂 11r	
α -酮酰胺抑制剂 13a	
α -酮酰胺抑制剂 13b	
α -酮酰胺抑制剂 14b	

[0120]

Mpro 结合剂	结构
AG7088	 <p>P2 =对氟苯基: AG7088</p>

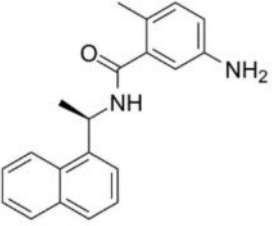
[0121] 表1中所示出的任何Mpro结合剂或其Mpro结合类似物可以用于本公开的嵌合体。

[0122] II. (b) PLpro结合剂

[0123] 本公开所涵盖的PLpro结合剂包括与PLpro直接相互作用的药剂,如PLpro抑制剂。PLpro抑制剂可以抑制PLpro酶活性。PLpro抑制剂,如以下文献中所描述的那些可以用于本公开的嵌合体:Baez-Santos,Y.M.等人《病毒学杂志》88,12511-27(2014);Li G和Clercq ED.《自然评论药物发现》2020年2月;Ghosh,A.K.等人《药物化学杂志》52,5228-40(2009);Baez-Santos,Y.M.等人《抗病毒研究》115,21-38(2015);Elfiky A和IbrahimNS.《生物物理学(Biophysics)》2020年2月11日;article/rs-13849/v1 DOI:10.21203/rs.2.23280/v1;Lin MH等人《抗病毒研究》2018;150:155-163。

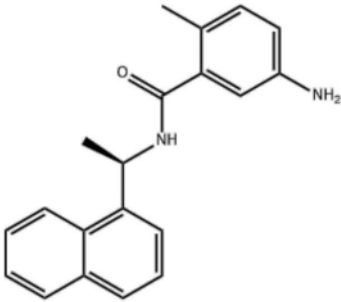
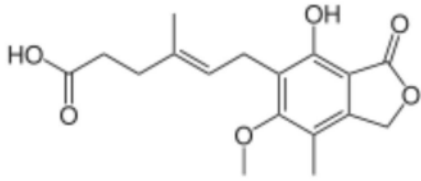
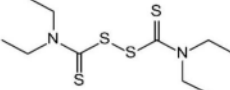
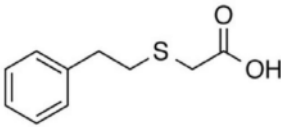
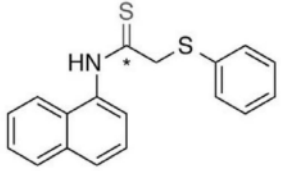
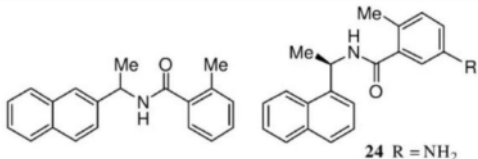
[0124] 可以用于本文所描述嵌合体的示例性PLpro结合剂具有以下提供的结构:

[0125] 表2:PLpro结合剂和其结构

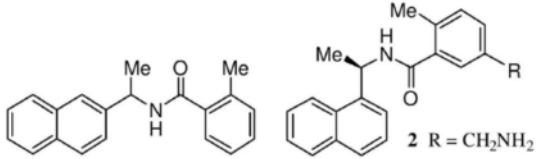
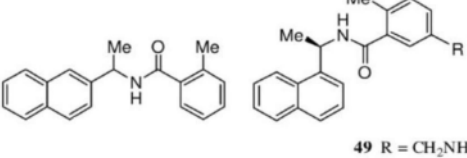
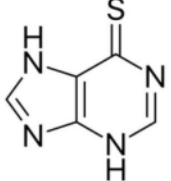
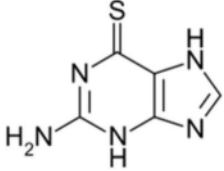
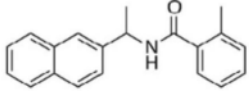
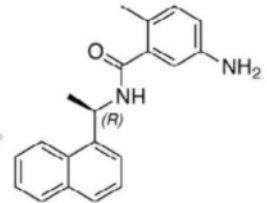
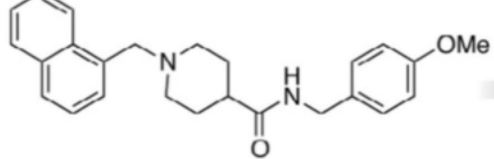
PLpro 结合剂	结构
GRL-0617	5-氨基-2-甲基-N-[(1R)-1-萘-1-基乙基]苯甲酰胺 

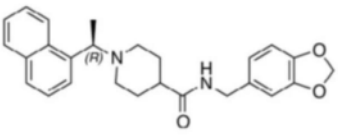
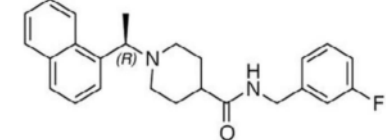
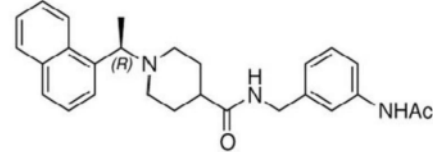
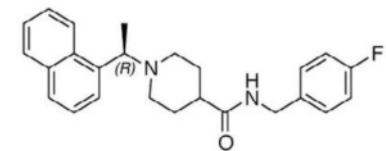
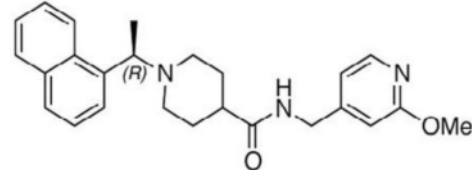
[0126]

[0127]

PLpro 结合剂	结构
GRL-0667	5-氨基-2-甲基-N-[(1R)-1-萘-1-基乙基]苯甲酰胺 
霉酚酸	
双硫仑	二硫化四乙基秋兰姆 
NSC158362	2-(苯乙基硫基)乙酸 
NSC158011	N-(1-萘基)-2-(苯硫基)乙硫酰胺 
抑制剂 24	 24 R = NH ₂

[0128]

PLpro 结合剂	结构
抑制剂 2	 <p>2 R = CH₂NH₂</p>
抑制剂 49	 <p>49 R = CH₂NHMe</p>
6-巯基嘌呤 (6MP、巯嘌呤 (Purinethol)、普瑞纳克斯 (Purinax))	
6-硫鸟嘌呤 (硫鸟嘌呤 (Tioguanine)、6TG、兰快舒 (Lanvis)、Tabloid)	
化合物 7724772	
化合物 24	
化合物 6577871	

PLpro 结合剂	结构
化合物 15g	
化合物 3k	
[0129] 化合物 3e	
化合物 3j	
化合物 5c	

[0130] 表2中所示出的任何PLpro结合剂或其PLpro结合类似物可以用于本公开的嵌合体。

[0131] II. (c) NSP9结合剂

[0132] 本公开的NSP9结合剂是可以直接与NSP9相互作用的药剂。NSP9结合剂可以是抑制NSP9二聚化和/或NSP9酶活性的NSP9抑制剂。在一些实施方式中, NSP9结合剂是肽(例如, 重组或合成产生的肽)。此类肽可以是非交联的、装订的或缝合的, 只要所述肽与如本文所描述的NSP9相互作用即可。NSP9的酶活性依赖于形成由以下 α 螺旋序列介导的同二聚体: NLNRGMVLGSLAATVRLQ (SEQ ID NO:10)。SEQ ID NO:10可以用于产生基于肽的二聚化结合剂。在一些情况下, NSP9结合剂肽可以包括SEQ ID NO:10中的至少六个(例如7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18个)相邻氨基酸。在一些情况下, 只要变体肽仍与NSP9结合, NSP9结合剂肽就可以包括SEQ ID NO:10中的至少1、2、3、4、5、6、7、或8个氨基酸取代或缺失。在一些情况下, NSP9结合剂肽包括序列GXXXG (SEQ ID NO:8), 其中每个X可以是任何氨基酸。在一些情况下, X是任何一个M、正亮氨酸(B)、V、L、A、G或I。

[0133] 在一些实施方式中, NSP9抑制剂肽可以包括例如SEQ ID NO:4或5的氨基酸序列, 由其组成或基本上由其组成。在一些实施方式中, 所述肽可以包括与例如SEQ ID NO:4或5的氨基酸序列的一部分或多部分相关或具有同一性的氨基酸序列。

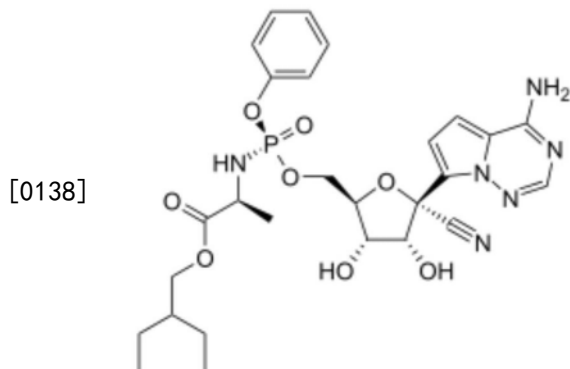
[0134] 在一些情况下, 所述肽可以与SEQ ID NO:4或5中的那些氨基酸具有至少或约

30%、至少或约40%、至少或约50%、至少或约60%、至少或约70%、至少或约80%、至少或约85%、至少或约90%、至少或约95%、至少或约98%、至少或约99%或100%的同一性,其中所述肽与NSP9结合。可替代地或另外,所述肽可以包括氨基酸取代和/或缺失,无论是否保守。例如,氨基酸可以包括0、1、2、3、4、5、6、7、8、少于10、少于5、少于4、少于3或少于2个氨基酸取代、缺失和/或添加,无论是否保守。因此,只要变体肽仍可以与NSP9结合,本文公开的任何NSP9结合肽的氨基酸序列就可以改变。在一些情况下,SEQ ID NO:4或5的NSP9结合剂肽或其变体可以在序列的每个末端处缩短1、2或3个氨基酸。在其它情况下,SEQ ID NO:4或5的NSP9结合剂肽或其变体可以不包括装订,包括一个装订(例如,在R8与S5之间形成的装订)或是双重装订的。

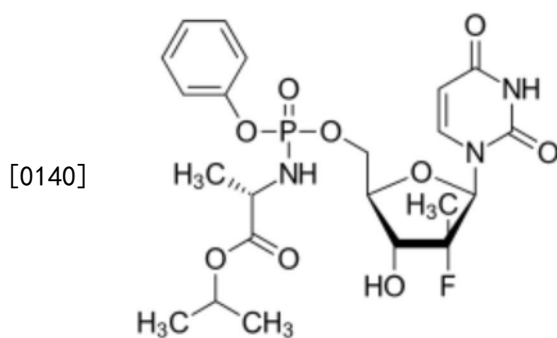
[0135] II. (d) NSP12结合剂

[0136] 本公开的NSP12结合剂包括直接与NSP12相互作用的药剂。NSP12结合剂可以是抑制NSP12酶活性的NSP12抑制剂。在一些实施方式中,NSP12抑制剂是瑞德西韦或索非布韦类似物(如瑞德西韦酸或索非布韦羧酸,或其药学上可接受的盐)。

[0137] 瑞德西韦的结构如下:



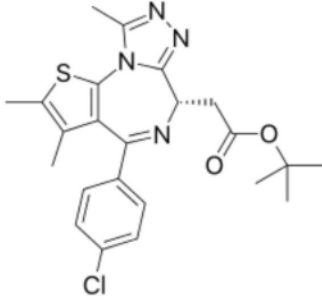
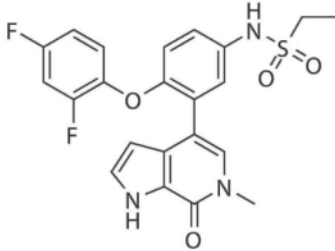
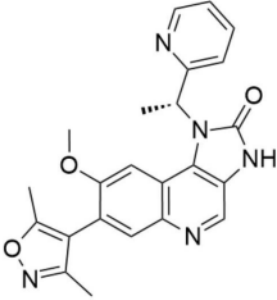
[0139] 索非布韦的结构如下:

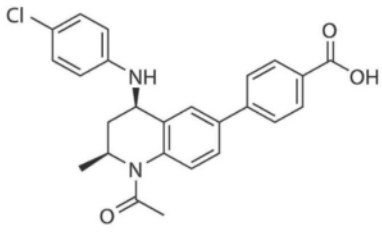
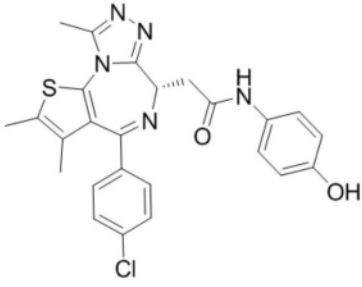
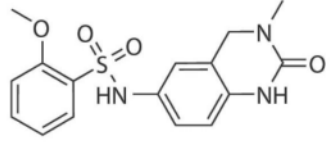


[0141] II. (e) BET结合剂

[0142] 本公开的BET结合剂包括与BET蛋白,例如溴结构域2(BRD2)、BRD3和/或BRD4直接相互作用的药剂。BET蛋白结合剂可以是抑制BET酶活性的BET蛋白抑制剂。在一些实施方式中,可以用于本文所描述的嵌合体的BET抑制剂具有以下提供的结构:

[0143] 表3: BET蛋白抑制剂和其结构

BET 蛋白抑制剂	结构
JQ1	 <p>The chemical structure of JQ1 is a complex heterocyclic molecule. It features a central benzimidazole ring system. One of the benzimidazole nitrogens is substituted with a 2,4-dimethylphenyl group. The other nitrogen is substituted with a 4-chlorophenyl group. A third substituent on the benzimidazole ring is a propyl chain, which is further substituted with a tert-butyl ester group at the end.</p>
[0144] ABBV-075 (米维布塞 (Mivebresib))	 <p>The chemical structure of ABBV-075 (Mivebresib) consists of a central pyridine ring. At the 2-position of the pyridine ring, there is a methyl group and a carbonyl group. At the 3-position, there is a methyl group. At the 4-position, there is a pyrazole ring. At the 5-position, there is a methoxy group. At the 6-position, there is a 2,4-difluorophenoxy group. Additionally, there is a sulfonamide group (-NH-SO₂-CH₂-CH₃) attached to the pyridine ring at the 4-position.</p>
I-BET151	 <p>The chemical structure of I-BET151 is a complex heterocyclic molecule. It features a central pyridine ring. At the 2-position of the pyridine ring, there is a methyl group and a carbonyl group. At the 3-position, there is a methyl group. At the 4-position, there is a pyrazole ring. At the 5-position, there is a methoxy group. At the 6-position, there is a 2,4-difluorophenoxy group. Additionally, there is a sulfonamide group (-NH-SO₂-CH₂-CH₃) attached to the pyridine ring at the 4-position.</p>

BET 蛋白抑制剂	结构
I-BET726	
[0145] OTX015 (比拉瑞塞 (Birabresib))	
PFI-1	

[0146] 表3中所示出的任何BET抑制剂或其BET抑制类似物可以用于本公开的嵌合体。

[0147] III. 嵌合体靶向的第二蛋白

[0148] 用本公开的嵌合体靶向的第二蛋白是或募集使第一靶蛋白(例如冠状病毒蛋白酶、冠状病毒NSP或BET蛋白)降解的蛋白降解剂。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人双微体2(HDM2)、Von Hippel-Lindau(VHL)、Cereblon、X连锁凋亡抑制蛋白(XIAP)、细胞凋亡抑制蛋白(cIAP)或组成型光形态建成1(COP1)。

[0149] IV. 嵌合体的第二部分

[0150] 本公开的嵌合体的第二部分与蛋白质结合,所述蛋白质是或募集“蛋白降解剂”(例如,E3泛素连接酶),所述蛋白降解剂使靶蛋白(例如,冠状病毒蛋白酶、冠状病毒NSP或BET蛋白)降解。在一些实施方式中,第二部分可以募集催化靶标泛素化的酶或复合物。“蛋白降解剂”的实例是泛素化靶蛋白,从而标记靶蛋白以供蛋白酶体降解的E3连接酶。

[0151] 第二部分可以是肽、装订肽或小分子。在一些实施方式中,第二部分是或包括cereblon结合部分、VHL结合部分、HDM2结合部分、XIAP结合部分、cIAP结合部分或COP1结合部分。

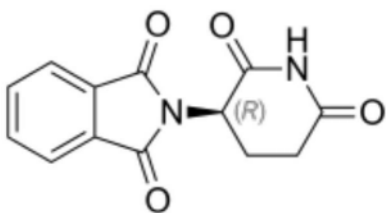
[0152] IV. (a) Cereblon结合部分

[0153] 本公开的嵌合体的第二部分可以是cereblon结合部分,所述cereblon结合部分是

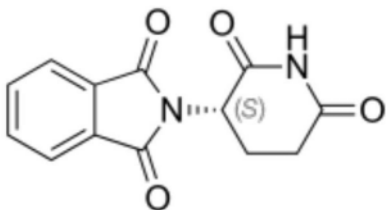
小分子或包括小分子。与cereblon结合的小分子的非限制性实例包括但不限于沙利度胺、泊马度胺、来那度胺、阿伐度胺、其类似物和其药学上可接受的盐。

[0154] 可以与cereblon结合的小分子具有以下结构：

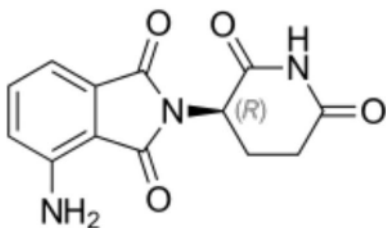
[0155] 沙利度胺：



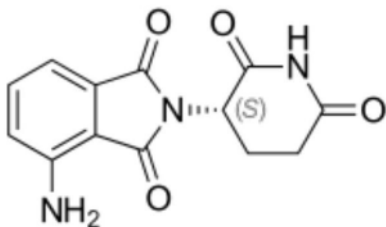
[0156]



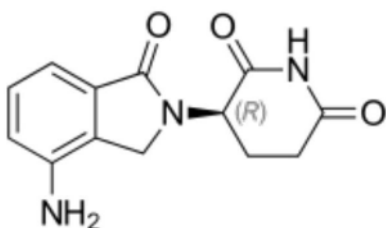
[0157] 泊马度胺：



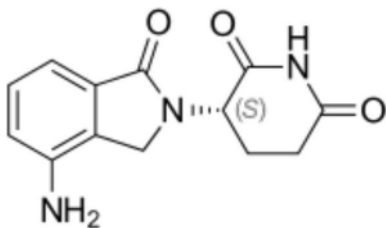
[0158]



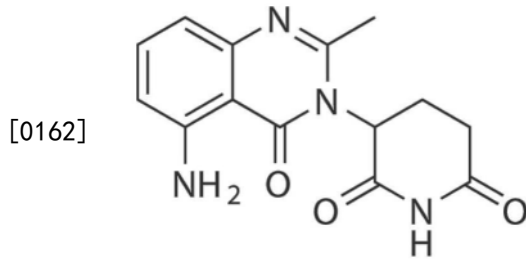
[0159] 来那度胺：



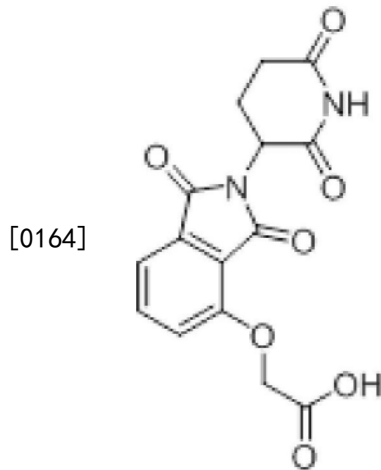
[0160]



[0161] 阿伐度胺：

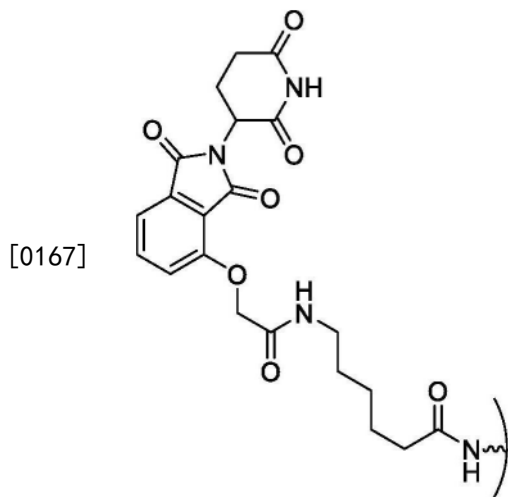


[0163] 在一个实施方式中,与cereblon结合的小分子基于具有以下提供的结构的沙利度胺:



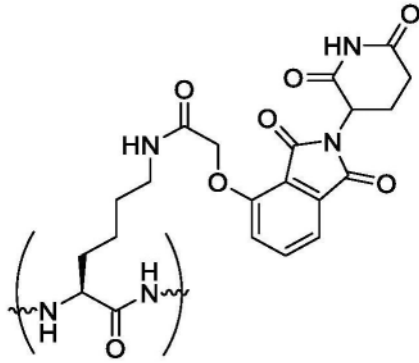
[0165] 在一些实施方式中,cereblon结合部分与第一蛋白靶向装订肽的N末端缀合。在一些情况下,cereblon部分与第一蛋白靶向装订肽的C末端缀合。在某些情况下,cereblon部分包含在肽序列中插入的第一蛋白靶向装订肽的N末端与C末端之间的非天然氨基酸内。

[0166] 在一些情况下,与cereblon结合的小分子(沙利度胺)可以在第一蛋白靶向部分(例如,肽)的N末端处缀合。当小分子(沙利度胺)在肽的N末端处缀合时,其具有以下示出的结构:



[0168] 在某些情况下,当小分子(沙利度胺)在第一蛋白靶向肽的C末端处缀合时,其具有以下示出的结构:

[0169]



[0170] 在某些情况下, cereblon结合部分包含在肽序列中插入的第一蛋白靶向装订肽的N末端与C末端之间的非天然氨基酸内。

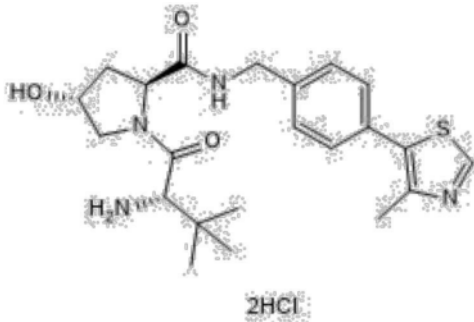
[0171] IV. (b) VHL结合部分

[0172] 本公开的嵌合体的第二部分可以是VHL结合部分, 所述VHL结合部分是小分子或包括小分子。与VHL结合的小分子的非限制性实例包括但不限于VH 032和其VHL结合类似物。

[0173] 可以与VHL结合的小分子具有以下结构:

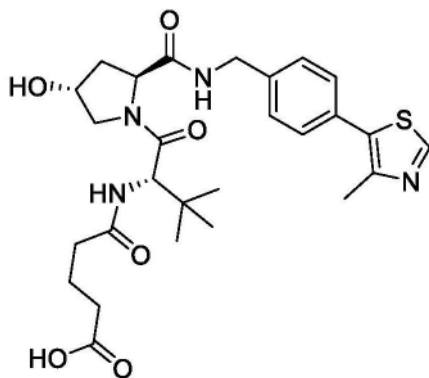
[0174] VH 032:

[0175]



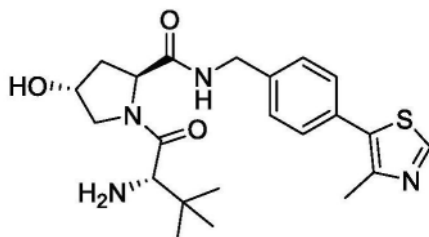
[0176] 在一些情况下, 当VHL部分与胺缀合时, 使用下图所示的羧酸盐类似物:

[0177]



[0178] 在一些情况下, VHL部分包括以下结构(与酸残基缀合相容):

[0179]



[0180] 在一些实施方式中, VHL结合部分与第一蛋白靶向装订肽的N末端缀合。在一些情

况下,VHL部分与第一蛋白靶向装订肽的C末端缀合。在某些情况下,VHL部分包含在肽序列中插入的第一蛋白靶向装订肽的N末端与C末端之间的非天然氨基酸内。

[0181] 在某些情况下,VHL结合部分是具有以下列出的肽的氨基酸序列的肽或其VHL结合变体:

[0182] LAPAAGDTIISLDF (SEQ ID NO:12) -E3连接酶:VHL;

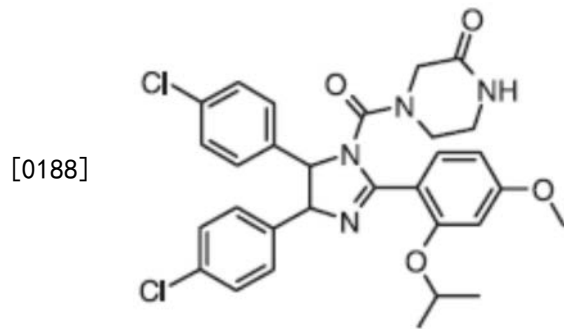
[0183] LAPYIPMDDDFQL (SEQ ID NO:13) -E3连接酶:VHL。

[0184] 所述变体可以在例如1、2、3、4、5或6个氨基酸位置处(例如,通过用另一个氨基酸取代、插入或缺失)与SEQ ID NO:12或13不同,前提是所述变体仍然与VHL结合。

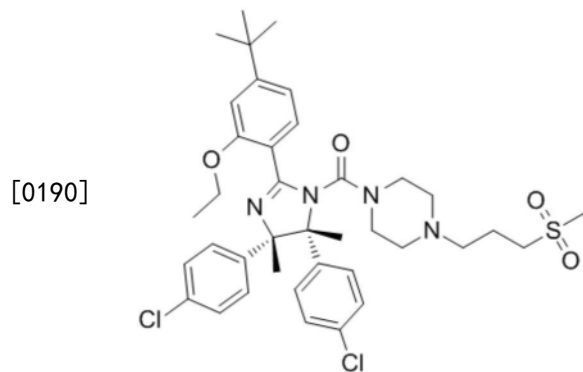
[0185] IV. (c)HDM2结合部分

[0186] 本公开的嵌合体的第二部分可以是HDM2结合部分,其是或包括与HDM2和/或HDMX结合的p53的反式激活结构域的小分子、肽或装订肽或其它化学稳定的肽(例如,缝合肽)。与HDM2结合的小分子的非限制性实例包括但不限于Nutlin-3、Nutlin-3a、Nutlin-3a衍生物如RG7112和RG7388(依达奴林)和其HDM2结合类似物。

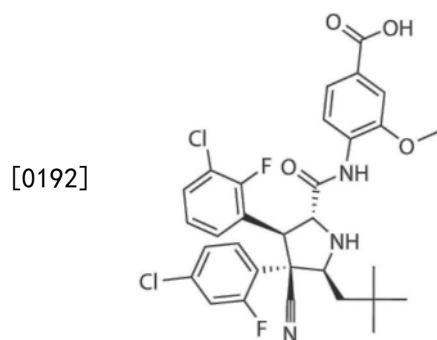
[0187] Nutlin-3a具有以下结构:



[0189] RG7112具有以下结构:



[0191] RG7388具有以下结构:



[0193] 在某些实施方式中,HDM2结合部分是本领域已知的p53肽或装订p53肽(例如,包括p53的反式激活结构域的肽(LSQETFSDLWKLLPEN(SEQ ID NO:11))、其与HDM2结合的变体或其装订版本)。在某些情况下,HDM2结合部分是稳定的或装订的p53肽,其直接与HDMX与HDM2之间的复合物结合并募集所述复合物。在一些实施方式中,装订p53肽可以与HDMX结合并募集HDMX/HDM2复合物。在某些实施方式中,装订p53肽直接或间接与HDM2或结合到HDM2的HDMX结合。

[0194] 在一些情况下,本公开的HDM2结合装订肽具有残基(R5)、(R8)、(S5)和(S8)。在此类序列(例如,SEQ ID NO.:1、7和40至47)中,“R”和“S”是指非天然氨基酸的立体化学,而“5”和“8”是指非天然氨基酸的烯属侧链中的碳残基数。因此,“(R5)”是(R)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸[也称为(R)- α -(4'-戊烯基)丙氨酸];“(R8)”是(R)-2-(7'-辛烯基)丙氨酸[也称为(R)- α -(7'-辛烯基)丙氨酸];“(S5)”是(S)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸[也称为(S)- α -(4'-戊烯基)丙氨酸];并且“(S8)”是(S)-2-(7'-辛烯基)丙氨酸[也称为(S)- α -(7'-辛烯基)丙氨酸]。在一些情况下,SEQ ID NO.:1、7和40至47可以变化,使得(R8)被(R5)替代,并且同时(S5)被(S8)替代。这种变体HDM2结合装订肽涵盖在本公开中。SEQ ID NO.:1、7和40至47的这些变体保留与HDM2结合的能力。例如,SEQ ID NO:1的变体序列是SEQ ID NO:49;并且SEQ ID NO:7的变体序列是SEQ ID NO:50。

[0195] 可以用于本公开的嵌合体的装订p53肽的非限制性实例在以下列出:

[0196] LTF(R8)EYWAQL(S5)SAA(SEQ ID NO:1)-SP645

[0197] LTF(R8)EYWAQ#(S5)SAA(SEQ ID NO:7)-ATSP-7041#是环丁基丙氨酸,

[0198] LTF(R5)EYWAQL(S8)SAA(SEQ ID NO:49)-SP645变体序列2

[0199] LTF(R5)EYWAQ#(S8)SAA(SEQ ID NO:50)-ATSP-7041变体序列

[0200] LSQETFSD(R8)WKLLPE(S5)(SEQ ID NO:40)-SAH-p53-1

[0201] LSQE(R8)FSDLWK(S5)LPEN(SEQ ID NO:41)-SAH-p53-2

[0202] LSQ(R8)TFSDLW(S5)LLPEN(SEQ ID NO:42)-SAH-p53-3

[0203] LSQETF(R8)DLWKLL(S5)EN(SEQ ID NO:43)-SAH-p53-4

[0204] LSQETF(R8)NLWKLL(S5)QN(SEQ ID NO:44)-SAH-p53-5

[0205] LSQQTF(R8)NLWRL(S5)QN(SEQ ID NO:45)-SAH-p53-6

[0206] QSQQTF(R8)NLWKLL(S5)QN(SEQ ID NO:46)-SAH-p53-7

[0207] QSQQTF(R8)NLWRL(S5)QN(SEQ ID NO:47)-SAH-p53-8

[0208] 与HDM2和/或HDMX结合并可以用于本公开的嵌合体的装订p53肽和其它肽的其它实例包括但不限于ALRN-6924,以及在以下中提供的装订肽和缝合p53肽:美国专利第10,202,431号;第9,617,309号;第9,556,227号;第9,527,896号;第9,517,252号;第9,505,804号;第9,505,801号;第9,408,885号;第9,175,045号;第9,163,330号;第8,927,500号;第8,889,632号;第8,592,377号;第8,586,707号;美国专利申请公开第US20140018302号;第US20150246946号;第20170212125号;第US20180030090号;第20190076504号;国际专利申请第W0 2008106507号;第W0 2014065760号;以及欧洲专利申请第EP2912463号;所有所述文献的内容通过引用整体并入本文。

[0209] 在一些情况下,本公开涵盖SEQ ID NO.:1、7、40至47和49至50中的任何一个的仍然与HDM2和/或HDMX结合的变体。这些变体可以在1、2、3、4、5或6个氨基酸位置处(例如,通

过用不同的氨基酸取代、插入或缺失)与SEQ ID NO.:1、7、40至47和49至50中的任何一个不同,其中变体保留其与HDM2结合的能力。在一个实例中,SEQ ID NO:1或7中的色氨酸(“W”)残基可以被3-(2-萘基)-L-丙氨酸取代。在某些实施方式中,变体与SEQ ID NO:1或7的肽的不同之处在于,其因具有1至6(例如,1、2、3、4、5、6)个氨基酸取代而与SEQ ID NO:1或7不同。例如,标记为 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 和 X_5 ”的残基可以在SEQ ID NO:1或7中如下取代: X_1 TF(R8) X_2 Y X_3 AQ X_4 (S5) X_5 AA(SEQ ID NO:48),其中 X_1 、 X_2 和 X_5 是任何氨基酸(例如,A、W、F、L、V、I、萘基丙氨酸、E、D、Y、环丁基丙氨酸和其侧链类似物); X_3 :W、F或3-(2-萘基)-L-丙氨酸;和 X_4 :L或亮氨酸模拟物(例如,环丁基丙氨酸)。

[0210] 在一些情况下,所述肽可以与SEQ ID NO:1或7中的那些氨基酸具有至少或约30%、至少或约40%、至少或约50%、至少或约60%、至少或约70%、至少或约75%、至少或约80%、至少或约85%、至少或约90%、至少或约95%、至少或约98%、至少或约99%或100%的同一性,其中所述肽与HDM2和/或HDMX结合。可替代地或另外,所述肽可以包括氨基酸取代和/或缺失,无论是否保守。例如,所述肽可以包括0、1、2、3、4、5、6、少于6、少于5、少于4、少于3或少于2个氨基酸取代、缺失和/或添加,无论保守与否,前提是所述肽仍然可以与HDM2和/或HDMX结合。因此,只要变体肽与HDM2和/或HDMX结合,本文公开的任何HDM2和/或HDMX结合肽的氨基酸序列就可以改变。

[0211] 在一些情况下,p53的反式激活结构域(LSQETFSDLWKLLEN(SEQ ID NO:11))、其与HDM2结合的变体或其稳定(例如,装订或缝合)形式可以用于本公开的嵌合体。在一些情况下,上述序列的粗体F、W和L未被取代。在一些情况下,上述序列的粗体F、W和L中的一个或多个仅通过保守取代被取代。在某些情况下,上述序列的一个或多个天冬氨酸(D)被天冬酰胺取代。在某些情况下,上述序列的一个或多个谷氨酸(E)被谷氨酰胺取代。在某些情况下,上述序列的赖氨酸被精氨酸取代。在某些情况下,上述序列的第一个亮氨酸被谷氨酰胺取代。在某些情况下,苯丙氨酸之后的丝氨酸和/或苯丙氨酸之前的苏氨酸被任何氨基酸(例如,非天然氨基酸如R8)取代。在某些情况下,赖氨酸之后的亮氨酸和/或脯氨酸被任何氨基酸(例如,非天然氨基酸如S5)取代。在某些情况下,SEQ ID NO:11的第一、第二、第三、第四和/或第五N端氨基酸可以缺失。在某些情况下,SEQ ID NO:11的C端氨基酸中的一个、两个和/或三个可以缺失。在某些情况下,SEQ ID NO:11的第一、第二、第三、第四和/或第五N端氨基酸和一个、两个和/或三个C端氨基酸可以缺失。应当理解,这些取代中的一个或多个的组合涵盖在本公开中。在某些情况下,肽或稳定肽是中性或带正电的。在所有情况下,肽或稳定肽与HDM2结合(例如,以纳摩尔亲和力)。在某些情况下,肽或装订肽的长度为8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸。

[0212] 在某些情况下,第二部分肽具有以下所列肽之一的氨基酸序列或其HDM2结合变体(可以如前一段所述进行变化),如Chong Li等人,《分子生物学杂志(J Mol Biol.)》2010年4月30日;398(2):200-213中所描述的那些:

[0213] FSDLWKLLEN(SEQ ID NO:38)-p53反式激活结构域序列;

[0214] TSFAEYWNLLSP(SEQ ID NO:39)-PMI十二肽抑制剂。

[0215] WO 2017/165617(图7)和WO 2012/065181(图1C)中公开了可以用于本文所描述的嵌合体的p53肽的其它实例,所有所述文献通过引用整体并入本文(尤其是装订和非装订p53肽的公开内容)。

[0216] 可以对装订p53肽进行修饰,以增强其结构稳定性、肽溶解度、细胞渗透性和本文公开的装订p53肽被掺入其中的嵌合体的相关降解效率。例如,可以对p53肽进行修饰,以增加 α -螺旋含量,保持对HDM2的高结合亲和力,增强细胞摄取等。p53肽中的一些残基可以被取代以实现适当的电荷。例如,可以用天冬酰胺和谷氨酰胺代替装订p53肽中的天冬氨酸和谷氨酸,以调节肽电荷,即将肽电荷从负电荷改变为中性或正电荷,以增强细胞渗透。p53肽中的某些氨基酸残基也可以突变,以避免核输出(L14Q)和/或避免潜在的泛素化(K24R)。

[0217] F19、W23和L26是与HDM2相互作用的关键人p53残基。Raj, N. 和Attardi, L.D.《冷泉港医学展望(Cold Spring Harb Perspect Med.)》2017年1月;7(1):a026047。可以用于本公开的嵌合体的装订p53肽包括与人p53的氨基酸14-29(UniProtKB-P04637)或其变体(例如,和至少必需的相互作用氨基酸F19、W23和L26)相对应的全部或部分反式激活结构域序列,并完全或部分抑制p53与HDMX、HDM2或HDMX和HDM2的结合,如在体外结合测定中测量的。与HDM2和HDMX接合的p53反式激活结构域的人野生型氨基酸序列包括:

[0218] LSQETFSDLWKLLPEN(SEQ ID NO:11)

[0219] 其对应于全长p53的氨基酸14至29。

[0220] 除了必需的相互作用的氨基酸(参见上文)之外,可以取代装订p53肽的任何或所有氨基酸,和/或可以用一个或多个保守的取代来取代一个或多个必需的相互作用的氨基酸。参见例如,Coffill等人《基因与发育(Genes Dev)》2016 30:281-292和Baek等人《美国化学会会志(JACS)》2012 13:103-6。在一些情况下,SEQ ID NO:11的第一、第二、第三、第四和/或第五N端氨基酸可以缺失。在一些情况下,SEQ ID NO:11的C端氨基酸中的一个、两个和/或三个可以缺失。在某些情况下,SEQ ID NO:11的第一、第二、第三、第四和/或第五N端氨基酸和一个、两个和/或三个C端氨基酸可以缺失。

[0221] “非必需”氨基酸残基是可以从多肽的野生型和/或全功能序列中改变的残基(而不会取消或实质上改变其活性)。“必需”氨基酸残基是当从多肽的野生型和/或全功能序列改变时,导致取消或基本取消多肽活性的残基。

[0222] 本文使用的术语“必需”氨基酸残基包括必需氨基酸的保守取代。通常,“必需”氨基酸残基位于 α 螺旋的相互作用面。

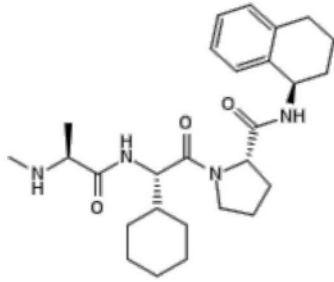
[0223] 以下讨论适合包括在本文所公开的装订p53肽中的保守取代可以包括其中一个氨基酸残基被具有类似侧链的另一氨基酸残基替代的取代。具有类似侧链的氨基酸残基的家族已在本领域中被定义。这些家族包含具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有 β 支链侧链的氨基酸(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳香族侧链的氨基酸(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。在保守氨基酸取代的一个实例中,SEQ ID NO:11中的必需氨基酸苯丙氨酸(F19)可以被丙氨酸替代。

[0224] IV. (d) XIAP结合部分

[0225] 本公开的嵌合体的第二部分可以是XIAP结合部分,所述XIAP结合部分是小分子或包括小分子。与XIAP结合的小分子的非限制性实例包括但不限于A410099.1或其XIAP结合类似物。

[0226] XIAP结合部分A410099.1具有以下结构：

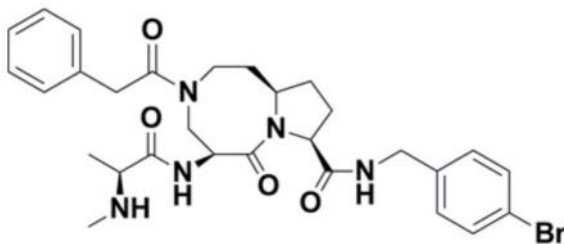
[0227]



[0228] IV. (e) COP1结合部分

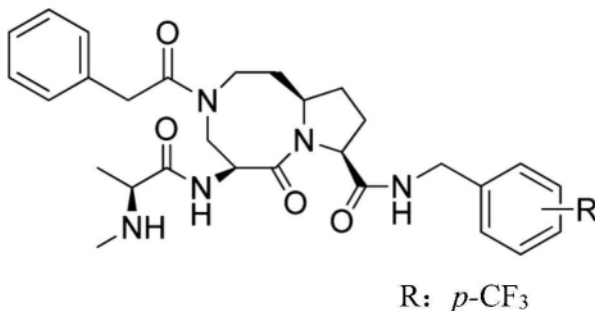
[0229] 本公开的嵌合体的第二部分可以是cIAP结合部分,所述cIAP结合部分是小分子或包括小分子。与cIAP结合的小分子的非限制性实例包括但不限于SM-1295或SM-1280或其cIAP结合类似物。cIAP结合部分SM-1295具有以下结构：

[0230]



[0231] cIAP结合部分SM-1280具有以下结构：

[0232]



[0233] IV. (f) COP1结合部分

[0234] 本公开的嵌合体的第二部分可以是COP1结合部分,所述结合部分是或包括肽或装订肽。与COP1结合的肽的非限制性实例包括但不限于具有以下序列的Tribbles假激酶1 (Trib1)肽:DQIVPEY (SEQ ID NO:6)或其变体。

[0235] 在一些情况下,所述肽可以与SEQ ID NO:6中的那些氨基酸具有至少或约30%、至少或约40%、至少或约50%、至少或约60%、至少或约70%、至少或约75%、至少或约80%、至少或约85%、至少或约90%、至少或约95%、至少或约98%、至少或约99%或100%的同一性,其中所述肽与COP1结合。可替代地或另外,所述肽可以包括氨基酸取代和/或缺失,无论是否保守。例如,所述肽可以包括0、1、2、3、4、5、少于5、少于4、少于3或少于2个氨基酸取代、缺失和/或添加,无论保守与否,前提是所述肽仍然可以与COP1结合。因此,只要变体肽与COP1结合,本文公开的任何COP1结合肽的氨基酸序列就可以改变。

[0236] IV. (g) 底物衔接子结合肽

[0237] 本公开的嵌合体的第二部分可以是与蛋白结合的肽,所述蛋白是E3泛素连接酶的底物衔接子。在一些情况下,所述肽与WD-40蛋白结合,所述蛋白是E3泛素连接酶的底物衔

接子。所述肽在浅槽中与E3泛素连接酶的底物识别结构域结合,并且在N末端或C末端都能耐受精细化(即,装订肽序列的缀合)。E3泛素连接酶的示例性底物衔接子包括HDM2和VHL。

[0238] 在某些情况下,第二部分肽基于Tribbles假激酶1(Trib1)蛋白序列:DQIVPEY(SEQ ID NO:6)或其变体。

[0239] 在某些情况下,第二部分肽基于与WD40重复蛋白结合的肽的天然结合共有序列,所述WD40重复蛋白是E3泛素连接酶的底物衔接子。在一些情况下,第二部分肽是与WD40重复蛋白结合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),所述WD40重复蛋白是E3泛素连接酶的底物衔接子。以下提供了与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:

SEQ ID NO:	E3 连接酶/降解决定子	已知实例数	基序图案†‡
14	MDM2_SWIB	5	F[[^] P]{3}W[[^] P]{2,3}[VIL]
15	ODPH_VHL_1	8	[IL]A(P).{6,8}[FLIVM].[FLIVM]

[0240] †基序图案使用以下命名法:‘.’指定任何氨基酸类型,‘[X]’指定所述位置处允许的氨基酸类型,团案开头的‘[^]X’指定序列以氨基酸类型X开头,‘[[^]X]’表示所述位置可以具有除类型X以外的任何氨基酸,数字指定为以下‘X{x,y}’,其中x和y指定所述位置所需的‘X’氨基酸类型的最小和最大数量。一级降解决定子中已知被翻译后修饰(例如磷酸化和脯氨酸羟基化)的保守残基位置以粗体示出。

[0241] V. 第二部分肽

[0242] 本文所描述的嵌合体可以包括E3泛素连接酶结合肽(例如,SEQ ID NO.:1、6、7、12、13、38至47和49至50)作为第二部分。第二部分肽可以是稳定肽或装订肽。本领域已知的任何其它肽也可以作为第二部分掺入本公开的嵌合体中。参见,例如,Mészáros等人,《科学信号传导(Sci.Signal.)》,10(470):eaak9982(2017);Guharoy等人,《自然通讯(Nature Communications)》,7:10239,doi:10.1038/ncomms10239(2016);美国专利第9,783,575号;第9,297,017号;和第9,115,184号,所述文献的全部内容通过引用整体并入本文。

[0243] 本公开的肽(即,SEQ ID NO.:1、6、7、12、13、38至47和49至50)的变体包括具有一个或多个(例如,1、2、3、4、5个)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);或其任意两种或多种的组组合的肽。选择与相关E3连接酶相互作用的变体。

[0244] 本公开的第二部分肽可以以低于1000nM的结合亲和力与其相关E3连接酶结合。在某些情况下,第二部分肽的长度为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)。

[0245] 在某些情况下,第二部分肽具有SEQ ID NO.:1、6、7、12、13、38至47和49至50中的任一个所示的肽的氨基酸序列。在一些情况下,第二部分肽具有氨基酸序列,所述氨基酸序列是SEQ ID NO.:1、6、7、12、13、38至47和49至50中的任一个的肽的变体。变体包括具有一个或多个(例如,1、2、3、4、5个)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);或其任意两种或多种的组组合的第二部分肽。

[0246] VI. 稳定肽

[0247] 本公开的嵌合体的第一和/或第二部分可以包括稳定肽(例如,装订肽)。肽螺旋是调节许多重要生物学过程(例如,凋亡)的关键蛋白质-蛋白质相互作用的重要介质;然而,

当这种螺旋从蛋白质内的上下文中取出并分离制备时,其可以展开并采用随机螺旋构象,导致生物活性的急剧降低,从而降低治疗潜力。为了避免这个问题,可以使用结构稳定的肽。在一些情况下,结构稳定的肽包括通过内部(分子内)交联(或装订)连接的至少两个经修饰的氨基酸。本文所描述的稳定肽包括装订肽、缝合肽、含有多个缝合的肽、含有多个装订的肽或含有装订和缝合的混合物的肽,以及由其它化学策略在结构上增强的肽(参见例如,Balaram P.《结构生物学新见(Cur.Opin.Struct.Biol)》1992;2:845;Kemp DS等人《美国化学学会杂志(J.Am.Chem.Soc.)》1996;118:4240;Orner BP等人《美国化学学会杂志》2001;123:5382;Chin JW等人,《国际版(Int.Ed.)》2001;40:3806;Chapman RN等人,《美国化学学会杂志》2004;126:12252;Horne WS等人,《应用化学国际版(Chem.,Int.Ed.)》2008;47:2853;Madden等人,《化学通讯(Chem Commun)》(剑桥大学)2009年10月7日;(37):5588-5590;Lau等人,《化学学会评论(Chem.Soc.Rev.)》2015,44:91-102;和Gunnoo等人,《有机与生物分子化学(Org.Biomol.Chem.)》2016,14:8002-8013;所有所述文献通过引用整体并入本文)。关于稳定肽的更多实例,参见例如WO 2019/118893,其特此通过引用整体并入本文。

[0248] 在某些实施方式中,多肽可以通过肽装订来稳定(参见例如,Walensky,《药物化学杂志(J.Med.Chem.)》,57:6275-6288(2014),所述文献内容通过引用整体并入本文)。装订肽增强了生物活性肽的天然 α -螺旋形状,赋予其稳定的结构、体内蛋白酶抗性、增强的靶结合亲和力和良好的药理学(Walensky, L.D. 和Bird, G.H.《药物化学杂志》57,6275-88(2014);Walensky, L.D. 等人《科学》305,1466-70(2004))。肽是“稳定化”的,因为其维持其天然二级结构。例如,装订允许倾向于具有 α -螺旋二级结构的多肽维持其天然 α -螺旋构象。此二级结构增加多肽对蛋白水解裂解和热的抗性,并且还可以增加靶标结合亲和力、疏水性和细胞渗透率。因此,本文所描述的装订(交联)多肽相对于对应的未装订(未交联)多肽具有提高的生物活性。

[0249] “肽装订”是一个从合成方法学中创造的术语,其中存在于多肽链中的两个含烯烃侧链(例如,可交联侧链)使用闭环复分解(RCM)反应共价连接(例如,“装订在一起”)以形成交联环(参见,例如,Blackwell等人,《有机化学杂志(J.Org.Chem.)》,66:5291-5302,2001;Angew等人,《应用化学国际版》37:3281,1994)。如本文所用,术语“肽装订”包括接合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的和含三键的侧链,使用任何数目的反应条件和/或催化剂以促进此反应,以提供单“装订”多肽。术语“多重装订”多肽是指含有超过一个个别装订,并且可以含有不同间距的两个、三个或更多个独立装订的那些多肽。另外,如本文所用,术语“肽缝合”是指提供其中举例来说两个装订与共同残基连接的“缝合”(例如,串联或多重装订)多肽的单个多肽链中的多个和串联“装订”事件。肽缝合公开于例如WO 2008/121767和WO 2010/068684中,两者都特此通过引用整体并入本文。在一些情况下,如本文所用,装订可以保持不饱和键或可以减少。

[0250] 在某些实施方式中,多肽可以通过例如烃装订来稳定。在某些情况下,装订肽包括至少两个(例如2、3、4、5、6个)氨基酸取代,其中经取代的氨基酸由两个、三个或六个氨基酸分开,并且其中经取代的氨基酸为具有烯属侧链的非天然氨基酸。有许多已知的非天然(non-natural或unnatural)氨基酸,它们中的任何一种都可以包括在装订肽中。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-环丙烷羧酸、1-氨基-2-苯

基-环丙烷羧酸、1-氨基-环丁烷羧酸、4-氨基-环戊烯羧酸、3-氨基-环己烷羧酸、4-哌啶基乙酸、4-氨基-1-甲基吡咯-2-羧酸、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/或对位取代的苯丙氨酸(例如,被 $-C(=O)C_6H_5$; $-CF_3$; $-CN$; 卤基; $-NO_2$; CH_3 取代)、二取代的苯丙氨酸、经取代的酪氨酸(例如,进一步被 $-C(=O)C_6H_5$; $-CF_3$; $-CN$; 卤基; $-NO_2$; CH_3 取代)和他汀类药物。另外,氨基酸可以衍生化为包括羟基化、磷酸化、磺化、酰化或糖基化的氨基酸残基。

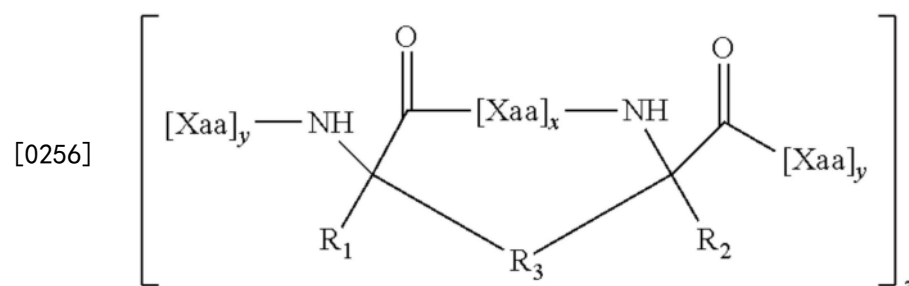
[0251] 烃装订多肽包含两个非天然氨基酸之间的一个或多个系链(键联),所述系链显著增强多肽的 α -螺旋二级结构。一般来说,系链延伸跨越一个或两个螺旋角度的长度(即,约3.4或约7个氨基酸)。因此,位于 i 和 $i+3$; i 和 $i+4$; 或 i 和 $i+7$ 的氨基酸是化学修饰和交联的理想候选物。因此,例如,其中肽具有以下序列...X1、X2、X3、X4、X5、X6、X7、X8、X9..., X1与X4之间、或X1与X5之间、或X1与X8之间的交联是所述肽的有用的烃装订形式, X2与X5、或X2与X6之间、或X2与X9之间的交联等也是如此。也可以考虑使用多个交联(例如2、3、4或更多)。使用多个交联在肽稳定化和优化方面极有效,尤其在增加的肽长度的情况下。因此,可以并入本公开的嵌合体中的肽可以在多肽序列内并入多于一个交联,以进一步稳定所述序列或促进较长多肽段的结构稳定、蛋白水解抗性、酸稳定性、热稳定性、细胞渗透性和/或生物活性增强。关于烃装订多肽的制备和使用的另外的描述可以例如在美国专利公开第2012/0172285号、第2010/0286057号和第2005/0250680号中找到,其全部内容通过引用整体并入本文。

[0252] 在某些实施方式中,当装订位于 i 和 $i+3$ 残基时,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-戊烯基丙氨酸取代这些位置的氨基酸。在某些实施方式中,当装订位于 i 和 $i+4$ 残基时,S-戊烯基丙氨酸取代那些位置的氨基酸。在某些实施方式中,当装订位于 i 和 $i+7$ 残基时,S-戊烯基丙氨酸和R-辛烯基丙氨酸取代这些位置的氨基酸。在某些情况下,当肽是缝合的时,涉及“缝合”的肽的氨基酸被双戊烯基甘氨酸、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。

[0253] 通过测试装订行走中的不同装订定位,可以改变装订或缝合位置。

[0254] 图2(顶部)示出了可以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2(中部)展示了在位置 i 与 $i+3$; i 与 $i+4$; 以及 i 与 $i+7$ 残基之间具有烃交联的肽。图2(底部)展示了沿着肽序列的装订行走。图3示出了具有双重和三重装订策略的各种肽序列,以及示例性装订行走。图4展示了使用不同长度的分支缝合部分的示例性装订行走。

[0255] 在一个方面,稳定多肽具有式(I),



[0257] 其中:

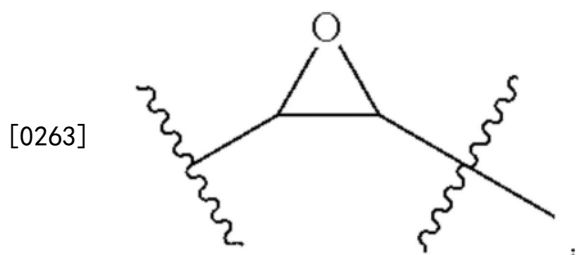
[0258] 每个 R_1 和 R_2 独立地是H或 C_1 至 C_{10} 烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基烷基、杂芳基烷基或杂环烷基;

[0259] R_3 是烷基、烯基、炔基; $[R_4-K-R_4]_n$; 其中的每个被0至6个 R_5 取代;

[0260] R_4 是烷基、烯基或炔基;

[0261] R_5 是卤基、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;

[0262] K是O、S、SO、 SO_2 、CO、 CO_2 、 $CONR_6$ 或



[0264] R_6 为H、烷基或治疗剂;

[0265] n是1至4的整数;

[0266] x是2至10的整数;

[0267] 每个y独立地是0至100的整数;

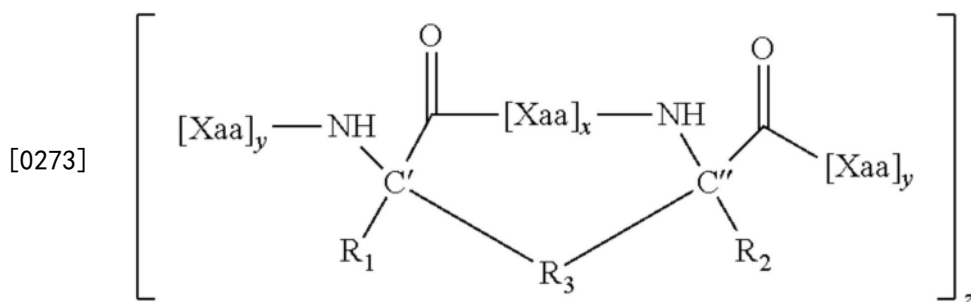
[0268] z是1至10的整数(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10);

[0269] 并且每个Xaa独立地是氨基酸。

[0270] 系链可以包括烷基、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)。拴系的氨基酸可以是 α 二取代的(例如, C_1 - C_3 或甲基)。

[0271] 在一些情况下,x是2、3或6。在一些情况下,每个y独立地是介于1与15或3与15之间的整数。在一些情况下, R_1 和 R_2 各自独立地是H或 C_1 - C_6 烷基。在一些情况下, R_1 和 R_2 各自独立地为 C_1 - C_3 烷基。在一些情况下, R_1 和 R_2 中的至少一者是甲基。例如, R_1 和 R_2 两者都可以是甲基。在一些情况下, R_3 是烷基(例如, C_8 烷基),并且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 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 。

[0272] 在另一方面,两个 α , α 二取代立体中心均为R构型或S构型(例如,i、i+4交联),或者一个立体中心为R,另一个为S(例如,i、i+7交联)。因此,将式I描绘为:



[0274] C' 和 C'' 双取代立体中心可以都是R构型,也可以都是S构型,例如当x为3时。当x为6时, C' 双取代立体中心处于R构型,并且 C'' 双取代立体中心处于S构型。 R_3 双键可以是E或Z立体化学构型。

[0275] 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。

[0276] 在一些实施方式中,本公开的特征在于内部交联(“装订”或“缝合”)肽,其中由两个、三个或六个氨基酸分开的两个氨基酸的侧链被内部装订替代;三个氨基酸的侧链被内

部缝合替代；四个氨基酸的侧链被两个内部装订替代，或者五个氨基酸的侧链被内部装订和内部缝合的组合替代。装订/缝合肽的长度可以是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。

[0277] 在某些情况下，稳定肽是与靶向降解的蛋白（例如，冠状病毒蛋白酶）结合的细胞内蛋白的肽、与E3泛素连接酶结合的肽或与E3泛素连接酶的底物衔接子（例如，WD40重复蛋白）结合的肽。

[0278] 可以并入本公开的嵌合体的装订肽的非限制性实例在以下列出：

[0279] ATVNVLAWLYAAVINGD (SEQ ID NO:2) -Mpro结合肽

[0280] ATVNVLAWLYX₁AVIX₂GD (SEQ ID NO:3) -Mpro结合肽

[0281] ANLNAGBX₁LGSX₂AATVELQ (SEQ ID NO:4) -NSP9结合肽

[0282] ANLNRGBX₁LGSX₂AATVRLQ (SEQ ID NO:5) -NSP9结合肽

[0283] 其中，B=正亮氨酸；并且X₁和X₂相同（例如，(S5)）。

[0284] LTF (R8) EYWAQ# (S5) SAA (SEQ ID NO:7) -ATSP-7041，其中#=环丁基丙氨酸

[0285] LTF (R8) EYWAQL (S5) SAA (SEQ ID NO:1) -p53 (SP645)。在某些实施方式中，装订肽包括SEQ ID NO.:1至7、12、13、38至47和49至50中的任一个的氨基酸序列或由其组成。在某些实施方式中，本公开的特征在于稳定肽，其不同于上文公开的肽，因为它们在装订/缝合的定位上不同。在某些实施方式中，本公开的特征在于稳定肽，其与上述公开的肽的不同之处在于，它们以在这些肽的 α -螺旋的非相互作用面上具有1至7（例如，1、2、3、4、5、6、7）个氨基酸取代而与以上公开的序列不同。在某些情况下，取代是保守的。在其它情况下，取代是非保守的。在某些实施方式中，本公开的特征在于稳定肽，其与上述公开的肽的不同之处在于，它们以在这些肽的 α -螺旋的相互作用面上具有1至5（例如1、2、3、4、5）个氨基酸取代而与以上公开的序列不同。在某些情况下，取代是保守的。装订肽的变体/修饰的示例性类型在图5中展示。

[0286] VII. 稳定肽中的系链

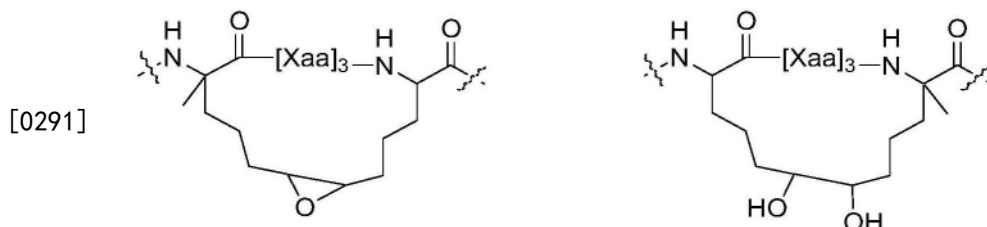
[0287] 烃系链用于本公开的稳定肽。在一些情况下，其它系链也可以用于本公开的稳定肽。例如，系链可包含醚、硫醚、酯、胺或酰胺或三唑部分中的一种或多种。在一些情况下，天然存在的氨基酸侧链可以并入到系链中。例如，系链可以与官能团，如丝氨酸中的羟基、半胱氨酸中的硫醇、赖氨酸中的伯胺、天冬氨酸酯或谷氨酸酯中的酸或天冬酰胺或谷氨酰胺中的酰胺偶合。因此，有可能使用天然存在的氨基酸来产生系链而非使用通过两个非天然存在的氨基酸偶合制得的系链。还可能使用单一非天然存在的氨基酸以及天然存在的氨基酸。可以使用含有三唑（例如，1,4三唑或1,5三唑）的交联物（参见，例如，Kawamoto等人2012《药物化学杂志(Journal of Medicinal Chemistry)》55:1137;WO 2010/060112)另外，执行不同类型的装订的其它方法在本领域是已知的并且可以被采用（参见例如，内酰胺装订(Lactam stapling):Shepherd等人，《美国化学学会杂志》127:2974-2983(2005)；UV-环加成装订(UV-cycloaddition stapling):Madden等人，《生物有机化学与医药化学通讯(Bioorg.Med.Chem.Lett.)》21:1472-1475(2011)；二硫化装订(Disulfide stapling):Jackson等人，《美国化学学会》113:9391-9392(1991)；肟装订(Oxime stapling):Haney等人，《化学通讯》，47:10915-10917(2011)；硫醚装订(Thioether stapling):Brunel and

Dawson,《化学通讯》,552-2554(2005);可光切换装订(Photoswitchable stapling): J.R.Kumita等人,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A)》,97:3803-3808(2000);双击装订(Double-click stapling):Lau等人,《化学科学(Chem.Sci.)》,5:1804-1809(2014);双内酰胺装订(Bis-lactam stapling):J.C.Phelan等人,《美国化学学会杂志》,119:455-460(1997);以及双芳基化装订(Bis-arylation stapling):A.M.Spokoyny等人,《美国化学学会杂志》,135:5946-5949(2013))。

[0288] 进一步设想,可以改变系链的长度。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,可以使用长度较短的系链,而在一些实例中,期望对二级 α -螺旋结构提供较少约束,并且因此可能需要较长的系链。

[0289] 另外,虽然从氨基酸*i*跨越到*i*+3、从*i*跨越到*i*+4和从*i*跨越到*i*+7的系链很常见,以便提供主要位于 α 螺旋的单个面上的系链,但系链可以合成以跨越许多氨基酸的任何组合,并且还可以组合使用以安装多个系链。

[0290] 在一些实例中,可以进一步操纵本文所描述的烃系链(即,交联)。在一个实例中,烃烯基系链的双键(例如,如使用钌催化的闭环复分解(RCM)合成的)可以被氧化(例如,通过环氧化、氨基羟基化或二羟基化)以提供下文化合物之一。



[0292] 环氧化物部分或游离羟基部分之一的任一个可以被进一步官能化。例如,环氧化物可以用亲核试剂处理,这提供可以例如用于附着治疗剂的另外的官能团。所述衍生化可以替代地通过合成操纵多肽的氨基或羧基端或通过氨基酸侧链实现。其它药剂可以连接到官能化系链,例如,促使多肽进入到细胞中的药剂。

[0293] 在一些实例中,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,不需要 α 二取代的氨基酸,并且还设想了使用单 α 取代基的情况(例如,在拴系的氨基酸中)。

[0294] 装订多肽可以包括药物、毒素、聚乙二醇衍生物;第二多肽;碳水化合物等。当聚合物或其它药剂与装订多肽连接时,可能希望组合物基本均匀。

[0295] 添加聚乙二醇(PEG)分子可以改善多肽的药代动力学特性和药效学特性。例如,PEG化可以降低肾清除率并且可以产生更稳定的血浆浓度。PEG是水溶性聚合物并且可以表示为与多肽连接的式:

[0296] $XO-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-Y$, 其中*n*是2至10,000,并且X是H或末端修饰,例如 C_{1-4} 烷基;并且Y是酰胺、氨基甲酸酯或脲,其与多肽的胺基(包括但不限于赖氨酸的 ϵ 胺或N端)连接。Y还可以是与硫醇基(包括但不限于半胱氨酸的硫醇基)连接的马来酰亚胺。用于直接或间接地将PEG与多肽连接的其它方法是本领域普通技术人员已知的。PEG可以是线性或支化的。包括各种官能化衍生物的各种形式的PEG可商购获得。

[0297] 可以使用在主链中具有可降解键的PEG。例如,可以用经受水解的酯键制备PEG。具有可降解PEG键的缀合物描述于WO 99/34833;WO 99/14259和美国6,348,558中。

[0298] 在某些实施方式中,大分子聚合物(例如,PEG)通过中间连接子与本文所描述的药剂附接。在某些实施方式中,连接子由通过肽键连接的1个到20个氨基酸构成,其中氨基酸选自20种天然存在的氨基酸。这些氨基酸中的一些氨基酸可以是糖基化的,如所属领域的技术人员所充分理解的。在其它实施方式中,1个到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。在其它实施方式中,连接子由大部分无空间位阻的氨基酸,如甘氨酸和丙氨酸构成。非肽连接子也是可能的。例如,可以使用烷基连接子,如-NH(CH₂)_nC(O)-,其中n=2-20。这些烷基连接体可以进一步被任何非空间阻碍基团取代,如低级烷基(例如C₁-C₆)、低级酰基、卤素(例如Cl、Br)、CN、NH₂、苯基等。美国专利第5,446,090号描述了双功能PEG连接子及其在形成在每个PEG连接子末端具有肽的缀合物中的用途。

[0299] 在一些实施方式中,稳定肽也可以被修饰,例如,以进一步促进细胞摄取或增加体内稳定性。例如,酰化或PEG化肽模拟物大环促进细胞摄取、增加生物可用性、增加血液循环、改变药物动力学、降低免疫原性和/或降低所需施用频率。

[0300] 在一些实施方式中,本文所公开的装订肽具有增强的穿透细胞膜的能力(例如,相对于未装订肽)。

[0301] 合成本文所描述的稳定肽的方法为本领域中已知的。尽管如此,可以使用以下示例性方法。应了解,各种步骤可以替代性顺序或次序进行以便得到所期望的化合物。可用于合成本文所描述的化合物的合成化学转化和保护基团方法(保护和去保护)是本领域已知的并且包括例如在如R.Larock,《综合有机转化(Comprehensive Organic Transformations)》,VCH出版社(VCH Publishers)(1989);T.W.Greene和P.G.M.Wuts,《有机合成中的保护基团(Protective Groups in Organic Synthesis)》,第3版,约翰威利父子公司(John Wiley and Sons)(1999);L.Fieser和M.Fieser,《用于有机合成的费舍尔和费舍尔氏试剂(Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis)》,约翰威利父子公司(1994);以及L.Paquette编辑,《用于有机合成的试剂百科全书(Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis)》,约翰威利父子公司(1995)以及其后续版本中描述的那些。

[0302] 稳定肽可以通过化学合成方法制备,所述化学合成方法是本领域普通技术人员熟知的。参见例如,Fields等人,《合成肽:用户指南(Synthetic Peptides:A User's Guide)》的第3章Grant,W.H.编辑纽约弗里曼公司(Freeman&Co.,New York,N.Y.),1992,第77页。因此,可以使用固相合成的自动梅里菲尔德技术(automated Merrifield technique)合成肽,其中α-NH₂由t-Boc或Fmoc化学使用侧链保护的氨基酸在例如应用生物系统肽合成器模型430A或431上进行保护。

[0303] 本文所描述的制备肽的一种方式是使用固相肽合成(SPPS)。C端氨基酸通过具有连接子分子的酸不稳定键连接到交联聚苯乙烯树脂。此树脂不溶于用于合成的溶剂中,这使得洗掉过量试剂和副产物相对简单且快速。N端用Fmoc基团保护,所述基团在酸中稳定但可通过碱去除。用碱稳定酸不稳定的基团保护任何侧链官能团。

[0304] 较长肽可以通过使用原生化学连接使各个合成肽联合来制备。可替代地,较长的合成肽可以通过公知的重组DNA技术来合成。此类技术提供于具有详细方案的公知的标准手册中。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氨基酸序列的核酸序列,优选地具有对于其中要表达的基因的生物体来说是最佳的密码子。接下来,通

常通过合成编码肽和必要时编码任何调节元件的寡核苷酸来制备合成基因。将合成基因插入到适合的克隆载体中并且转染到宿主细胞中。然后肽在适于所选表达系统和宿主的适合条件下表达。肽通过标准方法纯化并且表征。

[0305] 肽可以例如使用可从Advanced Chemtech购得的高通量多通道组合合成器以高通量组合方式制造。肽键可以被以下替代,例如以增加肽的生理稳定性:反向键(C(O)-NH);还原的酰胺键(NH-CH₂);硫亚甲基键(S-CH₂或CH₂-S);氧代亚甲基键(O-CH₂或CH₂-O);乙烯键(CH₂-CH₂);硫代酰胺键(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是H或CH₃);和氟酮亚甲基键(C(O)-CFR或CFR-C(O),其中R是H或F或CH₃)。

[0306] 多肽可以通过以下进一步修饰:乙酰化、酰胺化、生物素化、肉桂酰化、法呢基化、荧光素化、甲酰化、肉豆蔻酰化、棕榈酰化、磷酸化(Ser、Tyr或Thr)、硬脂酰化、琥珀酰化和磺酰化。如上所指示,肽可以与例如聚乙二醇(PEG);烷基(例如,C1-C20直链或支链烷基);脂肪酸自由基和其组合缀合。包括不同长度的烯属侧链的 α,α -二取代的非天然氨基酸可以通过已知方法合成(Williams等人,《美国化学会会志》,113:9276,1991;Schafmeister等人,《美国化学学会杂志》,122:5891,2000;和Bird等人,《酶学方法(Methods Enzymol.)》,446:369,2008;Bird等人,《当代化学生物学实验指南(Current Protocols in Chemical Biology)》,2011)。对于使用与i+7装订连接的i的肽(螺旋稳定的两圈):a)使用一个S5氨基酸和一个R8;或b)使用一个S8氨基酸和一个R5氨基酸。R8使用相同途径合成,不同之处在于起始手性助剂赋予R-烷基-立体异构体。而且,使用8-碘辛烯替代5-碘戊烯。抑制剂使用MBHA树脂上的固相肽合成(SPPS)在固相载体上合成(参见例如WO 2010/148335)。

[0307] Fmoc保护的 α -氨基酸(除了烯属氨基酸Fmoc-S₅-OH、Fmoc-R₈-OH、Fmoc-R₈-OH、Fmoc-S₈-OH和Fmoc-R₅-OH)、2-(6-氯-1-H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基氨基六氟磷酸盐(HCTU)和Rink Amide MBHA可从例如Novabiochem(加利福尼亚州圣地亚哥(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)和哌啶可从例如西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich)商购获得。烯属氨基酸合成在本领域中有报道(Williams等人,《有机合成(Org.Synth.)》,80:31,2003)。

[0308] 同样,本领域还已知适合于获得(例如,合成)、装订和纯化本文所公开的可结合到本公开嵌合体中的肽的方法(参见例如,Bird等人,《酶学方法》,446:369-386(2008);Bird等人,《化学生物学实验室指南》,2011;Walensky等人,《科学》,305:1466-1470(2004);Schafmeister等人,《美国化学会会志》,122:5891-5892(2000);于2010年3月18日提交的美国专利申请第12/525,123号;以及于2010年5月25日发布的美国专利第7,723,468号,以上文献中的每个文献特此通过引用整体并入)。

[0309] 在一些实施方式中,肽基本上不含未装订肽污染物或是分离的。用于纯化肽的方法包括例如在固相载体上合成肽。在环化后,固相载体可以是分离的并且悬浮于溶剂的溶液中,如DMSO、DMSO/二氯甲烷混合物或DMSO/NMP混合物。DMSO/二氯甲烷或DMSO/NMP混合物可以包括约30%、40%、50%或60% DMSO。在特定实施方式中,使用50%/50%DMSO/NMP溶液。溶液可以温育1小时、6小时、12小时或24小时的时段,随后可以将树脂例如用二氯甲烷或NMP洗涤。在一个实施方式中,树脂用NMP洗涤。可以进行振荡并将惰性气体鼓泡到溶液

中。

[0310] 例如,可以使用WO 2019/118893中所描述的方法来分析本公开的稳定(例如,装订)多肽的特性,所述文献特此通过引用整体并入。

[0311] VIII. 连接子

[0312] 对可以用于上述嵌合构建体的第一部分与第二部分之间的连接子没有具体限制。在一些实施方式中,连接子是氨基酸,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,连接子是低聚乙二醇,即, $\text{NH}_2-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_x-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ 。在一些实施方式中,连接子是肽连接子。在一些实施方式中,包括约一至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)的任意单链肽可以用作连接子。在其它实施方式中,连接子长度为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,连接子仅含有甘氨酸和/或丝氨酸残基。此类肽连接子的实例包括:Gly、Ser;Gly Ser;Gly Gly Ser;Ser Gly Gly;Gly Gly Gly Ser(SEQ ID NO:16);Ser Gly Gly Gly(SEQ ID NO:17);Gly Gly Gly Gly Ser(SEQ ID NO:18);Ser Gly Gly Gly Gly(SEQ ID NO:19);Gly Gly Gly Gly Gly Ser(SEQ ID NO:20);Ser Gly Gly Gly Gly Gly(SEQ ID NO:21);Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser(SEQ ID NO:22);Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly(SEQ ID NO:23);(Gly Gly Gly Gly Ser)_n(SEQ ID NO:24)_n,其中n是一或更大的整数;以及(Ser Gly Gly Gly Gly)_n(SEQ ID NO:25)_n,其中n是一或更大的整数。在一些情况下,连接子具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的多个拷贝(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10),不同之处在于连接子的每个拷贝中的丝氨酸残基被另一个氨基酸替代。

[0313] 在一些实施方式中,连接子是肽连接子、化学连接子、甘氨酸-丝氨酸连接子、(G4S)₃(SEQ ID NO:26)、(G4S)₅(SEQ ID NO:27)、β-丙氨酸(Z)连接子、β-丙氨酸和丙氨酸(ZA)连接子或聚乙二醇连接子。在一些实施方式中,连接子包括β-丙氨酸。在另一个实施方式中,连接子包括β-丙氨酸和丙氨酸连接子。

[0314] 在其它实施方式中,连接子肽被修饰成使得不存在氨基酸序列GSG(发生在传统Gly/Ser连接子肽重复序列的连接处)。例如,肽连接子包括选自下组的氨基酸序列:(GGGX)_nGGGS(SEQ ID NO:28)和GGGS(XGGGS)_n(SEQ ID NO:29),其中X是可插入序列中且不产生包括序列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,连接子肽的序列是(GGGX₁X₂)_nGGGS,并且X₁是P,并且X₂是S,并且n是0至4(SEQ ID NO:30)。在另一个实施方式中,连接子肽的序列是(GGGX₁X₂)_nGGGS,并且X₁是G,并且X₂是Q,并且n是0至4(SEQ ID NO:31)。在另一个实施方式中,连接子肽的序列是(GGGX₁X₂)_nGGGS,并且X₁是G,并且X₂是A,并且n是0至4(SEQ ID NO:32)。在又一个实施方式中,连接子肽的序列是GGGS(XGGGS)_n,并且X是P,并且n是0至4(SEQ ID NO:33)。在一个实施方式中,本发明的连接子肽包括氨基酸序列(GGGGA)₂GGGS(SEQ ID NO:34)或由其组成。在另一个实施方式中,连接子肽包括氨基酸序列(GGGGQ)₂GGGS(SEQ ID NO:35)或由其组成。在又一个实施方式中,连接子肽包括氨基酸序列(GGGPS)₂GGGS(SEQ ID NO:36)或由其组成。在另外的实施方式中,连接子肽包括氨基酸序列GGGS(PGGGS)₂(SEQ ID NO:37)或由其组成。

[0315] 在某些实施方式中,连接子是合成化合物连接子(化学交联剂)。市场上可获得的交联剂的实例包括N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、双琥珀酰亚胺辛二酸酯(DSS)、双(磺基琥珀酰

亚胺基)辛二酸酯(BS3)、二硫代双(琥珀酰亚胺丙酸酯)(DSP)、二硫代双(磺基琥珀酰亚胺丙酸酯)(DTSSP)、乙二醇双(琥珀酸琥珀酰亚胺酯)(EGS)、乙二醇双(磺基琥珀酰亚胺琥珀酸酯)(磺基-EGS)、酒石酸二琥珀酰亚胺基酯(DST)、酒石酸二磺基琥珀酰胺基酯(磺基-DST)、双[2-(琥珀酰亚胺氧基羰基氧基)乙基]砒(BSOCOES)和双[2-(磺基琥珀酰亚胺氧基羰基氧基)乙基]砒(磺基-BSOCOES)。

[0316] 在某些实施方式中,连接子是图7中所描绘的连接子。

[0317] IX.Mpro抑制剂肽

[0318] 本公开的特征在于具有SEQ ID NO:2或3中所示的序列的新肽,所述肽可以结合和抑制Mpro(例如,抑制Mpro二聚化和/或Mpro酶活性),由此抑制病毒(例如冠状病毒)成熟和/或复制。本公开的特征还在于变体,例如,与SEQ ID NO:2或3相差1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13个氨基酸的序列,其中所述变体抑制Mpro。在一些情况下,所述肽可以与SEQ ID NO:2或3中的那些氨基酸具有至少或约30%、至少或约40%、至少或约50%、至少或约60%、至少或约70%、至少或约75%、至少或约80%、至少或约85%、至少或约90%、至少或约95%、至少或约98%、至少或约99%或100%的同一性,其中所述肽与Mpro结合,并且抑制Mpro二聚化和/或Mpro酶活性。在一些情况下,这些肽抑制冠状病毒(例如,SARS-CoV2)活性(例如,抑制病毒成熟和复制)。

[0319] 在一些实施方式中,Mpro抑制剂肽是重组或合成产生的肽。此类肽可以是非交联的、装订的或缝合的,只要所述肽与如本文所描述的Mpro相互作用并抑制其二聚化和/或酶活性即可。在某些实施方式中,所述肽与SEQ ID NO:2或3的肽的不同之处在于,它们因具有1至5(例如,1、2、3、4、5)个氨基酸取代而与SEQ ID NO:2或3不同。在一些情况下,具有烯属侧链的非天然氨基酸(例如,S5)在SEQ ID NO:2的位置3和7处插入。在一些情况下,具有烯属侧链的非天然氨基酸(例如,S5)在SEQ ID NO:2的位置11和15处插入。在某些情况下,具有烯属侧链的非天然氨基酸(例如,S5)在SEQ ID NO:2的位置3和7以及位置11和15处插入。这些装订肽中的每个可以进一步包括1、2、3、4或5个氨基酸取代,只要这些装订肽保持其结合和抑制Mpro的能力即可。例如,标记为“X”的位置可以在SEQ ID NO:2或3中如下取代:ATXNVLXWLYXAVIXGD(SEQ ID NO:51)。X可以是保守或非保守的氨基酸残基。在一些实施方式中,“X”是非天然氨基酸,如(S)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸(S5)。在那些实施方式中,所述肽可以在位置i与i+4之间进行单重装订或双重装订。

[0320] Mpro的酶活性依赖于形成由以下 α 螺旋序列介导的同二聚体:TVNVLAWLYAAVINGD(SEQ ID NO:9)。SEQ ID NO:9可以用于产生基于肽的二聚化抑制剂。在一些情况下,Mpro抑制剂肽可以包括SEQ ID NO:9中的至少六个(例如7、8、9、10、11、12、13、14、15或16个)相邻氨基酸。在一些情况下,Mpro结合剂肽可以是SEQ ID NO:9的变体,例如,通过1、2、3、4、5或6个氨基酸取代、缺失和/或插入与SEQ ID NO:9不同,其中变体仍然可以与Mpro二聚。

[0321] 在一些实施方式中,Mpro抑制剂可以包括例如SEQ ID NO:2或3的氨基酸序列,由其组成或基本上由其组成。在一些实施方式中,所述肽可以包括与例如SEQ ID NO:2或3的氨基酸序列的一部分或多部分相关或具有同一性的氨基酸序列,由其组成或基本上由其组成。

[0322] 可替代地或另外,所述肽可以包括氨基酸取代和/或缺失,无论是否保守。例如,所述肽可以包括0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、少于10、少于5、少于4、少于3或少于2个氨基酸取代、

缺失和/或添加,无论保守与否,前提是所述肽仍然可以与Mpro结合,并且抑制剂其二聚化和/或酶活性。因此,只要变体肽与Mpro结合并且抑制Mpro,本文公开的任何Mpro抑制剂肽的氨基酸序列就可以改变。

[0323] X.NSP9抑制剂肽

[0324] 本公开的特征在于具有SEQ ID NO:4或5中所示的序列的新肽,所述肽可以结合和抑制NSP9(例如,抑制NSP9二聚化和/或NSP9酶活性),由此抑制病毒(例如冠状病毒)成熟和/或复制。在一些实施方式中,NSP9抑制剂肽是重组或合成产生的肽。此类肽可以是非交联的、装订的或缝合的,只要所述肽与如本文所描述的NSP9相互作用即可。

[0325] NSP9的酶活性依赖于形成由以下 α 螺旋序列介导的同二聚体:NLNRGMVLGSLAATVRLQ(SEQ ID NO:10)。SEQ ID NO:10可以用于产生基于肽的二聚化结合剂。在一些情况下,NSP9抑制剂肽可以包括SEQ ID NO:10中的至少六个(例如7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18个)相邻氨基酸。在一些情况下,只要变体肽仍结合并抑制NSP9,NSP9抑制剂肽就可以包括SEQ ID NO:10中的至少1、2、3、4、5、6、7、或8个相邻氨基酸取代或缺失。在一些情况下,NSP9抑制剂肽包括序列GXXXG(SEQ ID NO:8)。

[0326] 在一些实施方式中,NSP9抑制剂肽可以包括例如SEQ ID NO:4或5中的氨基酸序列,由其组成或基本上由其组成。在一些实施方式中,所述肽可以包括与例如SEQ ID NO:4或5的氨基酸序列的一部分或多部分相关或具有同一性的氨基酸序列。

[0327] 在一些情况下,所述肽可以与SEQ ID NO:4或5中的那些氨基酸具有至少或约30%、至少或约40%、至少或约50%、至少或约60%、至少或约70%、至少或约80%、至少或约85%、至少或约90%、至少或约95%、至少或约98%、至少或约99%或100%的同一性,其中所述肽与NSP9结合。可替代地或另外,所述肽可以包括氨基酸取代和/或缺失,无论是否保守。例如,氨基酸可以包括0、1、2、3、4、5、6、7、8、少于10、少于5、少于4、少于3或少于2个氨基酸取代、缺失和/或添加,无论是否保守。因此,只要变体肽仍可以结合并抑制NSP9,本文公开的任何NSP9抑制剂肽的氨基酸序列就可以改变。

[0328] 在一些情况下,SEQ ID NO:4或5的NSP9抑制剂肽或其变体可以在序列的每个末端处缩短1、2或3个氨基酸。在其它情况下,SEQ ID NO:4或5的NSP9抑制剂肽或其变体可以不包括装订,包括一个装订(例如,在S5与S5(i,i+4位置)、R8与S5(i,i+7位置)或S5与R8(i,i+7)之间形成的装订)或者是双重装订的。在某些实施方式中,所述肽与SEQ ID NO:4或5的肽的不同之处在于,它们因具有1至4(例如,1、2、3、4)个氨基酸取代而与SEQ ID NO:4或5不同。例如,标记为“X”的位置可以在SEQ ID NO:4中如下取代:ANLNAGBXLGSXAATVELQ(SEQ ID NO:52)。X可以是保守或非保守的氨基酸残基。在一些实施方式中,“X”是非天然氨基酸,如(S)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸(S5)。在那些实施方式中,所述肽可以在位置i与i+4之间进行单重装订。在一些情况下,所需的核心肽序列是GX₁X₂X₃G基序(SEQ ID NO:8),其中X₁、X₂和X₃可以是任何氨基酸。在一些情况下,X₁=M、正亮氨酸(B)、A或G;X₂=V、A、G、M或B;并且X₃=L、A、G、V或I。

[0329] XI. 治疗方法

[0330] 本文公开的嵌合体可以促进与嵌合分子结合的靶蛋白(例如,病毒蛋白,如冠状病毒蛋白酶、冠状病毒NSP;或宿主BET蛋白)的降解。在某些情况下,被本公开的嵌合体降解的蛋白质是冠状病毒PLpro蛋白。在一些情况下,冠状病毒Mpro蛋白被本公开的嵌合体降解。

在其它情况下,冠状病毒NSP9蛋白被本公开的嵌合体降解。在某些情况下,冠状病毒Mpro蛋白被本公开的嵌合体降解。在又其它情况下,宿主BRD2蛋白被本公开的嵌合体降解。在一些情况下,宿主BRD3蛋白被本公开的嵌合体降解。在又一些情况下,宿主BRD4蛋白被本公开的嵌合体降解。冠状病毒蛋白酶、冠状病毒NSP和/或宿主BET蛋白的降解可用于例如治疗冠状病毒感染、抑制冠状病毒复制、减少冠状病毒载量、治疗与冠状病毒感染或疾病(如COVID-19)相关的症状、降低病毒致病性、缩短冠状病毒清除时间,并且降低具有冠状病毒感染的受试者的临床结果的死亡率。本公开的嵌合体进一步提供了降低个体罹患冠状病毒疾病(如SARS或COVID-19)风险的方法。在一些情况下,用本公开的嵌合体治疗冠状病毒感染可减少症状,如发热或发冷、咳嗽、呼吸短促或呼吸困难、疲劳、肌肉或身体疼痛、头痛、味觉或嗅觉丧失、喉咙痛、充血或流鼻涕、恶心或呕吐以及腹泻。

[0331] 本公开的特征在于使用本文所描述的任何嵌合体来预防和/或治疗有需要的受试者(例如,人类受试者)的由RNA病毒(例如,冠状病毒如SARS-CoV2)引起的感染或疾病的方法。如本文所使用的,术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”等是指减轻、抑制或改善受试者所患的疾病或病状。例如,本公开的嵌合体可以用于治疗SARS-CoV2引起的COVID-19。本公开的特征还在于完全或部分预防疾病(例如,COVID-19)或其症状的方法。

[0332] 本公开进一步提供了治疗性地治疗在已知或疑似暴露于冠状病毒后出现冠状病毒感染临床症状的受试者(例如,人、灵长类动物、蝙蝠、鸟、小鼠、火鸡、牛、猪、猫、狗等)的冠状病毒(例如SARS-CoV-2)感染的方法。与被诊断为冠状病毒感染的个体密切接触,并出现一种或多种包括但不限于发烧(通常超过38°C)、发冷、咳嗽、呼吸短促或呼吸困难、疲劳、肌肉或身体疼痛、头痛、味觉丧失、嗅觉丧失、喉咙痛、充血或流鼻涕、恶心或呕吐、腹泻的症状的受试者被认为符合使用本公开的方法进行治疗的条件。主题方法的优点是降低了冠状病毒感染的严重程度,例如,减少了病毒载量,和/或减少了病毒清除的时间,和/或者减少了发病率或死亡率。

[0333] 本公开提供了一种用于通过向有需要的或有感染风险的受试者施用组合物来治疗或预防所述受试者的冠状病毒(例如,SARS-CoV-2)感染的方法,所述组合物包含本公开的嵌合组合物与一种或多种抗病毒或其它药剂的组合,所述药剂包括但不限于:皮质类固醇、氢化可的松、甲泼尼龙、地塞米松、瑞德西韦、IL-6抑制剂、IL-1抑制剂、激酶抑制剂、补体抑制剂、伊维菌素、羟氯喹、法匹拉韦和干扰素 β 。

[0334] 本公开提供了预防性治疗尚未感染冠状病毒和/或未表现出冠状病毒感染典型症状的个体的冠状病毒感染的方法。此类个体包括与患有COVID-19的个体接触过的个体,包括例如卫生保健人员;与患有COVID-19的个体在密闭空间内的人员(例如,商业航空公司工作人员,如乘务员和飞行员;旅行者;会议与会者等);以及与患有COVID-19的个体住在同一个家庭的人。本公开的优点是降低了个体发展为病理性冠状病毒感染的风险。

[0335] 如本文所使用的,术语“冠状病毒”包括冠状病毒科的任何成员,包括但不限于冠状病毒属的任何成员。冠状病毒属包括但不限于 α 冠状病毒株(如人类冠状病毒229E(HCoV-229E)和HCoV-NL63)、 β 冠状病毒株(如HCoV-OC43、HCoV-HKU1、中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)、严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)和SARS-CoV-2)、 γ 冠状病毒(如禽传染性支气管炎病毒和火鸡冠状病毒)和 δ 冠状病毒株(如猪冠状病毒HKU15、白眼冠状病毒HKU16、麻雀冠状病毒HKU17、鹧鸪冠状病毒HKU18、夜鹭冠状病毒HKU19、野鸭冠状病毒HKU20

和常见的黑水鸡冠状病毒HKU21)。在一些实施方式中,受试者感染了SARS-CoV-2,并且可以用本公开的嵌合体治疗。术语“冠状病毒”进一步包括天然存在的(例如,野生型)冠状病毒;天然存在的冠状病毒变体;以及实验室中产生的冠状病毒变体,所述实验室中产生的冠状病毒变体包括通过选择产生的变体、通过化学修饰产生的变体和基因修饰的变体(例如,通过重组DNA方法在实验室中修饰的冠状病毒)。

[0336] 一般而言,方法包括选择受试者并例如以药物组合物的形式或作为药物组合物向受试者施用有效量的一种或多种本公开的嵌合体,以及根据预防或治疗冠状病毒感染(例如,SARS或COVID-19)的需要选择性地重复施用,并且可以口服地、静脉内地、局部地、口腔地、直肠地、肠胃外地、腹膜内地、皮内地、皮下地、肌肉内地、经皮地、鼻内地、经肺地或气管内地施用。可以基于例如确定受试者患有或疑似患有冠状病毒感染来选择受试者进行治疗。

[0337] 针对任何特定患者的特定剂量和治疗方案将取决于各种因素,包括所采用的具体化合物的活性、年龄、体重、一般健康状况、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、病状或症状的倾向和治疗医师的判断。

[0338] 可以以一次或多次施用、施加或剂量来施用有效量。治疗有效量的治疗性化合物(即,有效剂量)取决于所选择的治疗性化合物。所述组合物可以每天一次或多次至每周一次或多次;包括每隔一天一次施用。本领域技术人员将理解,某些因素可能影响有效治疗受试者所需的剂量和时间安排,这些因素包含但不限于疾病或病症的严重性、之前的治疗、所述受试者的总体健康和/或年龄以及存在的其它疾病。此外,用治疗有效量的本文所描述的治疗性化合物治疗受试者可以包括单一治疗或系列治疗。例如,可以至少施用一次有效量。

[0339] 在一些实施方式中,预防性地使用本公开的嵌合体和治疗方法。例如,所述方法包括向被确定为易感染冠状病毒或有感染冠状病毒风险的受试者施用所述嵌合体和/或包含本文所描述的嵌合体的组合物。

[0340] 在一些实施方式中,本文所描述的嵌合体可以与一种或多种已知且适用于治疗病毒感染药物组合施用,所述药物包括选自包括以下的列表的一种或多种药剂:皮质类固醇、氢化可的松、甲泼尼龙、地塞米松、瑞德西韦、IL-6抑制剂、IL-1抑制剂、激酶抑制剂、补体抑制剂、伊维菌素、羟氯喹、法匹拉韦、干扰素 β 和艾替班特。在所述上下文中,本公开的一种或多种药剂和嵌合体可以与包含嵌合体的组合物同时或按顺序施用,即以单一调配物或以单独或一起包装的单独调配物施用。

[0341] 在一些实施方式中,本公开的嵌合体可以通过协同降解病毒复制和/或发病机理所必需的靶蛋白(如PLpro蛋白或BRD)和增加宿主细胞中的p53水平而具有双重作用,如图1和图12A-C所示出。另参见实施例4。进一步地,因为PLpro也参与逃避宿主免疫系统的病毒机制,本公开的嵌合体既可以阻断病毒复制又可以恢复免疫系统杀死受感染细胞的能力。

[0342] XII. 药物组合物

[0343] 本文所描述的任何嵌合体中的一种或多种嵌合体可以调配成用作药物组合物或用于药物组合物中。此类组合物可以被调配成或适于通过任何途径,例如经食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的任何途径施用于受试者。示例性方法描述于FDA的CDER数据标准手册,版本号004(其可从fda.give/cder/dsm/DRG/drg00301.htm获得)。例如,组合物可以调配或适于通过口服、静脉内、局部、口腔、直肠、肠胃外、腹腔内、

皮内、皮下、肌肉内、经皮、鼻内、肺或气管内途径施用。这些途径包括吸入(例如,口服和/或经鼻吸入(例如,通过喷雾器或喷雾))、注射(例如,静脉内、动脉内、真皮下、腹膜内、肌肉内和/或皮下)施用;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,经鼻)喷雾和/或溶液)。本公开的组合物可以在约0.001至约100mg/kg体重的范围内的剂量施用,或根据特定药物的要求施用。可替代地或另外,可根据食品和药物管理局批准的任何方法施用组合物,例如,如FDA数据标准手册(DSM)中所描述的(可在www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/FormsSubmissionRequirements/ElectronicSubmissions/DataStandardsManualmonographs上获得)。

[0344] 通常,本公开的药物组合物将每天施用约1至约6次,或者可替代地作为连续输注施用。这种施用可以用作慢性或急性疗法。可以与载体材料组合以产生单个剂型的活性成分的量将根据被治疗的主体和特定施用模式而变化。典型的制剂将含有约5%至约95%的活性嵌合体(w/w)。可替代地,此类制剂含有约20%至约80%的活性嵌合体。

[0345] 在一些实施方式中,本公开的嵌合体的有效剂量可以包括但不限于例如约0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10至10000;0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10至5000;0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10至2500;0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10至1000;0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10至900;0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10至800;0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10至700;0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10至600;0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10至500;0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10至400;0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10至300;0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10至200;0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10至100;0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10至90;0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10至80;0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10至70;0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10至60;0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10至50;0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10至40;0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10至30;0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10至20;0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10至30;0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1至15;0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10至30;0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1至10;0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10至30;或0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1至5mg/kg/天,例如静脉内施用。

[0346] 可能需要比上文所述的那些剂量要低或高的剂量。针对任何特定受试者的特定剂量和治疗方案将取决于多种因素,所述多种因素包括所采用的特定嵌合体的活性、年龄、体重、一般健康状况、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、受试者对疾病、病状或症状的倾向和治疗医师的判断。

[0347] 在患者病状改善后,如有必要,可以施用维持剂量的本公开的嵌合体、组合物或组合。随后,可以根据症状将施用的剂量或频率或两者降低至保留改善的病状的水平。然而,在疾病症状出现任何复发时,受试者可能需要长期的间歇性治疗。

[0348] 本公开组合物中的嵌合体可以通过添加适当的功能来修饰,以增强选择性生物特性。此类修饰是本领域中已知的并且包括增加生物渗透到给定生物区室(例如,血液、淋巴系统、中枢神经系统)中、增加口服利用度、增加溶解度以允许注射施用、改变代谢以及改变排泄速率的那些修饰。

[0349] 在一些情况下,药物组合物可以包含有效量的一种或多种嵌合体。本文中使用的术语“有效量”和“有效治疗”是指在其施用的背景内有效以引起预期的效果或生理结果(例如,冠状病毒感染治疗)的本文所描述的在一定时间段内使用(包括急性或慢性施用和定期或连续施用)的一种或多种嵌合体或药物组合物的量或浓度。本文所描述的一种或多种嵌合体或药物组合物的有效量包括促进细胞中靶蛋白(例如,冠状病毒PLpro、冠状病毒Mpro、冠状病毒NSP9、冠状病毒NSP12、宿主BRD2、宿主BRD3或宿主BRD4)水平降低和/或宿主p53水平(例如,蛋白质水平)和/或p53活性(例如,生物活性)增加的量。治疗有效量的嵌合体不需要治愈病状(例如,COVID-19),但可以为所述病状提供治疗。

[0350] 本公开的药物组合物可以包含一种或多种嵌合体和任何药学上可接受的载体和/或媒剂。在一些情况下,药物组合物可以进一步包含一种或多种另外的治疗剂,其量可以有效地实现疾病或感染(例如,COVID-19)或疾病症状的调节或改善。一种或多种治疗剂包括但不限于皮质类固醇、氢化可的松、甲泼尼龙、地塞米松、瑞德西韦、IL-6抑制剂、IL-1抑制剂、激酶抑制剂、补体抑制剂、伊维菌素、羟氯喹、法匹拉韦、干扰素 β 和艾替班特。

[0351] 术语“药学上可接受的载体”是指可与本公开的嵌合体一起施用给受试者并且不会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嵌合体的剂量施用时无毒的。

[0352] 可以在本公开的药物组合物中使用的药学上可接受的载体、佐剂和媒剂包括但不限于:离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、如d- α -生育酚聚乙二醇1000琥珀酸酯等自乳化药物递送系统(SEDDS)、如吐温(Tween)或其它类似的聚合物递送基质等用于药物剂型的表面活性剂、如人血清白蛋白等血清蛋白、如磷酸盐等缓冲物质、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、盐或电解质如硫酸鱼精蛋白、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、基于纤维素的物质、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、聚乙二醇以及羊毛脂。环糊精(如 α 环糊精、 β 环糊精和 γ 环糊精)也可以有利地用于增强本文所描述的嵌合体的递送。

[0353] 本公开的嵌合体的药学上可接受的盐包括衍生自药学上可接受的无机和有机酸和碱的盐。合适的酸盐的实例包括乙酸盐、己二酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、丁酸盐、柠檬酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、甲酸盐、富马酸盐、乙醇酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘化物、乳酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、棕榈酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、水杨酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、甲苯磺酸盐、三氟甲基磺酸盐和十一酸盐。衍生自适当碱的盐包括碱金属(例如,钠)、碱土金属(例如,镁)、铵和N-(烷基) 4^+ 盐。

[0354] 本公开的药物组合物可以包含任何常规无毒的药学上可接受的载体、佐剂或媒剂。在一些情况下,可以用药学上可接受的酸、碱或缓冲液调节调配物的pH,以增强嵌合体或其递送形式的稳定性。如本文所使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注技术。

[0355] 药物组合物可以呈用于吸入和/或经鼻施用的溶液或粉末形式。所述组合物可以根据本领域中已知的技术使用适合的分散剂或湿润剂(例如吐温80)和悬浮剂来调配。例如,此类组合物可以作为盐水溶液制备,使用苄醇或其它合适的防腐剂、增强生物利用度的

吸收促进剂、碳氟化合物和/或本领域已知的其它增溶或分散剂。

[0356] 药物组合物可以是无菌注射剂的形式,如无菌注射溶液或在无毒的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的悬浮液,例如在1,3-丁二醇中的溶液。可以采用的可接受的媒剂和溶剂有甘露醇、水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。另外,无菌不挥发性油常规地用作溶剂或悬浮介质。为此目的,可以采用包含合成的甘油单酯或甘油二酯的任何温和的不挥发性油。如油酸等脂肪酸及其甘油酯衍生物可用于制备可注射物,天然的药学上可接受的油类(如橄榄油或蓖麻油,尤其是其聚氧乙烯化的形式)也是如此。这些油溶液或悬浮液还可以含有长链醇稀释剂或分散剂,或羧甲基纤维素或通常用于调配药学上可接受的剂型,如乳液和或悬浮液的类似分散剂。其它常用的表面活性剂如吐温或司盘(Spans)和/或其它常用于制备药学上可接受的固体、液体或其它剂型的类似的乳化剂或生物利用度增强剂也可以用于制剂目的。

[0357] 药物组合物可以任何口服可接受的剂型,包括但不限于胶囊、片剂、乳液和水性悬浮液、分散液和溶液口服施用。在用于口服使用的片剂情况下,常见使用的载体包括乳糖和玉米淀粉。典型地还添加如硬脂酸镁的润滑剂。对于呈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。当口服施用水性悬浮液和/或乳剂时,活性成分可以悬浮或溶解在油相中,与乳化剂和/或悬浮剂组合。如果需要,可以添加某些甜味剂和/或调味剂和/或着色剂。

[0358] 本公开的药物组合物可以以直肠施用的栓剂形式来施用。这些组合物可以通过将本公开的嵌合体与合适的无刺激性赋形剂混合来制备,所述赋形剂在室温下呈固体但在直肠温度下呈液体,并且因此将在直肠中熔化以释放活性组分。此类材料包括但不限于例如可可脂、蜂蜡和聚乙二醇。

[0359] 当本公开的组合物包含本文所描述的嵌合体和一种或多种另外的治疗或预防剂的组合时,所述嵌合体和另外的药剂两者的剂量水平应为单一疗法方案中正常施用剂量的约1%至100%,并且更优选地约5%至95%。所述另外的药剂可以与本公开的嵌合体分开施用,例如作为多剂量方案的一部分施用。可替代地,这些药剂可以是单一剂型的一部分,与本公开的嵌合体混合在单一组合物中。

[0360] 在一些情况下,本文公开的一种或多种嵌合体可以例如与载体蛋白缀合。此类缀合的组合物可以是单价或多价的。例如,缀合的组合物可以包含本文所公开的一种与载体蛋白缀合的肽。可替代地,缀合的组合物可以包含本文所公开的两种或更多种与载体缀合的肽。

[0361] 如本文所使用的,当两个实体彼此“缀合”时,所述实体通过直接或间接共价或非共价相互作用而连接。在某些实施方式中,缔合是共价的。在其它实施方式中,缔合是非共价的。非共价相互作用包括氢键合、范德华相互作用(van der Waals interaction)、疏水性相互作用、磁相互作用、静电相互作用等。当两个实体共价连接时,任选地通过连接子基团连接时,就会发生间接共价相互作用。

[0362] 载体蛋白可以包括增加或增强受试者的免疫原性的任何蛋白质。示例性载体蛋白在本领域中进行描述(参见例如,Fattom等人,《传染与免疫(Infect. Immun.)》,58:2309-2312,1990;Devi等人,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》88:7175-7179,1991;Li等人,《传染与免疫》57:3823-3827,1989;Szu等人,《传染与免疫》59:4555-4561,

1991;Szu等人,《实验医学杂志(J.Exp.Med.)》166:1510-1524,1987;和Szu等人,《传染与免疫》62:4440-4444,1994)。聚合载体可以是包括一个或多个伯和/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。

[0363] 在一些实施方式中,本公开提供了在以下方法中使用本文公开的嵌合体中的任何一种或多种嵌合体(以下表示为‘X’)的方法:

[0364] 用作治疗本文所公开的一种或多种病状(例如,COVID-19,在以下示例中称为‘Y’)的药物的嵌合体X。嵌合体X用于制造用于治疗Y的药物的用途;以及嵌合体X用于治疗Y的用途。

[0365] 表4:序列表

SEQ ID NO:	描述	序列
1	HDM2 结合肽 SP645	LTF(R8)EYWAQL(S5)SAA
2	Mpro 结合肽	ATVNVLAWLYAAVINGD
3	Mpro 结合肽	ATVNVLAWLYX ₁ AVIX ₂ GD
4	NSP9 结合肽	ANLNAGBX ₁ LGSX ₂ AATVELQ
5	NSP9 结合肽	ANLNRGBX ₁ LGSX ₂ AATVRLQ
6	Trib1	DQIVPEY
7	ATSP-7041	LTF(R8)EYWAQ#(S5)SAA
8	NSP9 基序	GXXXG
9	Mpro α 螺旋序列	TVNVLAWLYAAVINGD
10	NSP9 α 螺旋序列	NLNRGMVLGSLAATVRLQ
11	WT 人 p53 aa 14-29	LSQETFSDLWKLLPEN
12	VHL 结合肽	LAPAAGDTIISLDF
13	VHL 结合肽	LAPYIPMDDDFQL
14	MDM2_SWIB 基序图案	F ^[P] {3}W ^[P] {2,3}[VIL]
15	ODPH_VHL_1 基序图案	[IL]A(P).{6,8}[FLIVM].[FLIVM]
16	连接子序列	GGGS
17	连接子序列	SGGG
18	连接子序列	GGGGS
19	连接子序列	SGGGG
20	连接子序列	GGGGGS
21	连接子序列	SGGGGG
22	连接子序列	GGGGGGS
23	连接子序列	SGGGGGG
24	连接子序列	(GGGGS) _n ; 其中 n=1 或更大
25	连接子序列	(SGGGG) _n ; 其中 n=1 或更大
26	连接子序列	GGGGS _n GGGGS
27	连接子序列	GGGGS _n GGGGS _n GGGGS
28	连接子序列	(GGGXX) _n GGGGS
29	连接子序列	GGGGS(XGGGS) _n
30	连接子序列	(GGGX ₁ X ₂) _n GGGGS; 其中 X ₁ 是 P, 并且 X ₂ 是 S, 并且 n 是 0 至 4
31	连接子序列	(GGGX ₁ X ₂) _n GGGGS; 其中 X ₁ 是 G, 并且 X ₂ 是 Q, 并且 n 是 0 至 4
32	连接子序列	(GGGX ₁ X ₂) _n GGGGS; 其中 X ₁ 是 G, 并且 X ₂ 是 A, 并且 n 是 0 至 4
33	连接子序列	GGGGS(XGGGS) _n ; 其中 X 是 P 并且 n 是 0 至 4
34	连接子序列	(GGGGA) ₂ GGGGS
35	连接子序列	(GGGGQ) ₂ GGGGS

[0366]

SEQ ID NO:	描述	序列
36	连接子序列	(GGGPS) ₂ GGGGS
37	连接子序列	GGGGS(PGGGS) ₂
38	p53 反式激活结构域序列	FSDLWKLL
39	PMI 十二肽抑制剂	TSFAEYWNLSP
40	SAH-p53-1	LSQETFSD(R8)WKLLPE(S5)
41	SAH-p53-2	LSQE(R8)FSDLWK(S5)LPEN
42	SAH-p53-3	LSQ(R8)TFSDLW(S5)LLPEN
43	SAH-p53-4	LSQETF(R8)DLWKLL(S5)EN
44	SAH-p53-5	LSQETF(R8)NLWKLL(S5)QN
45	SAH-p53-6	LSQQT(R8)NLWRLL(S5)QN
46	SAH-p53-7	QSQQT(R8)NLWKLL(S5)QN
47	SAH-p53-8	QSQQT(R8)NLWRLL(S5)QN
48	SP645 变体序列 1	X ₁ TF(R8)X ₂ YX ₃ AQX ₄ (S5)X ₅ AA
49	SP645 变体序列 2	LTF(R5)EYWAQL(S8)SAA
50	ATSP-7041 变体序列	LTF(R5)EYWAQ#(S8)SAA
51	Mpro 结合肽变体序列	ATXNVLXWLYXAVIXGD
52	NSP9 结合肽变体序列	ANLNAGBXLGSXAATVELQ
53	N 末端六聚组氨酸标签	HHHHHH
54	NSP9-SP645 (SP-PROTAC-NSP9-1)	ANLNAGB(S5)LGS(S5)AATVELQZA LTF(R8)EYWAQL(S5)SAA
55	SP645-NSP9 (SP-PROTAC-NSP9-2)	LTF(R8)EYWAQL(S5)SAAZ ANLNAGB(S5)LGS(S5)AATVELQ

[0368] SEQ ID NO.:14和15中的基序图案使用以下命名法: ‘.’ 指定任何氨基酸类型, ‘[X]’ 指定所述位置处允许的氨基酸类型, 图案开头的 ‘X’ 指定序列以氨基酸类型X开头, ‘[X]’ 表示所述位置可以具有除类型X以外的任何氨基酸, 数字指定为以下 ‘X{x,y}’, 其中x和y指定所述位置所需的 ‘X’ 氨基酸类型的最小和最大数量。一级降解决定子中已知被翻译后修饰 (例如磷酸化和脯氨酸羟基化) 的保守残基位置以粗体示出。在SEQ ID NO.:1、7、40至48和54至55中, (R8) 是 (R) -2- (7'- 辛烯基) 丙氨酸, 并且 (S5) 是 (S) -2- (4'- 戊烯基) 丙氨酸。在SEQ ID NO:48中, X₁、X₂和X₃是任何氨基酸 (例如, A、W、F、L、V、I、萘基丙氨酸、E、D、Y、环丁基丙氨酸和其侧链类似物); X₃:W、F或3- (2- 萘基) -L- 丙氨酸; 和X₄:L或亮氨酸模拟物 (例如, 环丁基丙氨酸)。在SEQ ID NO.:49至50中, (R5) 是 (R) -2- (4'- 戊烯基) 丙氨酸, 并且 (S8) 是 (S) -2- (7'- 辛烯基) 丙氨酸。在SEQ ID NO.:7和50中, #是环丁基丙氨酸。在SEQ ID NO.:3至5中, X₁和X₂是 (S) -2- (4'- 戊烯基) 丙氨酸。在SEQ ID NO.:4至5中, B是正亮氨酸。在SEQ ID NO.:28至29中, X是可插入序列中且不产生包括序列GSG的多肽的任何氨基酸, 并且n是0至4。在SEQ ID NO.:51至52中, X是 (S) -2- (4'- 戊烯基) 丙氨酸。在SEQ ID NO.:54至55, Z是β- 丙氨酸。

[0369] 实施例

[0370] 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所述实施例解释为限制本发明的范围。在提及特定材料的程度上, 其仅出于说明的目的, 并且并不旨在限制本发明。本领域的技术人员可以开发出等效方式或反应物, 而无需运用发明能力, 也无需脱离本发明范围。

[0371] 实施例1: 用于降解SARS-CoV-2生命周期的必需蛋白的SP-PROTAC的合成

[0372] 通过在树脂上合成装订或缝合的p53肽, 附加可变长度的连接子 (例如, β- 丙氨酸、

PEG、Gly-Ser连接子等),随后根据缩合反应的需要衍生出所选小分子,生成用于靶向SARS-CoV-2蛋白降解的装订肽蛋白水解靶向嵌合体(SP-PROTAC)。图2-5展示了方法在设计这些嵌合体的稳定(即,装订或缝合)肽部分的方面的多样性。例如,SP645是通过用6个氨基酸(i,i+7位置)侧翼的非天然氨基酸S-辛烯基丙氨酸和R-戊烯基丙氨酸替代两个氨基酸合成的(参见图6)。图7示出了SP645(SEQ ID NO:1)的结构。如先前所描述对必要的 α,α -二取代氨基酸进行合成(Walensky,L.D.等人《科学》305,1466-70(2004);Schafmeister,C.E.等人《美国化学学会杂志》122,5891-5892(2000))。固相Fmoc化学和钪催化的烯炔复分解用于肽合成和装订形成,随后使用标准偶联化学将连接子和小分子附加到树脂上。

[0373] 例如,为了掺入PLpro抑制剂GRL-0617,通过其 NH_2 基团实现化学取代。在室温下,将GRL-0617酸(11.3mg,0.0281mmol,1当量)与溶于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)合并。然后向肽中添加DIPEA(14.7微升,0.0843mmol,3当量)和HATU(10.7mg,0.0281mmol,1当量),所述肽的N末端Fmoc预先用哌啶脱保护,并且使混合物在氮气下反应20小时。通过肽脱保护和切割、LC/MS纯化和氨基酸分析定量,获得最终的SP-PROTAC。用FITC进一步衍生SP-PROTAC的C末端,用于结合分析。

[0374] SP-PROTAC的原型面板结合了靶向PLpro和Mpro的小分子,包括以下中所描述的经报道的化合物:Baez-Santos等人《病毒学杂志(J.Virol.)》,88,12511-27(2014);Ghosh,A.K.等人《药物化学杂志》,52,5228-40(2009);Baez-Santos等人《抗病毒研究》115,21-38(2015);和Zhang,L.等人《科学》,368,409-412(2020)和Gorgulla,C.等人《自然》,580,663-668(2020)。应用上文所描述的过程生成示例性SP-PROTAC,所述SP-PROTAC靶向并降解与SARS-CoV-2E蛋白和SARS-CoV-2蛋白PLpro结合的含溴结构域的蛋白(BRD2、BRD3和BRD4)(图7)。

[0375] 关键SARS-CoV-2靶标(PLpro、Mpro、NSP9和NSP12)的另外的肽和分子调节剂可以使用上文所描述的方法掺入SP-PROTAC。表5列出了SARS-CoV-2靶标、分子类型以及SP-PROTAC中所掺入的分子的名称/结构。示例性所关注的是掺入有PLpro、Mpro、NSP9抑制剂和NSP12抑制剂的SP-PROTAC。

[0376] 表5:用于掺入SP-PROTAC中的与病毒蛋白靶标接合的小分子、肽序列和核苷酸类似物的实施例

病毒靶标	分子类型	分子
PLpro	小分子	GRL-0617
Mpro	小分子	依布硒啉羧酸: 4-(3-氧代-1,2-苯并噻唑-2-基)苯甲酸
Mpro	肽(二聚化)	ATVNVFLAWLYAAVINGD (SEQ ID NO: 2)
Mpro	装订肽(二聚化)	ATVNVFLAWLYX ₁ AVIX ₂ GD (SEQ ID NO: 3; 其中 X ₁ 和 X ₂ = (S)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸
NSP9	装订肽(二聚化)	ANLNAGBX ₁ LGSX ₂ AATVELQ (SEQ ID NO: 4; 其中 B 是正亮氨酸, 并且 X ₁ 和 X ₂ = (S)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸
NSP9	装订肽(二聚化)	ANLNRGBX ₁ LGSX ₂ AATVRLQ (SEQ ID NO: 5), 其中 B 是正亮氨酸; 其中 X ₁ 和 X ₂ = (S)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸
NSP12	核苷酸类似物	瑞德西韦酸(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-氨基吡咯[2,1-f][1,2,4]三嗪-7-基)-5-氧基-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酸-L-丙氨酸
NSP12	核苷酸类似物	索非布韦羧酸(S)-2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-二氧化-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)-4-氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酸)氨基)丙氨酸

[0377] SP-PROTAC还可以靶向宿主蛋白,如溴结构域蛋白BRD2、BRD3和/或BRD4。JQ1是与BRD4结合的示例性分子。

[0379] 进一步地,下表6列出了E3泛素连接酶的实施例以及可以与这些靶标结合的配体分子的类型。表6中所列的分子可以直接附接到或通过连接子连接到表5的示例性分子,以募集降解剂(例如,E3连接酶),用于降解病毒蛋白或有助于病毒发病机理的宿主蛋白。

[0380] 表6:募集E3连接酶以用于靶降解的配体的实施例

E3 连接酶	配体分子类型	配体分子
HDM2	肽	装订 p53 肽(例如, ATSP-7041、SP645)、其 HDM2 结合变体和其类似物
Cereblon	小分子	沙利度胺和类似物, 如泊马度胺、来那度胺和阿伐度胺
VHL	小分子	VH 032 类似物
HDM2	小分子	Nutlin(例如, Nutlin-3a)和类似物如 RG7388
XIAP	小分子	A 410099.1
cIAP	小分子	SM-1295、SM-1280
COPI	肽	Trib1

[0381] 实施例2:用于测量SP-PROTAC的结合亲和力的尺寸排阻色谱法

[0382] 为了评估SP-PROTAC的结合亲和力,设计了一种基于定性尺寸排阻色谱法(SEC)的测定,以监测SP-PROTAC、HDM2与SARS-CoV-2蛋白靶之间的三元复合物的形成。将携带N末端六聚组氨酸标签(SEQ ID NO:53)和凝血酶切割位点的重组HDM2和SARS-CoV-2蛋白(例如, PLpro、Mpro)克隆到在大肠杆菌中表达并通过亲和Ni-NTA色谱法纯化的pET28a载体中,随后如所描述的进行标签切割和SEC(Ben-Nun, Y.等人《结构(Structure)》28(7): 847-857(2020); Bernal, F.等人《美国化学学会杂志》129, 2456-7(2007))。将各组分以1:1:1的比率混合,并与单独的每种蛋白质和未添加SP-PROTAC的蛋白质组合进行比较,记录SEC谱。以此方式,记录了SP-PROTAC形成所需结合复合物的能力。作为此结合亲和力SEC测定的应用的实施例,图9B示出了发现BRD4导向的SP-PROTAC诱导BRD4与HDM2之间的复合物形成(最底部的迹线),而单独的HDM2、单独的BRD4、HDM2+BRD4、HDM2+BRD4+SP645+JQ1如SEC评估

的没有诱导复合物形成。这些结果证实了SP-PROTAC在体外使所需蛋白质复合物成核的能力。

[0384] 实施例3:SP-PROTAC的细胞渗透性

[0385] 使用二合一活细胞蛋白相互作用测定(Herce,H.D.等人《自然化学(Nat Chem)》9,762-771(2017)),以同时评估SP-PROTAC进入HeLa细胞并生成所需三元复合物的能力。简言之,骆驼衍生的识别GFP的单链VHH抗体通过其层粘连蛋白融合定位于核纤层。然后在细胞中瞬时表达GFP-HDM2和作为RFP融合物的靶病毒蛋白,随后用SP-PROTAC或媒介剂处理。发现接合两个靶标的细胞渗透剂SP-PROTAC将RFP病毒蛋白集中在GFP-HDM2所锚定于的核纤层处,这引起蛋白共定位,如通过GFP/RFP覆盖中的信号所评分的。如图10A所示,SP-PROTAC-BRD4将HDM2从细胞溶质(扩散模式,顶部)重新定位到BRD4实验锚定于的核纤层(焦点模式,底部),这引起共定位(底部右侧)。这些结果证实了SP-PROTAC在细胞内(in cellulo)使所需蛋白质复合物成核的能力(图10A)。

[0386] 实施例4:使用SP-PROTAC的病毒PLpro蛋白泛素化

[0387] 为了测量SP-PROTAC形成实现病毒靶标的泛素化的三元复合物的能力,使用HDM2泛素连接酶试剂盒(波士顿生物化学(Boston Biochem))进行了体外泛素化测定,并且通过蛋白质印迹分析监测病毒蛋白质分子量的对应泛素偏移。如图10B所示,SP-PROTAC-PLpro1(10 μ M)在体外诱导HDM2介导的PLpro泛素化。这些结果表明,诱导HDM2接近可以实现病毒靶标(例如PLpro)泛素化。

[0388] 实施例5:用SP-PROTAC选择性降解与SARS-CoV-2蛋白结合的宿主蛋白

[0389] 为了测定细胞内蛋白质降解,将SJS-1细胞在37 $^{\circ}$ C的湿度控制、CO₂平衡的温育器中,在含有10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素/链霉素(Pen Strep)的DMEM(纽约格兰德艾兰的生命技术公司(Life Technologies,Grand Island,NY))培养基(CM)中传代。在处理前一天,将细胞传代并以100,000个细胞/mL的密度铺板在六孔板中。24小时后,在存在或不存在蛋白酶体抑制剂卡非佐米(Advanced ChemBlocks公司(Advanced ChemBlocks Inc),Cat ID:F-4770,400nM)的情况下,用不同浓度的SP-PROTAC-BRD4(例如,0.1至10 μ M)处理细胞2小时,之后收获并裂解细胞。然后,使用肌动蛋白(对照)、p53和BRD4抗体(用于评估蛋白质水平)和肌动蛋白抗体(用于负载对照)来用标准蛋白质印迹技术分析细胞裂解物。

[0390] 如在图11A中所见,BRD4导向的SP-PROTAC剂量响应性地增加了SJS-1细胞中的p53水平并降低了BRD4水平。在蛋白酶体抑制剂(卡非佐米)的存在下,BRD4降解受到抑制(图11B)。

[0391] 实施例6:在具有SP-PROTAC的情况下培养细胞的蛋白质景观的变化

[0392] 在天然易感的人源性Huh7细胞(Mosserl,E.C.等人《病毒学杂志》79,3846-50(2005))和表达ACE2的Calu-3细胞(Tseng,C.T.等人《病毒学杂志》79,9470-9(2005))中测试来自高含量筛选的最有效的SP-PROTAC化合物。用SP-PROTAC的系列稀释液(10 μ M起始剂量,一式三份)处理经铺板的细胞1小时,随后用SARS-CoV-2(SARS-CoV-2/人/USA/WA-CDC-WA1/2020;Genbank登录号MN985325.1)进行攻击。对培养上清液进行取样,在RNA酶抑制剂存在下裂解病毒,并按照所描述进行逆转录(RT)和定量聚合酶链反应(qPCR)(Suzuki,Y.等人《可视化实验杂志(J Vis Exp)》(2018))。CDC验证的BHQ淬灭染料对引物购自IDT,并根据Ct值计算基因组当量。

[0393] 表现出最强抗病毒活性的SP-PROTAC用于处理Huh7和Calu-3细胞(>50%传染性),随后监测蛋白质水平的动态变化。在含有10% SDS的缓冲液中经一定时间(例如2、4、6、8小时)裂解经处理的细胞,并对裂解物进行p53、SARS-CoV-2靶标(PLpro、Mpro)和肌动蛋白对照的western分析。来自经处理的细胞的表现出机制上p53诱导和靶蛋白特异性降解(例如,PLpro、Mpro、BRD4)的裂解物还进行如所描述的全局蛋白质组分析(Winter, G.E. 等人《科学》348, 1376-81 (2015))。以此方式,针对BRD4导向的SP-PROTAC,检查了SP-PROTAC在细胞蛋白质景观中的作用特异性(图12A-C)。与对照(单独的装订肽SP645(图12A)和单独的未连接小分子JQ1(图12B))相比,发现SP-PROTAC-BRD4(图12C)既降低BRD 2/3/4蛋白水平,又诱导p53转录靶标,如HDM2。这些结果表明,最佳的抗病毒活性来源于p53诱导和靶蛋白降解的协同SP-PROTAC机制。

[0394] 实施例7:在具有SP-PROTAC的情况下培养细胞的提高的机制上细胞毒性

[0395] 使用 CellTiter-Glo® 发光细胞活力测定(威斯康星州麦迪逊市的普洛麦格公司(Promega, Madison, WI))按照制造商的方案进行细胞毒性测定。用SP645、JQ1或SP-PROTAC-BRD4以指定浓度处理SJS-1细胞72小时。进行技术性三次体外分析,用化合物、蛋白质或细胞的独立制剂重复至少两次,并使用单向方差分析进行分析。双尾p值<0.05被认为是显著的。

[0396] 如在图13A中所见,与单独的SP645和JQ1相比,SP-PROTAC-BRD4显著提高了SJS-1细胞的机制上细胞毒性(活力百分比降低)。

[0397] 实施例8:在具有SP-PROTAC的情况下培养细胞的病毒感染的阻断

[0398] 基于先前针对埃博拉病毒的筛选,已经为SARS-CoV-2开发了高通量病毒检测平台(Anantpadma, M. 等人《抗菌剂和化学疗法(Antimicrob Agents Chemother)》60, 4471-81 (2016))。用SP-PROTAC系列稀释液(50μM起始剂量)处理以384孔形式铺板的Vero E6细胞1小时,一式三份进行,随后用SARS-CoV-2(SARS-CoV-2/人/USA/WA-CDC-WA1/2020; Genbank 登录号MN985325.1)攻击4小时,以实现10%至20%细胞的对照感染(评估测试化合物的动态范围的最佳传染性)。然后洗涤受感染细胞,用4%多聚甲醛固定,在PBS中重新洗涤,用抗SARS-CoV-2核衣壳单克隆抗体(马塞诸塞州沃尔瑟姆的赛默飞世尔科技公司(ThermoFisher Sci, Waltham, MA))免疫染色,随后用抗小鼠Ig二级抗体(Alexa Fluor 488; 生命科技公司)免疫染色,并且用HCS CellMask蓝复染细胞体。在尼康Ti Eclipse自动显微镜上跨z平面对细胞进行成像,通过CellProfiler软件分析,并通过将受感染细胞除以总细胞来计算感染效率。图13B示出了发现25μM和50μM的SP-PROTAC-PLpro1可阻断Vero E6细胞的SARS-CoV-2感染。

[0399] 实施例9:SP-PROTAC的α-螺旋度的测量

[0400] 为了确保小分子衍生化不会影响作为SP-PROTAC的组分(例如,SP645、ATSP-7041等)的装订肽的结构,通过圆二色性(CD)在溶液中测量SP-PROTAC的螺旋度(Bird, G.H. 等人《酶学方法》446, 369-86 (2008))。在Aviv Biomedical光谱仪(型号410)上记录CD光谱,其中化合物在50μM磷酸钾(pH 7.5)或Milli-Q去离子水中重构。对190至260nm的五次扫描进行平均以获得每个光谱,所述光谱被绘制为波长对平均残基椭圆率,并且如所描述的计算螺旋度%(Forood, B. 等人《美国国家科学院院刊》90, 838-42 (1993))。作为上述方法的实施例,通过四种HDM2结合装订p53肽装订肽(SAH-p53-1至-4; SEQ ID NO.: 40至43)的圆二色性

来评估SP-PROTAC的螺旋度,如在Bernal F.等人,《美国化学学会杂志》129(9):2456-2457(2007)所示。图8A(与Bernal F.等人的图1C相同)示出了SAH-p53-4(SEQ ID NO:43)比SAH-p53-1-3(SEQ ID NO.:40至42)或野生型p53肽(SEQ ID NO:11)更稳定。

[0401] 实施例10:SP-PROTAC的蛋白水解稳定性的测量

[0402] 装订肽的关键特征是其体内抵抗蛋白水解的能力,这是由于装订本身屏蔽不稳定的酰胺键并诱导螺旋折叠引起的。为了确定蛋白水解稳定性,通过所描述的液相色谱-质谱(LC-MS)(Agilent 1200)进行比较蛋白水解分析(Bird,G.H.等人《美国化学生物学会》,15,6,1340-1348(2020)),以鉴定细胞和体内研究中最耐蛋白酶的化合物。反应样品由含5 μ l含SP-PROTAC的DMSO(1mM原液)和由50mM Tris HCl组成的pH 7.4的195 μ l缓冲液构成。注射零时间样品后,添加2.5 μ l 100ng/ μ l蛋白酶K(新英格兰生物实验室(New England Biolabs)),并随时间的推移通过连续注射对完整化合物的量进行定量。均方位移(MSD)面积与时间的绘图产生指数衰减曲线,并且使用Prism软件(GraphPad)通过非线性回归分析确定半衰期。Bird G.H.等人,《美国国家科学院院刊》2010年8月10日107(32)14093-14098中示出了此蛋白水解稳定性评估的应用实例。图9A(源自Bird G.H.等人)示出了与未装订的恩夫韦地相比,发现单重装订和双重装订的抗HIV治疗性恩夫韦地具有显著的蛋白酶抗性。恩夫韦地的稳定性随着装订数量的增加而成比例增加。

[0403] 实施例11:用于测量SP-PROTAC的结合亲和力的尺寸排阻色谱法

[0404] 为了评估SP-PROTAC的每个组分的相对结合亲和力,进行荧光偏振(FP)结合分析,其中在结合缓冲液(50mM NaCl、20mM HEPES pH 7.4、5mM DTT)中温育C末端FITC衍生的SP-PROTAC(例如25nM)与单独每种蛋白的系列稀释液(例如HDM2、PLpro)。FP在Spectramax M5微孔板读取器(Molecular Devices)上平衡时测量,并使用Prism软件(Graphpad)绘制数据并计算Kd值。在Bernal F.等人,《美国化学学会会志》129(9):2456-2457(2007)中示出此FP分析的应用实例。图8B(与Bernal F.等人中的图1D相同)示出了各种装订p53肽(SEQ ID NO.:40至43)与HDM2的相对结合亲和力。发现与SAH-p53-1-3或野生型p53肽相比,SAH-p53-4以更高的亲和力与HDM2结合。

[0405] 实施例12:SARS-CoV-2感染的人源化ACE2受体小鼠模型中范例SP-PROTAC的抗病毒活性

[0406] 在气道上皮中表达人ACE2受体(McCray,P.B.,Jr.等人《病毒学杂志》,81,813-21(2007);Yan,R.等人《科学》(2020))并感染了SARS-CoV-2病毒(Netland,J.等人《病毒学杂志》,82,7264-75(2008);Tseng,C.T.等人《病毒学杂志》81,1162-73(2007))的转基因小鼠中进行SP-PROTAC的体内功效测试。使用为评估抗埃博拉病毒治疗剂而开发的方法进行实验(Pascal,K.E.等人《感染性疾病杂志(J Infect Dis)》218,S612-s626(2018);Sakurai,Y.等人《科学》347,995-8(2015))。SP-PROTAC首先进行耐受性测试。对于3次处理中的每一次,由10只(5只雄性,5只雌性)小鼠构成的各组中的20只小鼠每天腹腔给药高剂量或低剂量SP-PROTAC两次,持续10天。另一组10只小鼠只接受盐水作为对照。在每次给药前检查动物,并且如果观察到不良反应,则停止处理。如果给药10天后,高剂量不耐受,则使用较低剂量。在hACE2小鼠疾病模型中测试耐受的SP-PROTAC的功效。在第1天以 10^4 PFU的病毒剂量对K18-hACE2小鼠(JAX;n=20只/组,10只雄性,10只雌性)进行鼻腔内接种,随后每天用SP-PROTAC(剂量和频率基于耐受性和PK结果)进行腹腔内处理,持续10天(第2至12天)。一组接

收媒剂作为控制。持续监测小鼠以记录体重和临床体征。在第4天(病毒血症高峰),对来自每组的4只小鼠进行安乐死,并通过qPCR从肺匀浆上清液中定量病毒载量,所述肺匀浆上清液使用组织分析仪(凯杰公司(Qiagen))如所描述的进行制备(Bao, L. 等人《自然》583, 830-833 (2020)。对最有效处理的剂量进行优化,以确定保护小鼠的最低剂量。使用相同的实验设计,但3个组以4倍的增量接受较低剂量的处理。每个实验都将性别作为一个生物变量,其中雄性和雌性小鼠的数量相等。

[0407] 对于体内耐受性,使用10只小鼠/剂量/化合物和10只盐水对照小鼠,在第10天(或对于不良体征,则为更早的时间)对小鼠进行安乐死,并检查毒性。这些研究有80%的把握度检测毒性增加(60%对比10%), $p=0.10$ 。对于体内功效,疾病进展被定义为体重减轻 $>10\%$ 、呼吸困难或无法茁壮成长,并将用SP-PROTAC与媒剂处理的动物进行比较。每组16只动物(加上4只在第4天进行评估的小鼠)将使得有81%的把握度来检测70%的经处理的小鼠对比22%的无进展对照小鼠, $p=0.05$ 。使用Kaplan和Meier方法评估进展时间,并使用对数秩检验来检验差异。

[0408] 实施例13:使用SP-PROTAC的病毒NSP9蛋白泛素化

[0409] 为了测量可替代地设计的SP-PROTAC与另一SARS-CoV-2病毒蛋白形成三元复合物的能力,产生了SP-PROTAC,其包括(1)位于N末端并与SP-645(SEQ ID NO:1)连接的i、i+4单重装订NSP9结合肽(SEQ ID NO:4),命名为SP-PROTAC-NSP9-1(SEQ ID NO:54),或者(2)位于N末端并连接至i、i+4单重装订NSP9结合肽(SEQ ID NO:4)的SP-645(SEQ ID NO:1),命名为SP-PROTAC-NSP9-2(SEQ ID NO:55;图14A)。在这两种情况下,SP-PROTAC成功地使重组HDM2、SP-PROTAC-NSP9与重组NSP9之间的三元复合物成核,以实现病毒靶蛋白NSP9的HDM2泛素化。使用HDM2泛素连接酶试剂盒(波士顿生物化学)进行体外泛素化测定,并通过蛋白质印迹分析监测病毒蛋白质分子量的对应泛素偏移。如图14B所示,SP-PROTAC-NSP9-1和-2($10\mu\text{M}$)在体外诱导HDM2介导的NSP9泛素化。这些结果表明,诱导HDM2接近可以实现靶向病毒蛋白(例如NSP9)泛素化降解。

[0410] 其它实施方式

[0411] 虽然已经结合本发明的详细描述描述了本发明,但是前面的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书的范围限定。其它方面、优点和修改都在以下权利要求的范围内。

序列表

<110> 丹娜法伯癌症研究院 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.)

<120> 用于降解病毒和宿主蛋白的嵌合缀合物和使用方法

<130> 00530-0409W01

<140>

<141>

<150> 63/091,769

<151> 2020-10-14

<160> 55

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4) .. (4)

<223> (R)-2-(7'-辛烯基)丙氨酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11) .. (11)

<223> (S)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸

<400> 1

Leu Thr Phe Xaa Glu Tyr Trp Ala Gln Leu Xaa Ser Ala Ala

1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 2

Ala Thr Val Asn Val Leu Ala Trp Leu Tyr Ala Ala Val Ile Asn Gly

1 5 10 15

Asp

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11) .. (11)

<223> (S)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15) .. (15)

<223> (S)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸

<400> 3

Ala Thr Val Asn Val Leu Ala Trp Leu Tyr Xaa Ala Val Ile Xaa Gly

1

5

10

15

Asp

<210> 4

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7) .. (7)

<223> 正亮氨酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8) .. (8)

<223> (S)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12) .. (12)

<223> (S)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸

<400> 4
Ala Asn Leu Asn Ala Gly Xaa Xaa Leu Gly Ser Xaa Ala Ala Thr Val
1 5 10 15
Glu Leu Gln
<210> 5
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (7) .. (7)
<223> 正亮氨酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (8) .. (8)
<223> (S)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (12) .. (12)
<223> (S)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸
<400> 5
Ala Asn Leu Asn Arg Gly Xaa Xaa Leu Gly Ser Xaa Ala Ala Thr Val
1 5 10 15
Arg Leu Gln
<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 6
Asp Gln Ile Val Pro Glu Tyr
1 5
<210> 7
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

- <221> source
 <223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) .. (4)
 <223> (R) -2- (7'-辛烯基) 丙氨酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10) .. (10)
 <223> 环丁基丙氨酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11) .. (11)
 <223> (S) -2- (4'-戊烯基) 丙氨酸
 <400> 7
 Leu Thr Phe Xaa Glu Tyr Trp Ala Gln Xaa Xaa Ser Ala Ala
 1 5 10
 <210> 8
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2) .. (4)
 <223> 任何氨基酸
 <220>
 <221> source
 <223> /注释="关于取代和优选实施例的详细描述,请参见所提交的说明书"
 <400> 8
 Gly Xaa Xaa Xaa Gly
 1 5
 <210> 9
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 严重急性呼吸综合征冠状病毒2
 <400> 9

Thr Val Asn Val Leu Ala Trp Leu Tyr Ala Ala Val Ile Asn Gly Asp
 1 5 10 15
 <210> 10
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 严重急性呼吸综合征冠状病毒2
 <400> 10
 Asn Leu Asn Arg Gly Met Val Leu Gly Ser Leu Ala Ala Thr Val Arg
 1 5 10 15
 Leu Gln
 <210> 11
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 11
 Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn
 1 5 10 15
 <210> 12
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <221> source
 <223> /注释="未知的描述:E3连接酶肽"
 <400> 12
 Leu Ala Pro Ala Ala Gly Asp Thr Ile Ile Ser Leu Asp Phe
 1 5 10
 <210> 13
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <221> source
 <223> /注释="未知的描述:E3连接酶肽"
 <400> 13
 Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Met Asp Asp Asp Phe Gln Leu
 1 5 10
 <210> 14
 <211> 9

- <212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2) .. (2)
<223> 除Pro外的任何氨基酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3) .. (3)
<223> 除Pro外的任何氨基酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4) .. (4)
<223> 除Pro外的任何氨基酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6) .. (6)
<223> 除Pro外的任何氨基酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (7) .. (7)
<223> 除Pro外的任何氨基酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (8) .. (8)
<223> 除Pro外的任何氨基酸
<220>
<221> SITE
<222> (6) .. (8)
<223> /注释=“此区可以涵盖2至3个残基”
<220>
<221> VARIANT
<222> (9) .. (9)
<223> /替代=“Ile”或“Leu”
<220>
<221> SITE

<222> (1) .. (9)
 <223> /注释=“序列中给出的变体残基相对于变体位置的注释中的那些残基没有偏好”
 <400> 14
 Phe Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Val
 1 5
 <210> 15
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> source
 <223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (1) .. (1)
 <223> /替代=“Leu”
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) .. (4)
 <223> 任何氨基酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5) .. (5)
 <223> 任何氨基酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6) .. (6)
 <223> 任何氨基酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7) .. (7)
 <223> 任何氨基酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8) .. (8)
 <223> 任何氨基酸
 <220>
 <221> MOD_RES

<221> source
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 16
Gly Gly Gly Ser
1
<210> 17
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 17
Ser Gly Gly Gly
1
<210> 18
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 18
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 19
Ser Gly Gly Gly Gly
1 5
<210> 20
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<400> 20
Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 21
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<400> 21
Ser Gly Gly Gly Gly Gly
1 5
<210> 22
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<400> 22
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<400> 23
Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5
<210> 24
<211> 5
<212> PRT

<213> 人工序列
 <220>
 <221> source
 <223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
 <220>
 <221> source
 <223> /注释=“关于取代和优选实施例的详细描述,请参见所提交的说明书”
 <400> 24
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 25
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> source
 <223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
 <220>
 <221> source
 <223> /注释=“关于取代和优选实施例的详细描述,请参见所提交的说明书”
 <400> 25
 Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5
 <210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> source
 <223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
 <400> 26
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 27
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> source

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
 <400> 27
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25
 <210> 28
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) .. (5)
 <223> 任何氨基酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9) .. (10)
 <223> 任何氨基酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14) .. (15)
 <223> 任何氨基酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (19) .. (20)
 <223> 任何氨基酸
 <220>
 <221> SITE
 <222> (1) .. (20)
 <223> /注释="此区可以涵盖0至4个'Gly Gly Gly Xaa Xaa'重复单元"
 <220>
 <221> source
 <223> /注释="关于取代和优选实施例的详细描述,请参见所提交的说明书"
 <400> 28
 Gly Gly Gly Xaa Xaa Gly Gly Gly Xaa Xaa Gly Gly Gly Xaa Xaa Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Xaa Xaa Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25

<210> 29
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> source
 <223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6) .. (6)
 <223> 任何氨基酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11) .. (11)
 <223> 任何氨基酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16) .. (16)
 <223> 任何氨基酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (21) .. (21)
 <223> 任何氨基酸
 <220>
 <221> SITE
 <222> (6) .. (25)
 <223> /注释=“此区可以涵盖0至4个'Xaa Gly Gly Gly Ser'重复单元”
 <220>
 <221> source
 <223> /注释=“关于取代和优选实施例的详细描述,请参见所提交的说明书”
 <400> 29

Gly Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser
 20 25

<210> 30
 <211> 25

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<220>
<221> SITE
<222> (1) .. (20)
<223> /注释=“此区可以涵盖0至4个'Gly Gly Gly Pro Ser'重复单元”
<400> 30
Gly Gly Gly Pro Ser Gly Gly Gly Pro Ser Gly Gly Gly Pro Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Pro Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25

<210> 31
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<220>
<221> SITE
<222> (1) .. (20)
<223> /注释=“此区可以涵盖0至4个'Gly Gly Gly Gly Gln'重复单元”
<400> 31
Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25

<210> 32
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<220>
<221> SITE

<222> (1) .. (20)
 <223> /注释="此区可以涵盖0至4个'Gly Gly Gly Gly Ala'重复单元"
 <400> 32
 Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ala Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25
 <210> 33
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
 <220>
 <221> SITE
 <222> (6) .. (25)
 <223> /注释="此区可以涵盖0至4个'Pro Gly Gly Gly Ser'重复单元"
 <400> 33
 Gly Gly Gly Gly Ser Pro Gly Gly Gly Ser Pro Gly Gly Gly Ser Pro
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Pro Gly Gly Gly Ser
 20 25
 <210> 34
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
 <400> 34
 Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 35
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> source

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
 <400> 35
 Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 36
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
 <400> 36
 Gly Gly Gly Pro Ser Gly Gly Gly Pro Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
 <400> 37
 Gly Gly Gly Gly Ser Pro Gly Gly Gly Ser Pro Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 38
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 38
 Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu
 1 5
 <210> 39
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
 <400> 39

Thr Ser Phe Ala Glu Tyr Trp Asn Leu Leu Ser Pro

1 5 10

<210> 40

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9) .. (9)

<223> (R) -2- (7'-辛烯基) 丙氨酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16) .. (16)

<223> (S) -2- (4'-戊烯基) 丙氨酸

<400> 40

Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Xaa Trp Lys Leu Leu Pro Glu Xaa

1 5 10 15

<210> 41

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5) .. (5)

<223> (R) -2- (7'-辛烯基) 丙氨酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12) .. (12)

<223> (S) -2- (4'-戊烯基) 丙氨酸

<400> 41

Leu Ser Gln Glu Xaa Phe Ser Asp Leu Trp Lys Xaa Leu Pro Glu Asn

1 5 10 15

<210> 42

<211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) .. (4)
 <223> (R) -2- (7'-辛烯基) 丙氨酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11) .. (11)
 <223> (S) -2- (4'-戊烯基) 丙氨酸
 <400> 42
 Leu Ser Gln Xaa Thr Phe Ser Asp Leu Trp Xaa Leu Leu Pro Glu Asn
 1 5 10 15
 <210> 43
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7) .. (7)
 <223> (R) -2- (7'-辛烯基) 丙氨酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14) .. (14)
 <223> (S) -2- (4'-戊烯基) 丙氨酸
 <400> 43
 Leu Ser Gln Glu Thr Phe Xaa Asp Leu Trp Lys Leu Leu Xaa Glu Asn
 1 5 10 15
 <210> 44
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7) .. (7)
 <223> (R) -2- (7'-辛烯基) 丙氨酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14) .. (14)
 <223> (S) -2- (4'-戊烯基) 丙氨酸
 <400> 44
 Leu Ser Gln Glu Thr Phe Xaa Asn Leu Trp Lys Leu Leu Xaa Gln Asn
 1 5 10 15
 <210> 45
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7) .. (7)
 <223> (R) -2- (7'-辛烯基) 丙氨酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14) .. (14)
 <223> (S) -2- (4'-戊烯基) 丙氨酸
 <400> 45
 Leu Ser Gln Gln Thr Phe Xaa Asn Leu Trp Arg Leu Leu Xaa Gln Asn
 1 5 10 15
 <210> 46
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7) .. (7)
<223> (R) -2- (7'-辛烯基) 丙氨酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14) .. (14)
<223> (S) -2- (4'-戊烯基) 丙氨酸
<400> 46
Gln Ser Gln Gln Thr Phe Xaa Asn Leu Trp Lys Leu Leu Xaa Gln Asn
1           5               10             15
<210> 47
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (7) .. (7)
<223> (R) -2- (7'-辛烯基) 丙氨酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14) .. (14)
<223> (S) -2- (4'-戊烯基) 丙氨酸
<400> 47
Gln Ser Gln Gln Thr Phe Xaa Asn Leu Trp Arg Leu Leu Xaa Gln Asn
1           5               10             15
<210> 48
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) .. (1)

```


<213> 人工序列
 <220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) .. (4)
 <223> (R) -2- (4'-戊烯基) 丙氨酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11) .. (11)
 <223> (S) -2- (7'-辛烯基) 丙氨酸
 <400> 49
 Leu Thr Phe Xaa Glu Tyr Trp Ala Gln Leu Xaa Ser Ala Ala
 1 5 10
 <210> 50
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) .. (4)
 <223> (R) -2- (4'-戊烯基) 丙氨酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10) .. (10)
 <223> 环丁基丙氨酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11) .. (11)
 <223> (S) -2- (7'-辛烯基) 丙氨酸
 <400> 50
 Leu Thr Phe Xaa Glu Tyr Trp Ala Gln Xaa Xaa Ser Ala Ala
 1 5 10
 <210> 51
 <211> 17

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3) .. (3)
<223> (S)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (7) .. (7)
<223> (S)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (11) .. (11)
<223> (S)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (15) .. (15)
<223> (S)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸
<220>
<221> source
<223> /注释=“关于取代和优选实施例的详细描述,请参见所提交的说明书”
<400> 51
Ala Thr Xaa Asn Val Leu Xaa Trp Leu Tyr Xaa Ala Val Ile Xaa Gly
1 5 10 15
Asp
<210> 52
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<220>
<221> MOD_RES
<222> (7) .. (7)
<223> 正亮氨酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8) .. (8)
 <223> (S) -2- (4'-戊烯基) 丙氨酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12) .. (12)
 <223> (S) -2- (4'-戊烯基) 丙氨酸
 <220>
 <221> source
 <223> /注释="关于取代和优选实施例的详细描述,请参见所提交的说明书"
 <400> 52
 Ala Asn Leu Asn Ala Gly Xaa Xaa Leu Gly Ser Xaa Ala Ala Thr Val
 1 5 10 15
 Glu Leu Gln
 <210> 53
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的描述:合成6xHis标签"
 <400> 53
 His His His His His His
 1 5
 <210> 54
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7) .. (7)
 <223> 正亮氨酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8) .. (8)

<223> (S)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12) .. (12)

<223> (S)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20) .. (20)

<223> β -丙氨酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25) .. (25)

<223> (R)-2-(7'-辛烯基)丙氨酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (32) .. (32)

<223> (S)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸

<400> 54

Ala Asn Leu Asn Ala Gly Xaa Xaa Leu Gly Ser Xaa Ala Ala Thr Val

1 5 10 15

Glu Leu Gln Xaa Ala Leu Thr Phe Xaa Glu Tyr Trp Ala Gln Leu Xaa

 20 25 30

Ser Ala Ala

35

<210> 55

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4) .. (4)

<223> (R)-2-(7'-辛烯基)丙氨酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11) .. (11)

<223> (S)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15) .. (15)

<223> β-丙氨酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22) .. (22)

<223> 正亮氨酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23) .. (23)

<223> (S)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (27) .. (27)

<223> (S)-2-(4'-戊烯基)丙氨酸

<400> 55

Leu Thr Phe Xaa Glu Tyr Trp Ala Gln Leu Xaa Ser Ala Ala Xaa Ala

1 5 10 15

Asn Leu Asn Ala Gly Xaa Xaa Leu Gly Ser Xaa Ala Ala Thr Val Glu

 20 25 30

Leu Gln

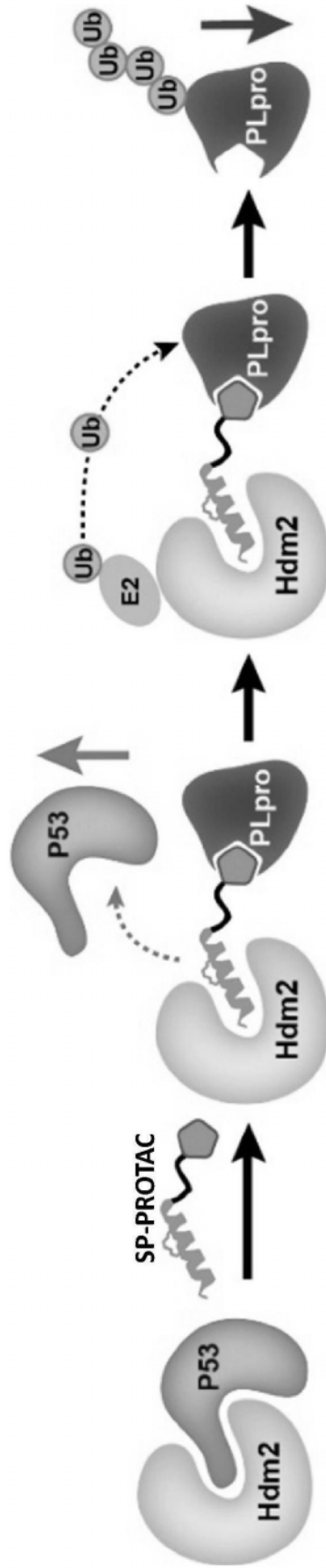


图1

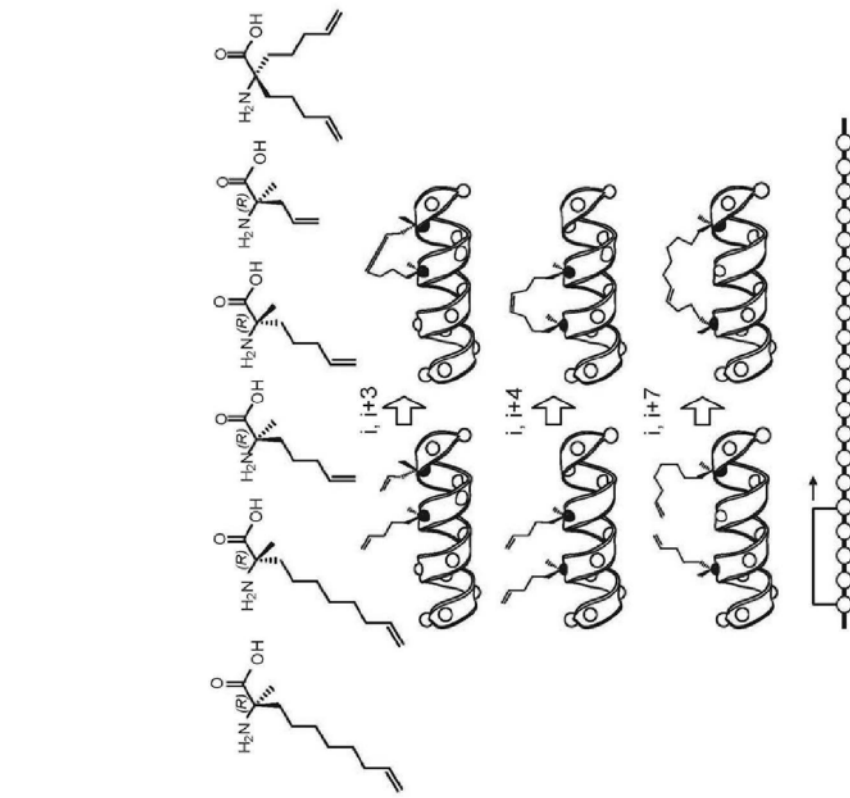


图2

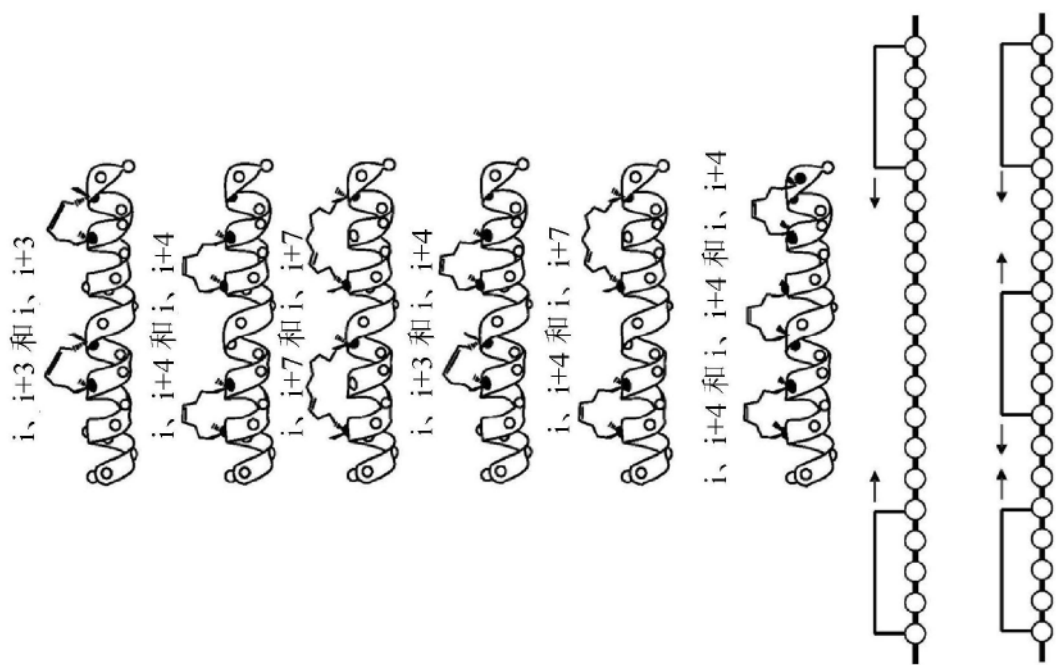


图3

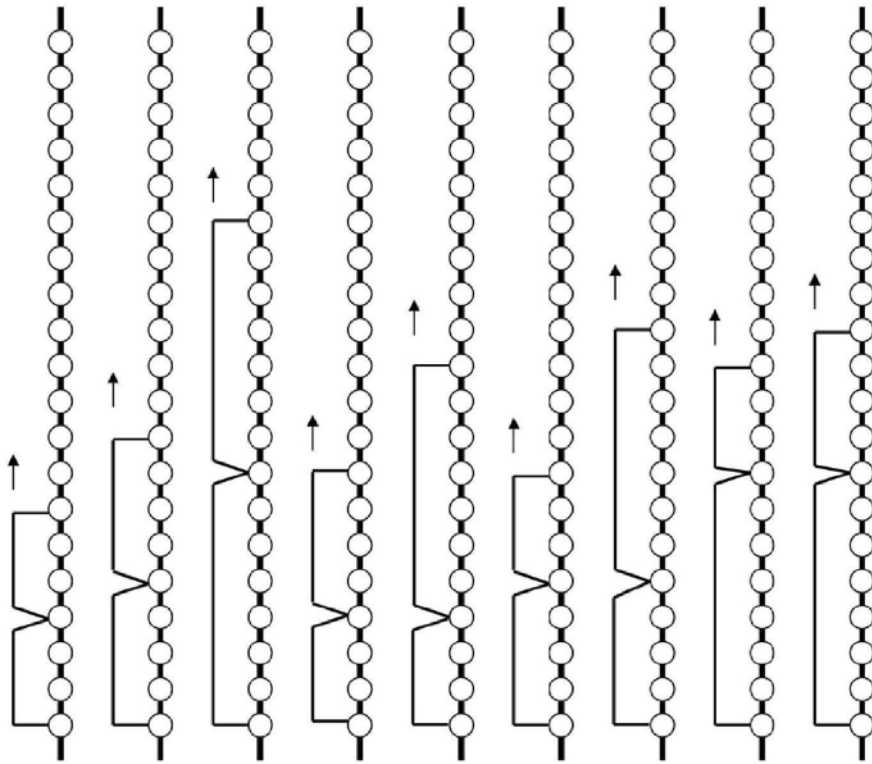


图4

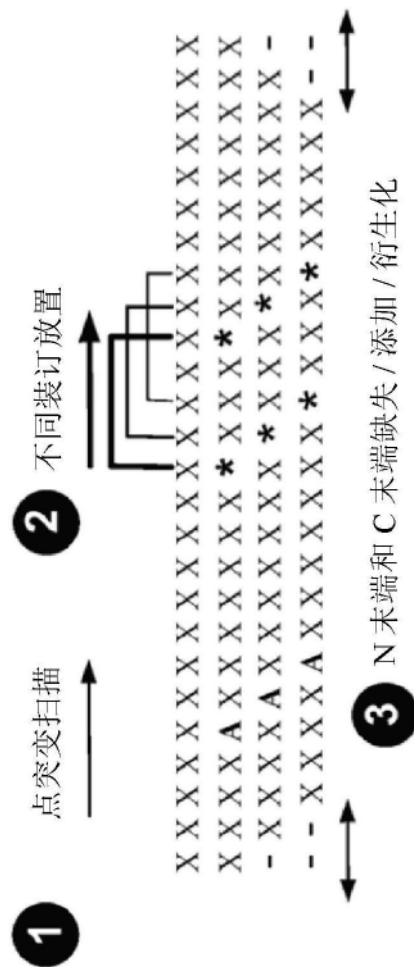


图5

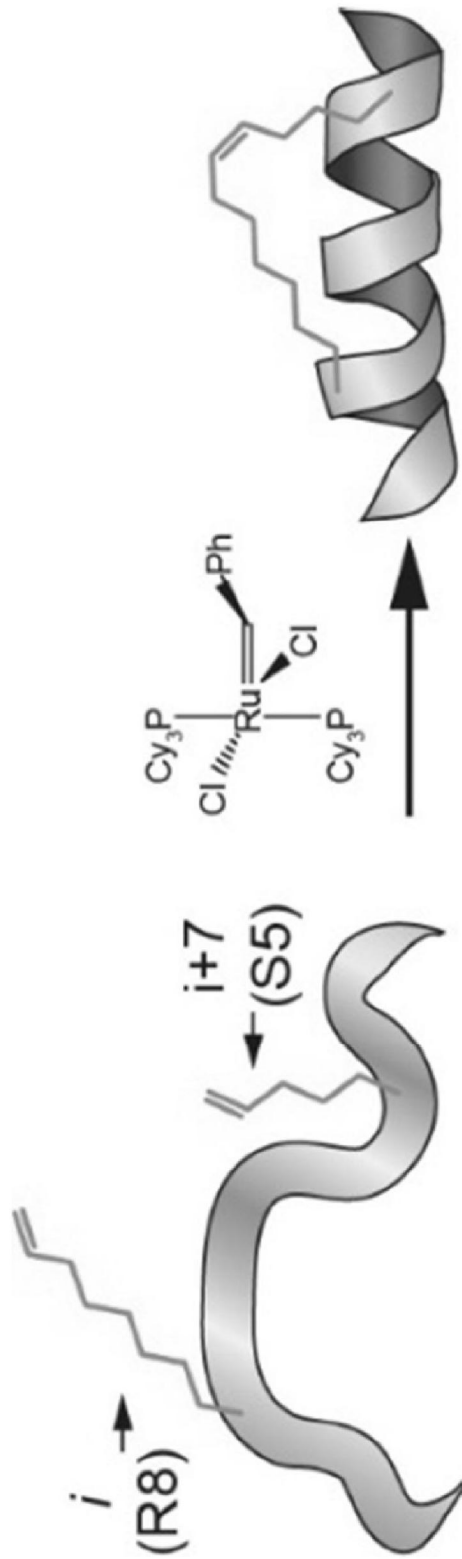


图6

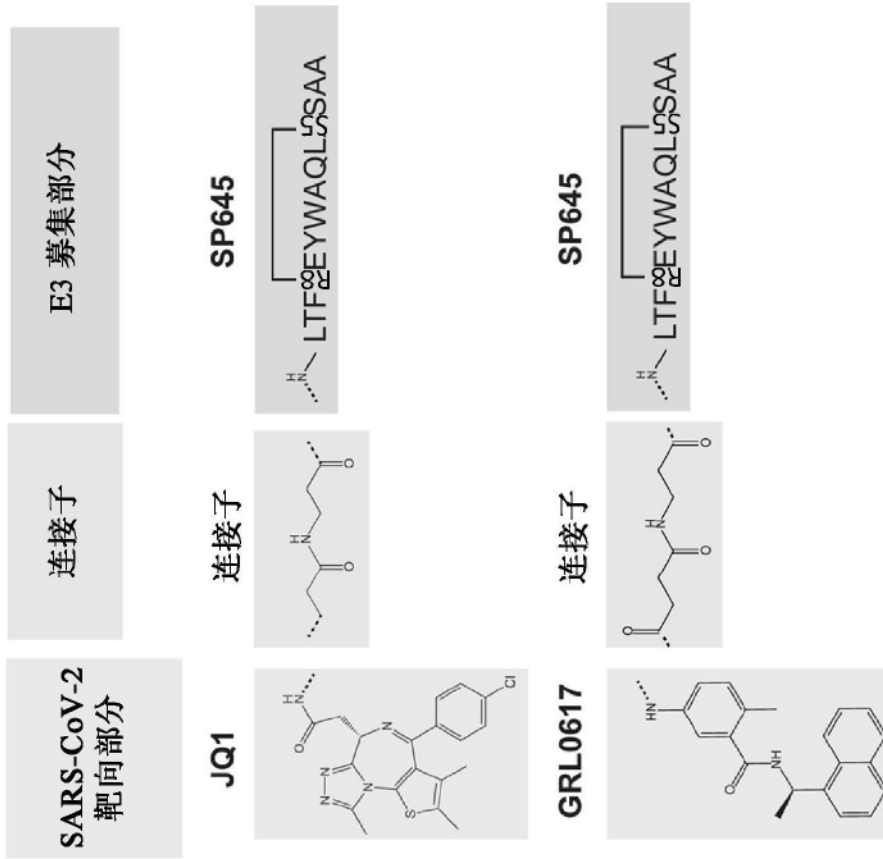


图7

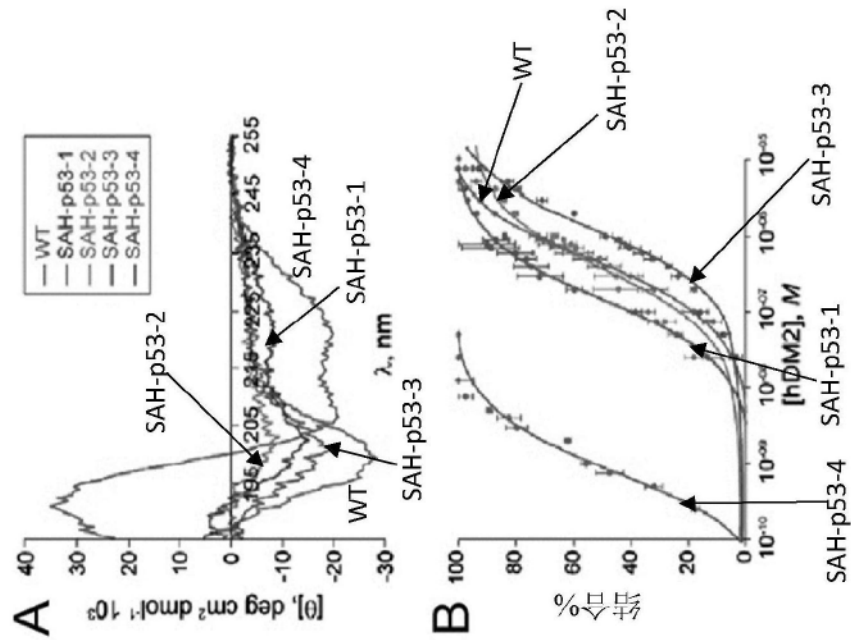


图8

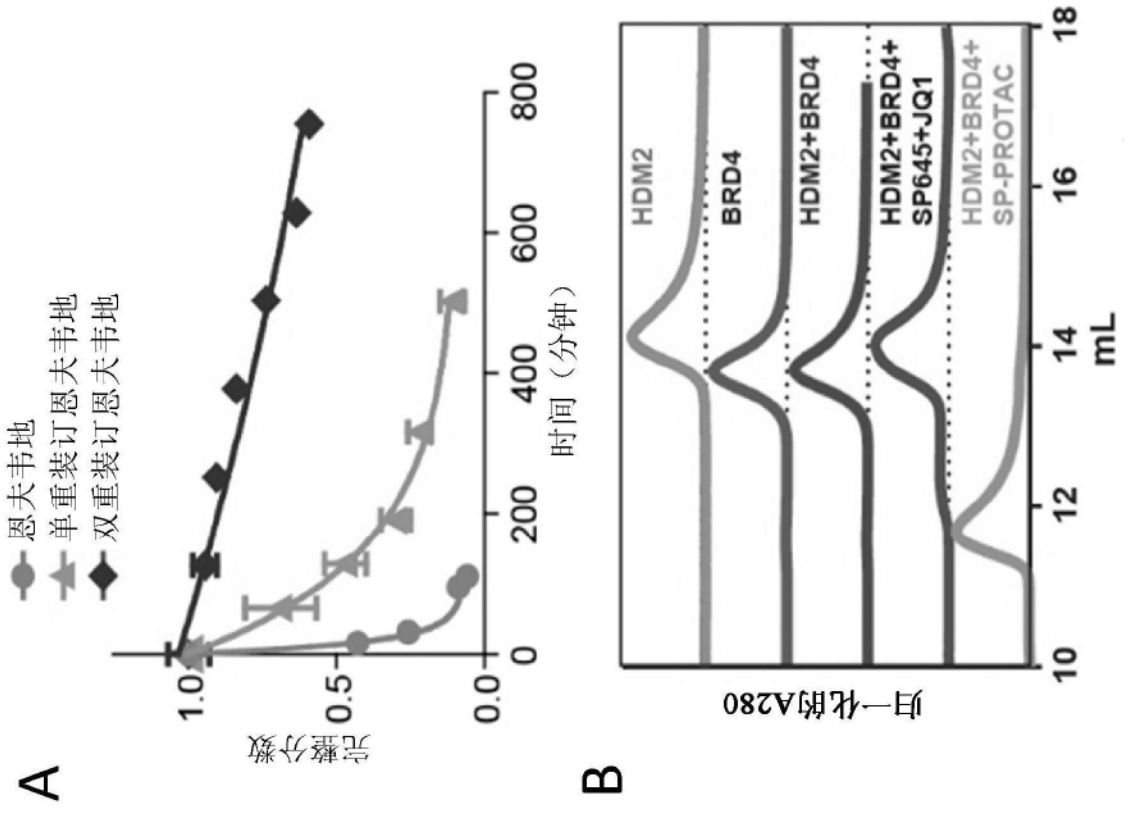


图9

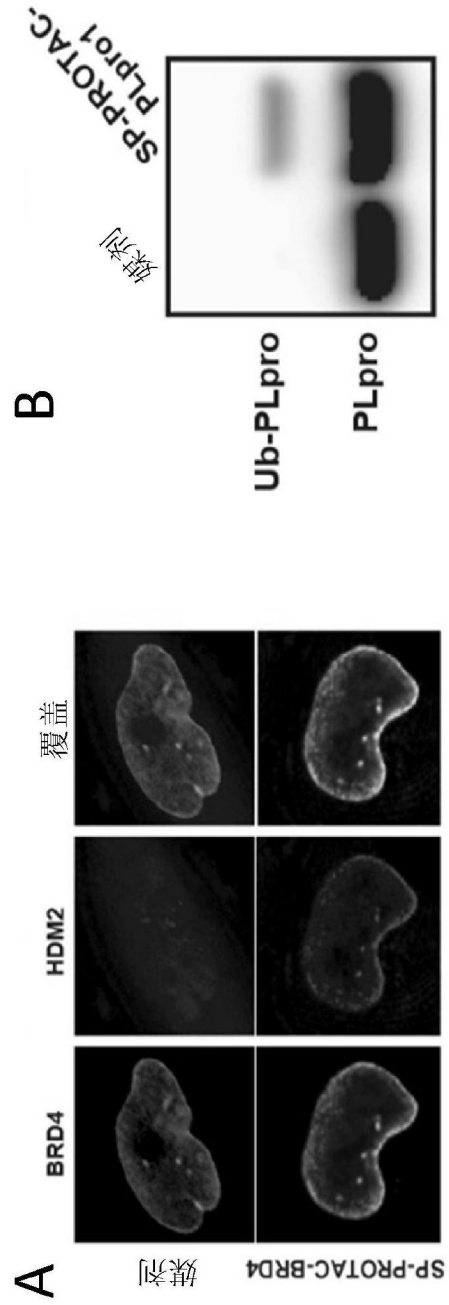


图10

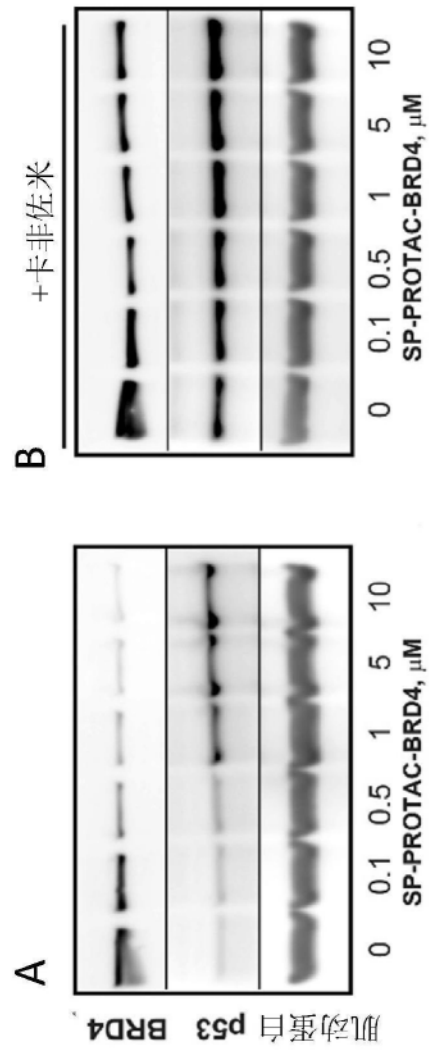


图11

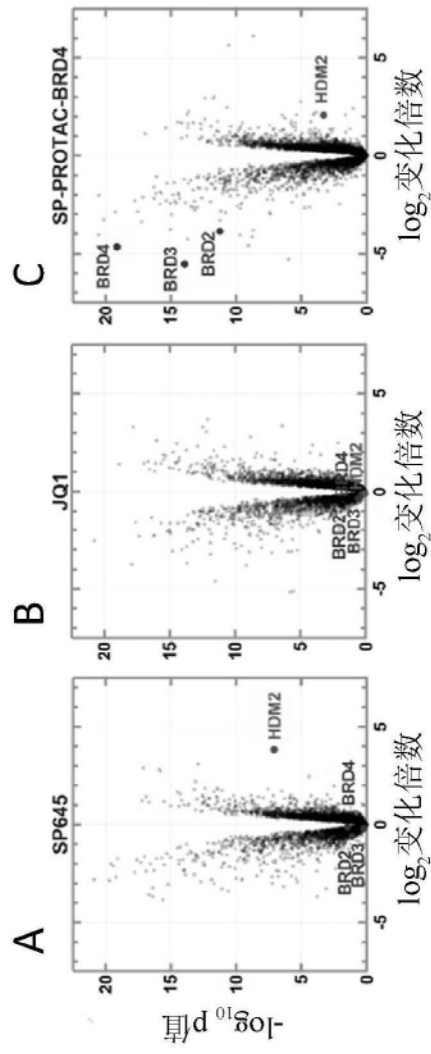


图12

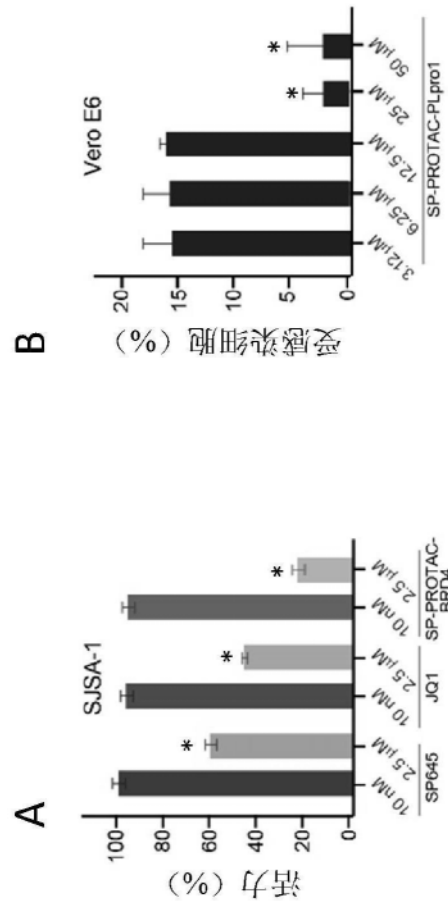


图13

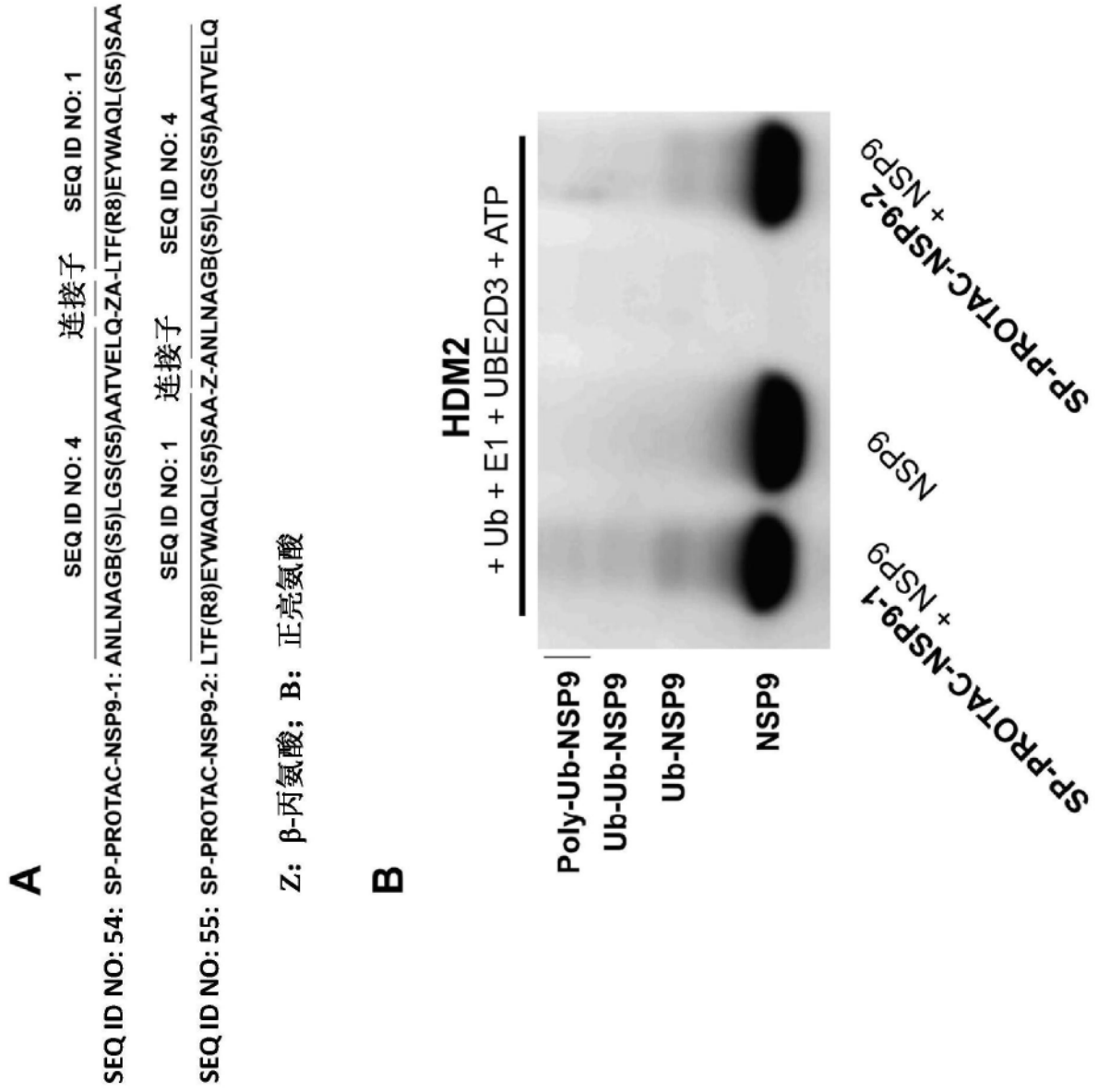


图14