

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5101764号
(P5101764)

(45) 発行日 平成24年12月19日(2012.12.19)

(24) 登録日 平成24年10月5日(2012.10.5)

(51) Int.Cl.

F 1

C07K 14/16	(2006.01)	C07K 14/16	Z N A
A61K 38/00	(2006.01)	A61K 37/02	
A61P 31/18	(2006.01)	A61P 31/18	

請求項の数 10 (全 59 頁)

(21) 出願番号	特願2000-562395 (P2000-562395)
(86) (22) 出願日	平成11年7月30日 (1999.7.30)
(65) 公表番号	特表2002-521490 (P2002-521490A)
(43) 公表日	平成14年7月16日 (2002.7.16)
(86) 國際出願番号	PCT/US1999/017351
(87) 國際公開番号	W02000/006599
(87) 國際公開日	平成12年2月10日 (2000.2.10)
審査請求日	平成18年7月24日 (2006.7.24)
(31) 優先権主張番号	60/094,676
(32) 優先日	平成10年7月30日 (1998.7.30)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	60/100,265
(32) 優先日	平成10年9月14日 (1998.9.14)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	596004598 ホワイトヘッド インスチチュート フォ アー バイオメディカル リサーチ アメリカ合衆国 O 2 1 4 2 マサチュー セツツ州, ケンブリッジ, ナイン ケンブ リッジ センター (番地なし)
(74) 代理人	100095832 弁理士 細田 芳徳
(72) 発明者	エッカート, デプラ, エム. アメリカ合衆国 マサチューセツツ O 2 1 3 8 ケンブリッジ, マサチューセツツ アベニュー 1622

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 H I V 膜融合のインヒビター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

可溶性の三量体型のコイルドコイルと、 H I V g p 4 1 の N - ヘリックスコイルドコイルのポケットを形成するアミノ酸残基を含むのに充分な H I V g p 4 1 の N - ヘリックスコイルドコイルの部分とを含む可溶性の非凝集性三量体ペプチドを含んでなる組成物であって、該ペプチドが、疎水性ポケットが空であり、リガンドによる結合が可能となるように疎水性ポケットを提示し、三量体型のコイルドコイルのアミノ酸配列が：

R M K Q I E D K I E E I E S K Q K K I E N E I A R I K K (配列番号： 25)

であり、 H I V g p 4 1 の N - ヘリックスコイルドコイルの充分な部分が、配列：

L L Q L T V W G I K Q L Q A R I L (配列番号： 20)

を含む、組成物。

【請求項 2】

疎水性ポケットトリガンドを含まない、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 3】

該ペプチドが D - ペプチドである請求項 1 または 2 記載の組成物。

【請求項 4】

該ペプチドが L - ペプチドである請求項 1 または 2 記載の組成物。

【請求項 5】

該ペプチドが I Q N 1 7 (配列番号： 2) である請求項 1 記載の組成物。

【請求項 6】

10

20

薬学的に許容され得る担体中に存在する請求項 1 ~ 5 いずれか記載の組成物。

【請求項 7】

個体において免疫応答を引き起こす方法に使用される医薬の製造における、請求項 1 ~ 6 いずれか記載の組成物の使用。

【請求項 8】

医薬が、筋内、腹腔内、経口、経鼻および経皮からなる群より選ばれる投与経路に適する請求項 7 記載の使用。

【請求項 9】

(a) 可溶性の三量体型のコイルドコイル、ここで、三量体型のコイルドコイルのアミノ酸配列が：

R M K Q I E D K I E E I E S K Q K K I E N E I A R I K K (配列番号：25)

である、および

(b) H I V g p 4 1 の N - ヘリックスコイルドコイルのポケットを形成するアミノ酸残基を含むのに充分な H I V g p 4 1 の N - ヘリックスコイルドコイル の部分、ここで、H I V g p 4 1 の N - ヘリックスコイルドコイルの充分な部分が、配列：

L L Q L T V W G I K Q L Q A R I L (配列番号：20)

を含む、

を含んでなる融合タンパク質を製造する工程を含む、請求項 1 ~ 6 いずれか記載の組成物の製造方法。

【請求項 10】

融合タンパク質が I Q N 1 7 であり、I Q N 1 7 のアミノ酸配列が配列番号：2 である、請求項 9 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願

本出願は、1997年4月17日に提出された、H I V エンベロープ糖タンパク質由来の g p 4 1 のコア構造と題するデービッド シー. チャン (David C. Chan)、デボラ ファス (Deborah Fass)、ミン ルー (Min Lu)、ジェイムス エム. バーガー (James M. Berger) およびペーター エス. キム (Peter S. Kim) による米国仮出願第 6 0 / 0 4 3 , 2 8 0 号および 1998 年 4 月 17 日に提出された、H I V エンベロープ糖タンパク質由来の g p 4 1 のコア構造と題するデービッド シー. チャン、デボラ ファス、ミン ルー、ジェイムス エム. バーガー およびペーター エス. キムによる米国出願第 0 9 / 0 6 2 , 2 4 1 号に関する。本出願は、1998年7月30日に提出された、H I V 膜融合のインヒビターと題するデービッド シー. チャン、デブラー エム. アーゴット (Debra M. Hrgott) およびペーター エス. キムによる米国仮出願第 6 0 / 0 9 4 , 6 7 6 号；1998年9月14日に提出された、H I V 膜融合のインヒビターと題するデービッド シー. チャン、デブラー エム. アーゴットおよびペーター エス. キムによる米国仮出願第 6 0 / 1 0 0 , 2 6 5 号および 1998 年 9 月 18 日に提出された、H I V 膜融合のインヒビターと題するデービッド シー. チャン、デブラー エム. アーゴットおよびペーター エス. キムによる米国仮出願第 6 0 / 1 0 1 , 0 5 8 号；ならびに 1999 年 5 月 3 日に提出された、デブラー エム. アーゴット、デービッド シー. チャン、ラジミール マラシュケヴィッチ (Vladimir Malashkevich) およびペーター エス. キムによる米国仮出願第 6 0 / 1 3 2 , 2 9 5 号の利益を主張するものである。これらの参照された出願の全ての教示は、参照により本明細書に取り込まれる。

【0002】

政府の支援

本発明は、国立衛生研究所交付番号 P 0 1 G M 5 6 5 5 2 により、全部または一部支援された。米国政府は、本発明において、一定の権利を有する。

【0003】

10

20

30

40

50

発明の背景

ヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）由来のタンパク質の構造研究は、抗レトロウイルス薬物の開発に必須であった。構造に基づく創薬は、臨床用途におけるHIV-1薬物の2つのクラスである逆転写酵素インヒビターとプロテアーゼインヒビターに関して、最も熱心であった。HIV侵入に対して、構造に基づく創薬を行ないうることも有用である。

【0004】

発明の要旨

本明細書に記載のように、HIVエンベロープタンパク質gp41サブユニット（例えば、HIV-1エンベロープタンパク質gp41-サブユニット）のN-ヘリックスコイルドコイルの表面のくぼみ（cavity）は、該コイルドコイル表面、とりわけ、くぼみを結合することにより、細胞へのHIV侵入を阻害する薬物または他の薬剤の標的である。これは、HIV（例えば、HIV-1、HIV-2など）の細胞への侵入を阻害する薬物または薬剤を同定およびデザインするための基礎として有用である。

10

【0005】

本明細書に記載された結果は、gp41コアにおける前記コイルドコイルくぼみ（疎水性ポケットともいう）は、魅力的な薬物標的であり、かつ当該くぼみを結合する分子がHIV感染性（細胞へのHIV侵入）を妨害（阻害）することを示す。出願人は、まず、疎水性ポケットに突出する保存残基が、明らかにC34のHIV-1感染を阻害する能力において主要な役割を果たすことを示した。gp41機能に対するくぼみ接近（gp41のN-ヘリックスコイルドコイルくぼみとCペプチド領域の残基との間）の重要性は、明らかである。逆に、gp41機能の阻害において、かかるくぼみ接近を妨げ、したがって細胞へのHIV-1侵入を阻害することの重要性も、明らかである。また、gp41の中央-コイルドコイルの疎水性ポケットに対する薬物を指向することは、HIV-1エンベロープタンパク質の最も高く保存された領域の1つを標的とするものであり、このことは、コイルドコイル表面、および特にその疎水性ポケットを標的とする薬剤が多岐にわたるHIV単離物に対する広範な活性を有するであろうことならびに薬剤回避変異体が現れるのが困難であろうことを意味する。

20

【0006】

鏡像ファージディスプレイ技術〔ティー・エヌ・シューマッハ（T. N. Schumacher）ら、Science, 271: 1854 (1996)〕、コンビナトリアルケミストリー〔エー・ボーチャート（A. Borchardt）, エス・ディー・リバールス（S. D. Liberles）, エス・アール・ビッガー（S. R. Bigger）, ジー・アール・クラブトウリー（G. R. Crabtree）, エス・エル・シュレイバー（S. L. Schreiber）, Chem. Biol., 4: 961 (1997); ジェイ・シー・シャバラ（J. C. Chabala）, Curr. Opin. Biotech., 6: 632 (1995)〕、合理的な薬物デザインおよび他の薬物スクリーニングならびに医薬化学法などの種々の方法を用いて、HIV-1感染を阻害するに十分な親和性によりコイルドコイルくぼみを結合するD-ペプチド、ペプチド擬似物および小分子を同定しうる。本明細書に記載のN36/C34安定性とC34の効力との間の近密な関係は、かかる化合物の有効性がそれらのくぼみ接近の強度に決定的に依存するであろうことを示唆する。本明細書に記載のように、候補化合物は、C34とN36との間の安定な複合体の形成を妨げるそれらの能力または2者の結合を破壊する（複合体を破壊する）能力について調べられ、それにより、HIV-1侵入の強力なインヒビターを同定および評価するための迅速な定量的スクリーニングを提供しうる。

30

【0007】

一方、スクリーニングを行ない、N-ヘリックスコイルドコイルくぼみの結合を妨げるかあるいは破壊する分子または化合物およびくぼみを結合するペプチドを同定することができ、そうして、「ポケット特異的」結合薬剤または薬物である分子を同定する方法を提供する。本明細書に記載された分子および化合物（薬物または薬剤ともいう）は、gp41

40

50

を不活性化し、そして細胞へのHIV-1侵入を防ぎまたは減少（阻害）するのに有用である。理論的に結合されることが期待されない場合、これらのインヒビターがgp41のプレ-ヘアピン中間体に結合し、かつgp41の融合活性化段階に対応するgp41コアの3量体ヘアピン構造へのその変換を防ぐことを提案するのが道理にあう。〔チャン、ディー・シー（C h a n , D . C . ）およびピー・エス・キム（P . S . K i m ）、C e 1 1 , 9 3 : 6 8 1 (1 9 9 8) 、図1を参照のこと〕。したがって、本方法は、HIV-1 gp41エンベロープタンパク質の融合活性化状態の形成を（全体的にまたは部分的に）阻害する薬物または薬剤を同定するのに有用である。本方法において、小分子（例えば、小有機分子）、ペプチド（D-ペプチドまたはL-ペプチド）、ペプチド擬似物、タンパク質または抗体などのいかなるタイプの化合物または分子でありうる候補インヒビター（候補薬物ともいう）のgp41のN-ヘリックスコイルドコイルを結合し、安定な複合体を形成する能力を評価する。さらに、N-ヘリックスコイルドコイルに結合する化合物または分子を、代表的な方法が、本明細書に記載され、参考されるHIV-1感染（ウイルス侵入）およびシンシチウム（syncytium）アッセイを介するなど、gp41機能を阻害する（膜融合を阻害する）それらの能力について評価する。かかるアッセイを介してgp41機能を阻害することが示されるこれらの薬剤を、さらに付加的なイン・ビトロアッセイおよび適切な動物モデルにおいて、それらの活性を評価しうる〔例えば、レトビン、エヌ・エル・（L e t v i n , N . L . ）、S c i e n c e , 2 8 0 , (5 3 7 1) : 1 8 7 5 - 1 8 8 0 (1 9 9 8) , ハーシュ、ブイ・エム・（H i r s c h , V . M . ）およびピー・アール・ジョンソン（P . R . J o h n s o n ）、V i r u s R e s e a r c h , 3 2 (2) : 1 8 3 - 2 0 3 (1 9 9 4) ; レイマン、ケー・エー・（R e i m a n n , K . A . ）ら、J . V i v o l . , 7 0 (1 0) : 6 9 2 2 - 6 9 2 8 (1 9 9 6) 〕。いかなる適切なアプローチをも用いて、候補インヒビターのN-ヘリックスコイルドコイルへの結合と、本明細書に記載された研究の結果、N-ヘリックスコイルドコイルくぼみへの結合とを評価することができる。1つの態様において、候補インヒビターの合成ペプチドN36〔ルー、エム（L u , M . ）ら、J . B i o m o l . S t r u c t . D y n . 1 5 : 4 6 5 (1 9 9 7) , チャン・ディー・シー・（C h a n , D . C . ）ら、C e 1 1 , 8 9 , 2 6 3 (1 9 9 7) および1997年4月17日に提出されたデービッド・シー・チャン、デボラ・ファス、ミン・ルー、ジェイムス・エム・バーガーおよびペーター・エス・キムによる、HIVエンベロープ糖タンパク質由来のgp41のコア構造と題した米国仮出願第60/043,280号に記載〕を結合する能力を評価する。本明細書に記載の方法を用いて、得られた複合体の安定性を評価する。

【0008】

N-ヘリックスコイルドコイルくぼみを結合する化合物または分子（薬物または薬剤）を同定する方法の具体的な態様において、gp41コイルドコイルくぼみを提示する可溶性モデルを用いる。HIV gp41の6つのヘリックスの束（bundle）は、3量体コイルドコイルの外側における保存された疎水性溝に適合する3つのC-ペプチドにより囲まれた3つの同じN-ペプチドから構成される内部3量体コイルドコイルからなる。3量体コイルドコイルのC末端は、C-ペプチド由来の巨大な疎水性基に包まれる大きなくぼみを含む。本疎水性ポケットは、抗HIV薬物の発見および/またはデザインの標的として用いられる。残念ながら、C-ペプチドの非存在下に、N-ペプチドは、凝集され、100%らせん状でない。したがって、N36、N51〔ルー、エム・（L u , M . ）ら、N a t u r e S t r u c t . B i o l o g y , 1 9 9 5 〕またはDP-107（ワイルド（W i l d ）ら、P N A S 8 9 : 1 0 5 3 7 - 1 0 5 4 1 (1 9 9 2) などのHIV-1 gp41由来のNペプチドを単に用いることは、N-ヘリックスコイルドコイルの有効なモデルを提供する見込みがない。

【0009】

本明細書に記載のように、出願人は、HIV gp41の疎水性ポケットの可溶性非凝集性3量体ペプチドモデルを製造することに成功し、したがって、初めて、（HIV gp41構造における対応残基に類似した構造を形成する様式または立体配置で）この疎水性

10

20

30

40

50

ポケットまたはくぼみを適切に提示するモデルを提供した。（「ポケット」および「くぼみ」は互換的に用いられる）。記載されたように、可溶性3量体コイルドコイル部分と、HIV gp 41のN-ヘリックスコイルドコイルのポケットまたはくぼみ（N-ペプチドの残基を含むポケット）を形成するアミノ酸残基を含むHIV gp 41のN-ペプチド領域由来の部分とを含むペプチド（融合タンパク質ともいう）を製造し、HIV gp 41機能、例えば、細胞へのHIV侵入を阻害する分子または化合物を同定するのに有用なかかる可溶性モデルであることを示した。ペプチドにおける、3量体状のコイルドコイル（融合タンパク質ともいう）は、HIVのタンパク質ではないタンパク質（GCN4-pIQ_Iなどの非HIVタンパク質）またはHIV起源のタンパク質（HIV由来のタンパク質またはHIVタンパク質と同一または類似のアミノ酸配列を有するタンパク質）のコイルドコイル領域でありうる。特定の態様において、大きなくぼみを有する、IQN17という可溶性非凝集性3量体ペプチドモデルは、酵母転写活性化因子であるGCN4の、3量体状のコイルドコイル領域とgp 41のNペプチドのC末端の部分とを含有する。IQN17は、安定性を増大させる3つの変異とHIVの17残基とを含む、（以前、米国出願第60/101,058号において、GCN4-pIQと称された）〔エッカート、ディー・エム. (Eckert, D. M.) ら, J. Mol. Biol., 284: 859-865 (1998)〕GCN4-pIQ_Iの29残基を含む；45残基の融合タンパク質の全長をなす、2つのタンパク質間の1残基のオーバーラップが存在する。GCN4-pIQ_Iの配列は：a c - R M K Q I E D K I E E I L S K Q Y H I E N E I A R I K K L I G E R (配列番号：1)である。HIV配列は：L L Q L T V W G I K Q L Q A R I L (配列番号：20)である。IQN17の配列は：a c - R M K Q I E D K I E E I E S K Q K K I E N E I A R I K K L L Q L T V W G I K Q L Q A R I L - a m (配列番号：2)である。HIV部分を配列番号：2に下線を付す；a c - は、N末端アセチル基を示し、- a mは、C末端アミドを示す。IQN17におけるGCN4の、可溶性3量体状のコイルドコイル領域（GCN4の可溶性3量体コイルドコイルという）の配列は：R M K Q I E D K I E E I E S K Q K K I E N E I A R I K K (配列番号：25)である。GCN4-pIQ_Iコイルドコイルのライズ(rise)およびピッチ(pitch)などのスーパー-ヘリックスパラメーター〔ハーバリー、ピー・ピー. (Harbury, P. B.) ら, Nature 371: 80-83 (1994)；ハーバリーら、PNAS 92: 8408-8412 (1995)〕は、HIV gp 41 Nヘリックスコイルドコイルとほぼ同一である。したがって、得られた融合タンパク質分子（IQN17）は、C末端のN-ペプチド疎水性くぼみを提示する長い3量体コイルドコイルを形成することが予想される。IQN17は、-36,000 deg cm² dmol⁻¹の222 nmのモル極円率で円二色性により決定されたように完全にらせん状である。沈降係数により決定されたように、IQN17は、20 μMの濃度における単量体分子量の3.00~3.16倍の範囲の算出分子量に対する観察された分子量の割合を有する別個の3量体種に近い。X線結晶学により決定されるように、IQN17は、HIV gp 41 Nヘリックスコイルドコイルにおけるポケットとほぼ同一の様式でNペプチド疎水性ポケットを提示する。

【0010】

(天然のL掌体またはエナンチオマーD掌体の) IQN17分子は、高処理量薬剤スクリーニングを含むスクリーニングに用いて、コイルドコイルポケットに結合する分子を同定することができる。D掌体のIQN17分子は、(天然L掌体の) gp 41の疎水性ポケットに結合する小分子(D-ペプチド)を同定し、HIV膜融合を阻害するために、鏡像ファージディスプレイ〔シューマッハ(Schumacher)ら, Science, 271: 1854, 1996〕における標的として用いられている。所望の標的(疎水性ポケットを含むHIV gp 41のN-ヘリックス)は、天然由来標的の正しい鏡像である。天然由来のコイルドコイルポケットの鏡像を結合する能力の評価対象の化合物または分子のライプラリーまたはコレクションをスクリーニングするために用いられる。天然由来のgp 41ポケットの鏡像を結合することが見出された化合物または分子の鏡像は、天然

10

20

30

40

50

の掌体の g p 4 1 ポケットを結合するであろう。スクリーニングされたライプラリーまたはコレクションは、ファージディスプレイライプラリー、ペプチドライプラリー、D N A ライプラリー、R N A ライプラリー、コンビナトリアルライプラリー、化学薬剤もしくは薬物のコレクション、細胞溶解物、細胞培養培地または細胞により產生された產物を含む上清などのいかなる型でもありうる。ファージディスプレイライプラリーの場合、D - 標的を用いてファージコートタンパク質をスクリーニングする。標的に結合する特異的なファージクローニングを同定し、発現したタンパク質の鏡像を、D - アミノ酸を用いて化学合成する。鏡像ファージディスプレイにおいて、I Q N 1 7 を用いることにより、g p 4 1 疎水性ポケットに結合するD - ペプチドを同定した。記載されているように、さらなる評価を行ない、D - ペプチドのH I V g p 4 1 機能阻害能を示した。g p 4 1 疎水性ポケットを結合し、H I V 感染性を阻害するD - ペプチドを同定した。疏水性ポケットを結合するD - ペプチドは、（薬物がコイルドコイルポケットに結合し、H I V 感染力を阻害するものである）創薬のためのリード分子および／または薬物発見のための試薬として有用であろう。天然 L 掌体のI Q N 1 7 分子は、高処理量薬剤スクリーニングを含むスクリーニングに用いて、コイルドコイルポケットに結合する分子を同定することができる。I Q N 1 7 を用いて、疎水性ポケットの結合能の評価対象である化合物または分子のコレクションまたはライプラリーをスクリーニングすることができる。スクリーニングされたライプラリーまたはコレクションは、ファージディスプレイライプラリー、R N A ライプラリー、D N A ライプラリー、ペプチドライプラリー、コンビナトリアルライプラリー、化学薬剤もしくは薬物のコレクション、細胞溶解物、細胞培養培地または細胞により產生された產物を含む上清などのいかなる型でもありうる。さらに、疎水性ポケットを結合する化合物または分子は創薬のためのリード分子および／または薬物発見のための試薬として役立つであろう。10

【0011】

I Q N 1 7 のバリエントである融合タンパク質を生産し、g p 4 1 N - ヘリックスコイルドコイルポケットを結合する薬物のスクリーニングに用いることができる。これらの変化は、コイルドコイルの3量体状態を変えないのであれば、広範なバリエーションのいずれもがI Q N 1 7 のG C N 4 - p I Q I 成分においてなされ得、本方法に用いられうる。コイルドコイルの3量体状態を維持するのであれば、例えば、G C N 4 成分のアミノ酸組成は、1以上のアミノ酸残基の付加、置換、修飾および／または欠失により変えられ得る。例えば、I Q N 1 7 におけるA s p 残基（コイルドコイルの「f - 位」）は、天然アミノ酸のいずれによっても置換されうる。〔オニール（O ' Ne il ）およびデグラード（D e G r a d o ）、S c i e n c e 2 5 0 : 6 4 6 (1 9 9 0) 〕。一方、融合タンパク質でのこの成分は、モロニーマウス白血病ウイルス〔ファス、ディー（F a s s , D ）ら、N a t u r e S t r u c t . B i o l o g y , 3 : 4 6 5 (1 9 9 6) 〕、G C N 4 - p I I [ハーバリー（H a r b u r y ）ら、N a t u r e , 3 1 7 : 8 0 、 1 9 9 4] またはA B Cヘテロ3量体（ナウチャル（N a u t i y a l ）およびアルバー（A l b e r ）、P r o t e i n S c i e n c e 8 : 8 4 (1 9 9 9) 〕由来などの他のタンパク質の、3量体状のコイルドコイル領域でありうる。20

【0012】

また、H I V g p 4 1 N ペプチドのC末端部分である融合タンパク質成分のアミノ酸組成を変化させ、I Q N 1 7 バリエントを生産することができる。C末端部分は、1以上のアミノ酸残基の付加、置換、修飾および／または欠失により変えられうる。コイルドコイルの3量体状態およびH I V g p 4 1 のNペプチドの疎水性ポケットが維持されるのであれば、融合タンパク質のいずれかの成分または両方の成分のアミノ酸組成が変えられ得、可能なアミノ酸残基変化の数または型に限定されない。I Q N 1 7 、I Q N 1 7 バリエントまたは大きくぼみを有する任意の可溶性モデルは、N - ヘリックスコイルドコイル、特にポケットを結合する薬物またはリード薬物候補物またはワクチン標品に用いるための候補物をスクリーニングし、さらに、高処理量形式などの当業者に公知の方法を用いてさらにスクリーニングするために用いられうる。40

【0013】

本明細書に記載された結果は、以下に記載のように、C34のバリアントであるHIV-gp41のインヒビターをスクリーニングするために有用である。N36を安定に結合するC34バリアントなどのC34のバリアントが同定されると、それを用い、さらに得られるように評価し、あるいは（例えば、安定性、可溶性、生体利用性を増強するために）所望もしくは必要であれば、それを（例えば、少なくとも1アミノ酸残基を改変、付加、欠失もしくは置換すること、または非アミノ酸置換物を付加することにより）改変しうる。一方、C34バリアントを評価して、より短い成分（より少ないアミノ酸残基の領域）もまたインヒビターとして活性であるかどうかを決定することができる。本明細書に記載のように、N36 3量体における深部の保存ポケットに包まれる3つのC34残基Trp⁶²⁸、Trp⁶³¹およびLeu⁶³⁵は、阻害活性に重要である。N36コイルドコイルへのより高い親和性を有するC34バリアントは、HIV感染に対して、より強い阻害活性を有するという観察は、強いインヒビターを同定し評価するためのスクリーニングの基礎をなす。例えば、コンビナトリアルペプチドケミストリーの『分割（split）-合成』技術（Chen, C. L.ら、Methods Enzymol. 267: 211-219 (1996)；Lam, K. S.ら、Nature, 354: 82-84 (1991)）を用いて、疎水性性質を変える化学的置換により3つの重要な疎水性残基をランダムに置換されたC34バリアントのライブラリーを合成する。この合成技術は、単一のバリアントC34ペプチドの多くのコピーをそれぞれが含むビーズの巨大ライブラリー（すなわち、『1ビーズ、1化合物』型のライブラリー）の創出をもたらす。N-ヘリックスコイルドコイルを安定に結合するC34バリアントを同定するために、N36（または改変N-ペプチド）の標識体を、最も高い親和性を有するこれらのC34バリアントのみへの結合に限られる条件下（例えば、高温）にペプチドビーズと混合する。結合は、公知の方法を用いて、N-ヘリックスペプチドにおける標識の検出により測定される。分割-合成技術の簡単な改変は、質量分析により選別されたペプチド配列の迅速な同定を可能にする（Youngquist, R. S.ら、J. Amer. Chem. Soc. 117, 3900-3906 (1995)）。選択されたC34バリアント、とりわけN36に対する最も高い結合親和性を有するものを、gp41阻害活性について、シンシチウムアッセイおよび感染アッセイで試験する。くぼみ-結合領域のみを含むこれらのC34バリアントの切形型も、阻害活性を試験されうる。一方、評価対象の他のペプチドのライブラリーを合成して、それが評価対象のペプチドを含む（それに結合した）ビーズのライブラリーを作製することができる。このライブラリーは、C34バリアントについて上記のように解析され、得られたヒット（N36に対して適切な結合親和性を有するメンバー）が、gp41阻害活性についてさらに解析される。別の例として、N36ペプチドまたは前記に述べられた、IQN17、GCN4-N-ヘリックスペプチドなどの可溶性バリアントをファージディスプレイまたは鏡像ファージディスプレイ技術の標的として用い、くぼみに結合するペプチドを同定することができる。

【0014】

さらに、IQN17を用いて、コイルドコイルくぼみに結合する抗体（モノクローナルおよび/またはポリクローナル）を生じさせうる。さらに、IQN17を単独または他の物質と組み合わせて、投与（ワクチン接種）される個体において、コイルドコイルに結合する抗体の生産を惹起し、それにより感染および/または疾患に対する防御を提示するワクチンに用いうる。

【0015】

HIV-1エンベロープ糖タンパク質gp41の3量体N-ヘリックスコイルドコイルにおける深部の疎水性ポケットに適合するD-ペプチドおよびL-ペプチドの両方のペプチドも本発明の主題である。D-ペプチドは、gp41疎水性ポケットに排他的に結合することが示されている最初の分子である。これらのD-ペプチドがgp41-媒介膜融合過程（シンシチウム形成およびウイルス感染）を阻害するという観察は、HIV-1感染が

ポケットに特異的に結合する分子により阻害されうるという最初の直接的な説明を提供する。薬物標的としての g p 4 1 疎水性ポケットの確認は、細胞へのウイルス侵入を阻害することにより働く経口的に生体利用可能な抗 H I V 薬物の新しいクラスの開発の段階を設定する。かかる薬物は、治療との組み合わせで H I V - 1 感染を治療するのに用いられる現行の養生法への有用な補助でありうる。本明細書に記載された D - ペプチド、その部分、改変体およびバリエントならびに本明細書に記載の D - ペプチドの全部または一部を含有したより大きい分子（例えば、ポリペプチド）などの D - ペプチドは、H I V 膜融合を阻害し、したがって、細胞への H I V 侵入を阻害するのに有用である。本明細書に記載されたように同定されたファージ配列の D - アミノ酸体に対応する D - ペプチドが H I V - 1 感染およびシンシチウム形成のインヒビターである。これらの D - ペプチドインヒビターにおける C - 末端残基は、配列パターン： C X X X X X E W X W L C A A - a m を有する。（ファージディスプレイにおいて、C 残基に対応する位置は C または S のいずれかとしてコードされ、A A 残基に対応する位置はそれらとしてコードされ、（X で示された）他の 10 個の位置はランダムにコードされた。 - a m は C - 末端アミドを表わし、ペプチド合成過程の一部として付加される）。D - ペプチドインヒビターにおける N - 末端残基は、例えば、a c - G A 、 a c - K K G A または a c - K K K K G A である。a c - は、ペプチド合成過程の部分として付加される N - 末端アセチル基を表わす。C - 末端アミドおよび N - 末端アセチル基は、本発明の D - ペプチドの任意成分である。他の N - 末端残基は、前記センテンスにおけるものの代わりまたはそれに加えて、所望のように（例えば、可溶性の増大のために）含みうる。例えば、下記の配列：

ac-XXCXXXXXEWXWLCXX-am (配列番号：28) ;
 ac-KKXXCXXXXXEWXWLCXX-am (配列番号：29) ;
 ac-KKKXXCXXXXXEWXWLCXX-am (配列番号：30) ;
 ac-XXCXXXXXEWXWLCXXX-am (配列番号：31) ;
 ac-KKXXCXXXXXEWXWLCXXX-am (配列番号：32) ; および
 ac-KKKXXCXXXXXEWXWLCXXX-am (配列番号：33) .

30 を有する D - ペプチドも本発明の主題である。

【 0 0 1 6 】

アミノ酸残基は 1 文字表記 (convention) により表され、X は任意のアミノ酸残基（天然由来もしくは非天然由来）、または修飾されたアミノ酸残基などの他の残基（moiety）を表す。

【 0 0 1 7 】

さらに、12 アミノ酸残基ペプチドの内の 10 アミノ酸残基「コア」（システイン残基により両端がフランкиングされている十量体）、ならびに該十量体の部分、改変体（modification）およびバリエント（variants）も膜融合および H I V の細胞への侵入を阻害するのに有用である。これらのペプチドのバリエント、部分および改変体もインヒビターとして有用である。本発明にさらに詳細に記載しているように、コンセンサス配列（例えば、W X W L (配列番号：23) 、 E W X W L (配列番号：24) 、 C X X X X X E W X W L C (配列番号：12) またはそれらの部分）を含有する D - ペプチドは、N - ヘリックス超らせんを結合することが示されており、膜融合および H I V の細胞への侵入を阻害するのに有用である。鏡像異性ペプチド（D - ペプチド）は、プロテアーゼなどの酵素に対する効率的な基質として働くが、したがって L - ペプチドよりもタンパク質分解に対して耐性があり；それらは L - ペプチドより免疫原性が低い。本発明の D - ペプチドの具体的な態様は：

10

20

30

40

- (a) CDLAKAKEFWL (配列番号: 3) ;
- (b) CEARHREWAWL (配列番号: 4) ;
- (c) CELLGWEWAWL (配列番号: 5) ;
- (d) CLLRAPEWGWL (配列番号: 6) ;
- (e) CSRSQPEWEWL (配列番号: 7) ;
- (f) CGLGQEEFWL (配列番号: 8) ;
- (g) CMRGEWEWSWL (配列番号: 9) ;
- (h) CPPLNKEWAWL (配列番号: 10) ;
- (i) CVLKAKEFWL (配列番号: 11) ;
- (j) KKGACGLGQEEFWL (配列番号: 15) ;
- (k) KKGACELLGWEWAWL (配列番号: 16) ;
- (l) KKKKGACELLGWEWAWL (配列番号: 17) ;
- (m) KKGACMRGEWEWSWL (配列番号: 18) ;
- (n) KKGACPPLNKEWAWL (配列番号: 19) ;
- (o) WXWL (配列番号: 23) を含んでなる D-ペプチド;
- (p) EWXWL (配列番号: 24) を含んでなる D-ペプチド;
- (q) CXXXXEXWL (配列番号: 12) を含んでなる D-ペプチド
- (r) ac-GACEARHREWAWLCAA-am (配列番号: 34) ;
- (s) ac-KKGACEARHREWAWLCAA-am (配列番号: 38) ;
- (t) ac-KKKKGACEARHREWAWLCAA-am (配列番号: 43) ;
- (u) ac-GACGLGQEEFWLCAA-am (配列番号: 44) ;
- (v) ac-KKGACGLGQEEFWLCAA-am (配列番号: 15) ;
- (w) ac-KKKKGACGLGQEEFWLCAA-am (配列番号: 45)
- (x) ac-GACDLKAKEFWLCAA-am (配列番号: 35) ;
- (y) ac-KKGACDLKAKEFWLCAA-am (配列番号: 39) ;
- (z) ac-KKKKGACDLKAKEFWLCAA-am (配列番号: 46) ;
- (a') ac-GACELLGWEWAWLCC-am (配列番号: 47) ;
- (b') ac-KKGACELLGWEWAWLCAA-am (配列番号: 16) ;
- (c') ac-KKKKGACELLGWEWAWLCAA-am (配列番号: 17) ;
- (d') ac-GACRSQPEWEWLCAA-am (配列番号: 36) ;

- (e') ac-KKGACSRSQPEWEWLCAA-am (配列番号: 40) ;
- (f') ac-KKKKGACSRSQPEWEWLCAA-am (配列番号: 48) ;
- (g') ac-GACLLRAPEWGWLCAA-am (配列番号: 37) ;
- (h') ac-KKGACLLRAPEWGWLCAA-am (配列番号: 41) ;
- (i') ac-KKKKGACLLRAPEWGWLCAA-am (配列番号: 49) ;
- (j') ac-GACMRGEWEWSWLCAA-am (配列番号: 50) ;
- (k') ac-KKGACMRGEWEWSWLCAA-am (配列番号: 18) ;
- (l') ac-KKKKGACMRGEWEWSWLCAA-am (配列番号: 51) ;
- (m') ac-GACPPLNKEWAWLCAA-am (配列番号: 52) ;
- (n') ac-KKGACPPLNKEWAWLCAA-am (配列番号: 19) ;
- (o') ac-KKKKGACPPLNKEWAWLCAA-am (配列番号: 53) ;
- (p') ac-GACXXXXXEWXWLCAA-am (配列番号: 54) ;
- (q') ac-KKGACXXXXXEWXWLCAA-am (配列番号: 55) ;
- (r') ac-KKKKGACXXXXXEWXWLCAA-am (配列番号: 56) ;
- (s') ac-XXCXXXXXEWXWLXX-am (配列番号: 57) ;
- (t') ac-KXXXCXXXXXEWXWLXX-am (配列番号: 58) ;
- (u') ac-KKKKXXXCXXXXXEWXWLXX-am (配列番号: 59) ;
- (v') ac-XXCXXXXXEWXWLXXX-am (配列番号: 60) ;
- (w') ac-KXXXCXXXXXEWXWLXXX-am (配列番号: 61) ;
- (x') ac-KKKKXXXCXXXXXEWXWLXXX-am (配列番号: 62) ; および
- (y') HIV gp41 の N-ヘリックスコイルドコイルくぼみを結合する
(a)～(x')の配列の変異体、
(式中、N末端の ac- および C-末端の -am は任意である)

である。

【 0 0 1 8 】

本明細書に記載の D - ペプチドは、 N - ヘリックスポケットを結合することが示されたリガンドであり、 N - ヘリックスポケットを結合することから HIV のインヒビターでもある化合物または分子（例えば、化合物ライブラリー、組換え的に製造された産物、天然に存在する物質、培養培地または上清み由来）を同定するための薬物スクリーニングにおいても有用である。例えば、 N - ヘリックスくぼみを結合する D - ペプチド（例えば、本明細書に記載の D - ペプチド）； IQN17（例えば、天然の L 体の）、または N - ヘリックスくぼみを提示する可溶性モデルである別の融合タンパク質；および候補インヒビター（ N - ヘリックスくぼみを結合する能力の評価対象の化合物または分子）を組み合わせることにより、競合アッセイを行うことができる。例えば、 D10 pep5 または D10 pep1 、 IQN17 、および候補インヒビター（候補薬物）を、 D10 pep5 または D10 pep1 の IQN17 への結合に適するバッファー条件およびペプチド濃度を用いて組み合わせることができる。 D - ペプチドの結合が生じる程度を測定し、同一条件下であるが、 HIV あり g p 4 1 エンベロープタンパク質の N - ヘリックス超らせんくぼみを結合する能力の評価対象の化合物または分子（候補薬物または候補インヒビターという）の非存在下で結合が生じる程度（対照）と比較する。 D10 pep5 または D10 pep1 の結合が、候補インヒビターの存在下（被検試料）において非存在下（対照試料）よりも低い程度で生じる場合、候補インヒビターは、 N - ヘリックス超らせんくぼみを結合するリガンドであり、したがってインヒビターである。このようにして同定されるインヒビターは、本明細書に記載のようなウイルス感染力アッセイおよびシンシチウム（ syncitium ）形成アッセイにおいてその活性をさらに評価することができる。かかるアッセイにおいて活性を示すそのようなインヒビターは、適当な動物モデルまたはヒトにおいてさら

10

20

30

40

50

に評価することができる。

【0019】

N-ヘリックスくぼみを結合することが知られたD-ペプチドの結合を検出することができる任意の方法を用い、候補インヒビターが結合を妨害するか否かを評価することができる。例えば、D-ペプチドは検出可能に標識することができ、候補インヒビターの存在下および非存在下に、標識がN-ヘリックスくぼみ上に現れる(D-ペプチドの結合の結果)程度を検出する。候補インヒビターの非存在下(対照試料)よりも候補インヒビターの存在下(被検試料)において、より少ない標識がIQN17(または他の適当な融合タンパク質)のN-ヘリックスくぼみ上に現れる場合、候補インヒビターは、N-ヘリックスくぼみを結合(およびD-ペプチドの結合を妨害)するリガンドである。あるいはまた、近接したときに発蛍光団の蛍光シグナルを消光する適当な消光物質(例えば、DABCYL; 4-(4'-ジメチルアミノフェニルアゾ)安息香酸)とともに、発蛍光団(例えば、EDANS; 5-(2'アミノエチル)アミノナフタレン-1-スルホン酸)により、D-ペプチド(例えば、D10 pep 5またはD10 pep 1)およびIQN17を標識することができる。候補インヒビターがIQN17のN-ヘリックスくぼみを結合する場合、候補インヒビターの結合の結果、D-ペプチドが、レポーターシグナルが消光され得るには消光物質に十分に近接しないため、蛍光が観察される。あるいはまた、蛍光レポーター分子をIQN17上に、かつD-ペプチド上に適当な消光物質を存在させ得る。どちらの場合も、IQN17上のレポーターまたは消光物質の位置は、D-ペプチドがN-ヘリックスくぼみを結合すると、該レポーターおよび消光物質部分が、互いに消光を生じるよう十分に近接するようでなければならない(Tyagi, S.ら、Nature Biotechnology 16: 49 (1998))。

【0020】

また、本発明の主題は、HIV gp 41のN-ヘリックス超らせんポケットを結合し、細胞へのHIV侵入を(部分的または完全に)阻害する薬物(化合物および分子)である。一態様では、これらの薬物は、本明細書に記載のようにして、またはその他の方法によって同定することができる。HIV gp 41のN-ヘリックス超らせんポケットを結合する薬物は、細胞へのHIV侵入を妨害または侵入が起こる程度を低減するための治療剤として、例えば、HIV gp 41機能のメカニズムを研究するための研究ツールとして、および個体(例えば、動物モデルまたは感染したヒト)によるウイルスクリアランスの割合を調べるために有用である。

【0021】

また、本発明の主題は、粘膜細胞へのHIVの侵入の妨害方法に有用な組成物であり、これらの組成物は、適当な担体または基剤ならびに：

(a) C34ペプチド；

(b) DP178；

(c) T649；

(d) T1249；

(e) (a)～(d)の誘導体；

(f) HIV gp 41の疎水性ポケットに結合するD-ペプチド；

(g) (f)の誘導体；

(h) (a)～(g)の2種以上の組み合わせ；および

(i) N-ヘリックス超らせんへの結合によるHIV感染力を阻害する分子

からなる群より選ばれる少なくとも1種の成分を含有する。該組成物は、かかる成分の1種または2種以上の成分を含有することができる。

【0022】

本発明のさらなる主題は、HIV感染および/または疾患に対して(部分的または完全に)防御するであろう免疫応答(例えば、抗体産生)を顕現させるために使用しうる組成物(例えば、タンパク質またはタンパク質性物質)である。かかる組成物は、防御剤(例えば、ワクチン)として、および研究ツール、診断用ツール、薬物スクリーニング試薬とし

10

20

30

40

50

て有用な（モノクローナルおよび／またはポリクローナル）抗体を得るため、ならびに動物モデルまたは感染したヒトにおけるウイルス動力学（ウイルスの生成およびクリアランスの速度）を評価するために有用である。

【0023】

また、本発明の主題は、IQN17とD10 pep1の複合体のX線結晶構造の原子座標のリストである。また、本発明の主題は、IQN17のX線結晶構造の座標のリストである。これらの座標は、D10 pep1がどのようにN-ヘリックス超らせんくぼみおよびN-ヘリックス超らせんくぼみのモデルに結合するのかを示す複合体のモデルを作製するために使用（例えば、コンピューターグラフィックスのプログラムのための電子ファイルとして）することができる。かかるモデルは、コンピューターグラフィックスモデリングなどの当業者に知られた方法において、他のペプチド、ペプチド擬似物、小分子、薬物または他の化合物によるN-ヘリックス超らせんくぼみへの結合のしやすさを評価するための新しいモデルを構築するために使用することができる。かかるモデルを、N-ヘリックス超らせんくぼみを結合する分子（ペプチド、ペプチド擬似物、小有機分子、薬物または他の化合物）の構造の新しいモデルを構築するためにも使用することができる（例えば、H. Kubinyi (Kubinyi), Curr. Op. Drug Discov. Devolop., 1:16 (1998); P. L. Wood, ibid, 1:34 (1998); J. R. Murphy, ibid, 1:59 (1998)）。これらのモデルおよび原子座標の対応するリストを、当業者に知られた方法を用い、HIV感染を阻害する、より効果的および／または新しいD-ペプチド、L-ペプチド、ペプチド擬似物、他の小分子または薬物を同定、評価、発見および設計するのに使用することができる。本発明のさらなる主題は、本明細書に記載のHIV gp41疎水性ポケットの可溶性四量体ペプチドモデル（例えば、IQN17またはそのバリエント）の結晶、D-ペプチドとの複合体であるようなモデル（例えば、D10 pep1などの本明細書に記載のD-ペプチドとの複合体としてのIQN17またはそのバリエント）の結晶、またはHIV gp41のN-ヘリックス超らせんのポケットを含むアミノ酸残基を含有するHIV gp41のN-ペプチド領域の結晶などの、結晶の原子座標の使用によるHIV gp41のN-ヘリックス超らせんポケットに適合する（内部に詰まる、結合する）薬物の製造または同定方法である。該方法は、エンプティ（empty）可溶性モデル（D-ペプチドとの複合体でない）などの可溶性モデルの結晶を得る工程、該結晶（例えば、IQN17などのエンプティ可溶性モデルの結晶）の原子座標を得る工程；得られた原子座標を使用してHIV gp41のN-ヘリックス超らせんポケットを明確化する工程；N-ヘリックス超らせんポケットに適合する分子または化合物を同定し、該分子または化合物を得る工程；該分子または化合物をN-ヘリックス超らせんポケットと〔例えば、該ポケット（例えば、IQN17もしくはそのバリエントまたはN-ペプチド）を含むポリペプチドと接触させることにより〕接触させ、該分子または化合物のHIV gp41のポケットに適合する能力を評価（測定）する工程を含み、ここで、該分子または化合物においてポケットに適合し、そしてN-ヘリックス超らせんポケットに適合する薬物であり、それによりポケットに適合する薬物を製造する。結晶の原子座標はX線回折試験により得ることができ、すなわち、IQN17のための本明細書に示されたPDB（図11A～11V）などのコンピュータファイルもしくはプロテイン・データ・ベース（PDB）を形成し得る。

【0024】

同様に、該方法は、D-ペプチド（例えば、D10 pep1などの本明細書に記載のD-ペプチド）との複合体の状態の可溶性三量体モデルの結晶、またはN-ヘリックス超らせんのポケットを含有するHIV gp41のN-ペプチド領域の結晶を用いて行うことができる。

【0025】

このようにして製造される薬物は、ポケットに適合する能力をコンフォームするために（例えば、NMRにより）さらに評価することができ、細胞へのHIV侵入を阻害する能力を（例えば、シンシチウムアッセイまたは感染力アッセイにより）評価することができる

10

20

30

40

50

。

【0026】

本明細書において引用したすべての文献の教示および全内容は参照により特に本出願に取り込まれる。

【0027】

発明の詳細な説明

HIV-1エンベロープタンパク質のgp41サブユニットは、ウイルス膜と細胞膜との融合を媒介する。gp41のエクトドメインコア結晶構造は、逆平行のC-ヘリックスと対形成するN-ヘリックスからそれぞれがなる3つのらせん状ヘアピンから構成される6回らせんの束である〔D. C. Chan、D. Fass、J. M. Berger、P. S. Kim、Cell、89:263(1997)、W. Weissenhorn、A. Dessen、S. C. Harrison、J. J. Skehel、D. C. Wiley、Nature、387:426(1997); K. Tan、J. Liu、J. Wang、S. Shen、M. Lu、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、94:12303(1997)〕。3つのN-ヘリックスにより、内部に位置する三量体の超らせんが形成され、そして3つのC-ヘリックスにより、保存された疎水性の溝に沿ったこのN-ヘリックス超らせんの外側が包まれている。この構造は、(D. C. Chan、D. Fass、J. M. Berger、P. S. Kim、Cell、89:263(1997)ならびにD. C. ChanおよびPeter S. Kim、Cell、93:681(1998)において議論されている)gp41の融合活性状態のコアに対応していることが考えられ、下記のウイルスに由来するエンベロープ融合タンパク質の提案された融合誘導(fusogenic)構造との類似性を示している:インフルエンザ(P. A. Bullough、F. M. Hugson、J. J. Skehel、D. C. Wiley、Nature、371:37(1994))、モロニーマウス白血病ウイルス(D. Fass、S. C. Harrison、P. S. Kim、Nat. Struct. Biol.、3:465(1996))、およびサル免疫不全症ウイルス(SIV)(V. N. Malashkevich、D. C. Chan、C. T. Chutkowski、P. S. Kim、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、95:9134(1998)、M. Cafrey他、EMBO J.、17:4572(1998))、ならびにエボラウイルス(W. Weissenhorn他、Mol. Cell、2:605(1998)、V. N. Malashkevich他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、96:2662(1992))。

【0028】

DP178およびC34などの合成C-ペプチド(C-ヘリックスに対応するペプチド)は、HIV-1膜融合の強力なインヒビターであり、実験室で使用されている株および直接得られた単離体の両方に対して効果的である〔V. N. Malashkevich、D. C. Chan、C. T. Chutkowski、P. S. Kim、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、95:9134(1998)〕。DP178はHIV-1 gp41の残基638~673に対応し、そのアミノ末端がアセチル化され、カルボキシ末端がアミド化されている(C. T. Wild、D. C. Shugars、T. K. Greenwell、C. B. McDanal、T. J. Matthews、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、91:9770(1994)、S. Jiang、K. Lin、N. Strick、A. R. Neurath、Nature、365:113(1993))。C-ペプチドのDP178(T-20とも呼ばれる)を用いた第I相臨床試験により、ウイルス量(load)の減少をもたらす抗ウイルス活性をインビボで有していることが示される(M. Saag他、アメリカ伝染病学会第35年会(San Francisco、CA、1997年9月16日)で発表された抄録#771; Kilby, J. M. 他、Nature Med.、4:1302~1307(1998))。gp41コアの構造的特徴に基づいて、これらのペプチドは、外因性のC-ペプチドがgp41の中心に位置する超らせんに結合して、その不活性化をもたらす優性ネガティブ機構によ

つて作用していることが考えられている (D. C. Chan および P. S. Kim, Cell, 93: 681 (1998); R. A. Furuta 他, Nat. Struct. Biol., 5: 276 (1998); D. C. Chan, D. Fass, J. M. Berger, P. S. Kim, Cell, 89: 263 (1997), W. Weissenhorn, A. Dessen, S. C. Harrison, J. J. Skehel, D. C. Wiley, Nature, 387: 426 (1997); K. Tan, J. Liu, J. Wang, S. Shen, M. Lu, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 94: 12303 (1997), M. Lu, S. C. Blacklow, P. S. Kim, Nat. Struct. Biol., 2: 1075 (1995) ならびに C. H. Chen, T. J. Matthews, C. B. McDanal, D. P. Bolognesi, M. L. Greenberg, J. Virol., 69: 3771 (1995))。これらのペプチドは、本来の gp41 構造〔すなわち、遊離ビリオンの表面に存在する非融合誘導性 (nonfusogenic) 立体配座〕が gp120 / CD4 / コレセプターの相互作用によって乱されるときに形成される gp41 のプレヘアピン中間体に作用することが考えられている。このプレヘアピン中間体は、露出した N - 超らせんを有し、それにより、融合活性なヘアピン構造が形成される前に、C - ペプチドに結合して gp41 を不活性化し得ることが提案されている (D. C. Chan, P. S. Kim, Cell, 93: 681 (1998))。このモデルは、C - ペプチドの DP178 が gp41 に結合することを示す免疫沈降実験によってさらに支持されている (R. A. Furuta, C. T. Wild, Y. Weng, C. D. Weiss, Nat. Struct. Biol., 5: 276 (1998))。さらに、DP178 による阻害を逃れるウイルスには、gp41 の中心に位置する超らせん領域における変異が明らかにされている (L. T. Rinsky, D. C. Shugars, T. J. Matthews, J. Virol., 72: 986 (1998))。

【0029】

gp41 の近年の結晶学的研究により、C - ペプチドと対照的に経口投与される可能性を有する小分子のペプチド模倣薬物の開発が容易になっている。超らせんのそれぞれの境界には、N - ヘリックスの超らせん内の残基のクラスターによって形成され、抗ウイルス化合物を開発するための興味深い標的である深いくぼみが存在する。C - ヘリックスの 3 つの残基 (Trp⁶²⁸、Trp⁶³¹ および Ile⁶³⁵) がこのくぼみに進入して、広範囲の疎水性接触が形成される。変異分析により、このくぼみを構成する N - ヘリックス残基の 2 つ (Leu⁵⁶⁸ および Trp⁵⁷¹) が膜融合活性に極めて重要であることが示されている (J. Cao 他, J. Virol., 67: 2747 (1993))。従って、このくぼみに対して大きな親和力で結合して、N - ヘリックスおよび C - ヘリックスの正常な対形成を妨げる化合物は効果的な HIV - 1 インヒビターになることが十分に考えられる。さらに、このくぼみ内の残基は様々な HIV - 1 単離体において高度に保存されている。構造が高度に保存されているために、この部位を標的とする薬物は、様々な HIV - 1 単離体に対して、そしておそらくは HIV - 2 単離体に対して広い活性を有する。

【0030】

この仮説は注目されているが、今まで、このようなくぼみの接触が C34 インヒビターの効力に重要であることは明らかにされていない。実際、くぼみに結合する残基を有しない C - ペプチドのいくつか (DP178 (C. T. Wild, D. C. Shugars, T. K. Greenwell, C. B. McDanal, T. J. Matthews, 同上, 91: 9770 (1994); Killby, J. M. 他, Nature Med., 4: 1302 (1998)) など) は、HIV - 1 膜融合の非常に効果的なインヒビターである。このようなことにより、C - ペプチドの活性決定基を同定するために体系的な構造 - 機能分析が必要であることが強く唱えられている。

【0031】

阻害活性におけるくぼみ接触の役割を明らかにするために、構造に基づく変異誘発を C34 において行った。gp41 エクトドメインのコア (図 1) を、N36 および C34 と呼

10

20

30

40

50

ばれる2つの合成ペプチドを用いて再構成した〔M. Lu、P. S. Kim、J. Bio mol. Struct. Dyn.、15:465(1997)、D. C. Chan、D. Fass、J. M. Berger、P. S. Kim、Cell、89:263(1997)〕。1個のアラニン置換を有するC34ペプチドのバリエント(variants)を合成して、変異型(mutant)N36/C34複合体のらせん含有量および熱安定性を円二色性により定量した。予想されるように、N36の超らせんと接触しないC34残基(Met⁶²⁹、Arg⁶³³)の変異は、222nmにおける平均残基構円率(らせん含有量の大きさ)またはN36/C36複合体の安定性に対してほとんど影響しなかった(表1)。しかし、N36の超らせんくぼみに突き出る3残基の変異(Trp⁶²⁸ Ala、Trp⁶³¹ AlaまたはIle⁶³⁵ Ala)は、平均構円率および安定性が実質的に低下したN36/C34複合体をもたらした(表1)。最も大きな不安定化が、野生型の66と比較して、37の見かけの融解温度(T_m)を有するN36/C34複合体が形成されたTrp⁶³¹ Alaのバリエントで認められた。これらの結果は、N36の超らせんくぼみとの疎水性接触を形成するC34の残基がgp41エクトドメインコアのらせん-ヘアピン構造の安定化に重要であることを示している。

【0032】

膜融合を阻害するC34の能力におけるこれらの残基の重要性を明らかにするために、C34ペプチドの活性をHIV-1のウイルス侵入アッセイおよびシンシチウムアッセイで調べた(表1)。N36/C34複合体の安定性に対してほとんど影響しない変異(Met⁶²⁹ AlaおよびArg⁶³³ Ala)はまた、野生型C34の阻害活性に対してほとんど影響しなかった(ウイルス侵入およびシンシチウム形成に対するIC₅₀は、それぞれ、約2.1nMおよび約0.55nMであった)。しかし、完全に保存されているTrp⁶²⁸またはTrp⁶³¹のアラニンへの変異は、活性を、それぞれ、約5分の1および約30分の1に実質的に低下させた(表1)。あまりよく保存されていないIle⁶³⁵の変異は、阻害活性を約2分の1に低下させただけであった。これらの結果により、gp41のポケットと接触するC34の残基がC34の阻害能にとって重要であることが初めて明らかにされた。

【0033】

変異型C34ペプチドの効力と変異型N36/C34複合体の安定性との関係が、Trp⁶³¹変異の大きな不安定化作用を利用して、安定性が徐々に変化した一連のN36/C34複合体を構築することによって明らかにされた。Trp⁶³¹の位置を「ゲスト部位」として使用し、このトリプトファンを、広範囲の疎水性原子団(bulk)を示す天然アミノ酸および非天然アミノ酸で置換した。疎水性原子団が大きくなる順に、下記の置換体を使用した:グリシン(Gly)、アラニン(Ala)、L-アミノ酪酸(Abu)、バリン(Val)、ロイシン(Leu)、フェニルアラニン(Phe)、野生型残基のトリプトファン(Trp)、およびL-(1-ナフチル)アラニン(Nal)。この方法により、T_mが37~66の範囲にあるN36/C34複合体を形成する一組のC34ペプチドが得られた。N36/C34バリエントに対するT_mおよび[]₂₂₂(10³deg cm² dmol⁻¹)(ならびに、ウイルス侵入および細胞融合のIC₅₀値(ナノモル濃度)をそれぞれ括弧内に示す)は下記の通りである:Trp⁶³¹ Gly、35、17.1(38±6.1、25±3.8);Trp⁶³¹ Ala、37、-24.9(40±4.3、15±0.8);Trp⁶³¹ Abu、43、-23.2(16±4.8、6.9±0.4);Trp⁶³¹ Val、43、-23.9(13±2.8、4.5±0.09);Trp⁶³¹ Leu、50、-26.7(5.3±1.0、3.2±0.1);Trp⁶³¹ Phe、59、-26.3(3.6±0.8、1.6±0.05);野生型、66、-31.7(1.5±0.2、0.55±0.03);Trp⁶³¹ Nal、62、-32.0(1.4±0.3、0.79±0.08)。Trp⁶³¹ Nalペプチドの濃度は、282nmでのε=6900の吸光係数を使用してNalの吸収によって求めた(J. Blake、C. H. Li、J. Med. Chem.、18:423~426(1975))。HIV-1の感染アッセイおよびシンシチウムアッセイ

10

20

30

40

50

において、この一連のペプチドは、対応するN36/C34複合体のT_mと非常に相関する効力を示した(図2)。これらのバリアントの効力の大きさは、野生型～Nal>Ph>Leu>Val～Abu>Ala～Glyであり、置換体の疎水性原子団およびN36/C34複合体の安定性とよく一致している。T_mの関数としてIC₅₀を対数スケールでプロットした場合、驚くほどの一次の関係が存在する(図2)。

$G = -RT \ln K$ (G、自由エネルギーの変化；R、気体定数；T、絶対温度；およびK、平衡定数)、およびT_m(T_m、野生型複合体-T_m、変異型複合体)は(G)(G野生型複合体-G変異型複合体)に比例する(W. J. Becktel, J. A. Scheelmann, Biopolymers, 26: 1859 (1987))ため、認められた一次の関係により、阻害の優性ネガティブモードによって推定されるように、C34バリアントの効力はN-ヘリックス超らせんに対するその親和力と直接関連していることが強く示唆される。これらの結果は、gp41コアにおける超らせんのくぼみが薬物の興味深い標的であるという考えを強く支持している。疎水性のくぼみに突き出ている保存された残基が、HIV-1感染を妨げるC34の能力における主要な役割を果たしていることは明らかである。このことは、このインヒビターが、N-ヘリックスの超らせんと大きな親和性複合体を形成することによって作用していることを示している。従来のペプチドを超えて、鏡像ファージディスプレー技術(T. N. Schumacher他、Science, 271: 1854 (1996))、選択-反射アプタマー技術(K. P. Williams他、PNAS, 94: 11285 (1997); S. Klumann他、Nat. Biotech., 4: 1112 (1996); A. Nolte他、Nat. Biotech., 14: 1116 (1996))、コンビナトリアルケミストリー(A. Borchardt, S. D. Liberles, S. R. Biggar, G. R. Crabtree, S. L. Schreiber, Chem. Biol., 4: 961 (1997); J. C. Chabalala, Curr. Opin. Biotechnol., 6: 632 (1995))、および構造に基づく薬物設計におけるコンピューター法(H. Kubinyi, Curr. Opin. Drug Discov. Develop., 1: 16 (1998))を使用して、超らせんのくぼみに対して大きな親和力で結合するD-ペプチド、ペプチド擬似物および小分子を同定することができる。N36/C34安定性とC34阻害能との密接な相関により、そのような化合物の有効性がそれらのくぼみ接触の強さに極めて依存していることが示唆される。これらの結果は、候補化合物を、N36との安定な複合体を形成する能力について調べることができ、それによって、HIV-1侵入の潜在的なインヒビターを同定して評価するための迅速で定量的なスクリーニングに関する基礎が提供され得ることを示唆している。

【0034】

中心に位置する超らせんのくぼみに対する小分子のインヒビターは、HIV-1エンベロープタンパク質の最も高度に保存された領域の1つを標的とする。SIV gp41コアにおける類似したくぼみは、側鎖の立体配座が保存されている本質的には同一の構造を有する(V. N. Malashkevich, D. C. Chan, C. T. Chutkowski, P. S. Kim, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 9134 (1998))。この高い構造的保存の程度により、実験室で使用されている株ならびに一次単離体に対して効果的なC-ペプチドの広範囲の中和活性が説明される(C. T. Wild, D. C. Shugars, T. K. Greenwell, C. B. McDanal, T. J. Matthews, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 9770 (1994); S. Jiang, K. Lin, N. Strick, A. R. Neurath, Nature, 365: 113 (1993))。注目されることに、SIV C34ペプチドは、HIV-1感染の阻害においてHIV-1 C34とほぼ同じくらい効果的である(V. N. Malashkevich, D. C. Chan, C. T. Chutkowski, P. S. Kim, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 9134 (1998))。さらに、くぼみに結合する領域を含有するC-ペプチド(T649)は、耐性ウイルスの進化に対して、この領域を有しないDP178(

10

20

30

40

50

T - 20とも呼ばれる)よりもはるかに低い感受性を有している (L. T. Rimsky、D. C. Shugars、T. J. Matthews、J. Virol.、72: 986 (1998)。これらの観察から、超らせんの表面、特に、そのくぼみを標的とする高親和性リガンドは、(HIV-2を含む)様々なHIV単離体に対する広範な活性を有し、かつ薬物から逃れるバリエントによって回避される可能性がほとんどないことが明らかである。

【0035】

C - ペプチドの作用機構に関するこれらの研究はまた、gp41コアの三量体ヘアピン構造 (Chan, D. C. 他、Cell、89: 263 (1997); Weissenhorn, W. 他、Nature、387: 426 (1997); Tan, K. 他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、94: 12303 (1997)) がgp41の融合活性状態に対応しているという仮説を支持している。本明細書に記載されている研究により、C34の阻害能はgp41のN - 超らせんに結合するその能力に依存することが明らかにされている。gp41のヘアピン構造は(90 を超える融解温度を有して)極めて安定するために (Lu, M. 他、Nat. Struct. Biol. 2: 1075 (1995))、特に、変化を受けていないgp41分子内において非常に効果的な濃度のN - ヘリックスおよびC - ヘリックスが提供されたときに、この構造が一旦形成されると、ナノモル濃度のC34によって、この構造が破壊され得ることは考えられない。むしろ、C - ペプチドは、中心に位置する超らせんが露出した一次的なプレ - ヘアピン中間体に結合することによって、gp41のヘアピンが形成される前に作用していると考えられる。C - ペプチドがこのプレ - ヘアピン中間体に結合することによって、gp41は不活性化され、融合活性なヘアピン構造へのその変換が妨げられる (D. C. Chan、P. S. Kim、Cell、93: 681 (1998))。

【0036】

本明細書中に記載されているように、HIV - 1エンベロープタンパク質のgp41サブユニットのN - ヘリックス超らせんの表面にあるポケットは薬物の標的である。同様に、AIDSを引き起こし得る他の病原体 (例えば、HIV - 2) またはAIDS様状態を非ヒト哺乳動物において引き起こす病原体 (例えば、SIV) におけるくぼみもまた薬物の標的である。本明細書中に記載されているように、利用可能な方法 (例えば、鏡像ファージディスプレイ法、コンビナトリアルケミストリー、コンピューター法、ならびに他の薬物スクリーニング法および医化学的方法) を使用して、ウイルスの細胞内侵入を妨げ、従って、ウイルス感染を妨げるのに十分な親和性で、HIV - 1 (および/またはHIV - 2) の超らせんくぼみを結合するペプチド、D - ペプチド、ペプチド擬似物および小分子を同定することができる。本明細書中 (実施例3) にさらに記載されているように、鏡像ファージディスプレイが、HIV - 1 gp41のN - ヘリックス超らせんの表面におけるくぼみに結合するD - ペプチドを同定するために使用されている。

【0037】

本明細書中に記載されている研究の結果として、C34 / N36複合体の形成を妨げ、かつ/または一旦形成された複合体を破壊する分子または化合物 (薬剤または薬物) を同定するスクリーニングアッセイが行うことができ、それは、HIV gp41のN - ヘリックス超らせんのポケットを結合する分子または化合物 (薬剤または薬物) を同定する方法である。そのような薬物または薬剤は、HIVの細胞内侵入、従って、HIVによる感染を (完全または部分的に) 阻害するのに有用である。

【0038】

C34とN36との安定な複合体の形成を妨げ、あるいはこの2つの分子における複合体を破壊する化合物または分子 (薬物または薬剤とも呼ばれる) に関するスクリーニング法、およびHIV gp41のN - ヘリックス超らせんのポケットを結合する化合物または分子に関するスクリーニング法は本発明の主題である。

【0039】

本発明のスクリーニング法の1つの実施形態において、C34ペプチドとN36ペプチド

10

20

30

40

50

との複合体の形成を妨げる薬物が、C 3 4 と N 3 6 との複合体を形成させるために適切な条件のもとで、候補薬物（C 3 4 と N 3 6 との複合体の形成を妨げるその能力のアッセイ対象の化合物または分子）を C 3 4 および N 3 6 と合わせて、そして、被検試料を形成し、その後、C 3 4 / N 3 6 複合体の形成が被検試料中で（部分的または完全に）阻害されているかどうかを測定することによって同定される。この評価の結果は、候補薬物が存在しないことを除いて被検試料と同じ組み合わせである適切な対照の結果と比較することができる；このとき、対照は、被検試料が供されるのと同じ条件に供される。C 3 4 / N 3 6 複合体が、（被検試料中において）候補薬物の存在下で形成されず、あるいはその非存在下でより小さい程度で形成される場合、その候補薬物は、C 3 4 と N 3 6 との安定な複合体の形成を妨げる薬物である。そのような薬物はまた、本明細書中では C 3 4 / N 3 6 複合体形成のインヒビターとして示されている。複合体形成の阻害は、C 3 4 および N 3 6 のそれぞれが一対のドナー - アクセプター分子のメンバー（member）によって標識されているか、あるいは、一方のペプチドの一端（例えば、C 3 4 の N 末端）がそのような対の一方の成分（E D A N S）で標識され、N 3 6 ペプチドに存在する天然の蛍光性トリプトファンがそのようなドナー / アクセプター対のもう一方の成分である蛍光アッセイ（例えば、F R E T）などの手段によって、複合体のこの 2 成分の結合が生じる程度を測定することによって評価することができる。C 3 4 および N 3 6 の結合は、発光（F R E T）がアクセプターモデルから生じる程度、および / または放出された光の波長スペクトルが変化する程度によって評価される。候補薬物が結合を妨げることによって、光を発する程度が変化し、かつ / または C 3 4 と N 3 6 の結合が生じた場合に生じるであろう波長の変化が妨げられる。あるいは、C 3 4 は、（例えば、キナーゼおよび放射活性 A T P を用いて標識され得るキナーゼ認識部位を有する変異型 C 3 4 を合成することによって）放射性標識などの検出可能な標識で標識することができる。放射性標識された C 3 4 および候補薬剤は、例えば、固体表面（例えば、ビーズまたはプラスチックウェル）に固定化された N 3 6 と合わせられ、そして被検試料が作製される。標識された C 3 4 と固定化 N 3 6 との結合が生じる程度が測定され、そして候補薬物が（対照試料中に）存在しないことを除いて、被検試料が供されるのと同じ条件下において、固定化 N 3 6 に対する標識された C 3 4 の結合が生じる程度と比較される。典型的には、この評価は、試料が、C 3 4 / N 3 6 の結合が生じ、そしてその後、未結合の C 3 4 および候補薬物を除くために洗浄されるのに適切な条件下で十分な時間にわたって保持された後に行われる。被検試料において固定化 N 3 6 に結合した放射性標識が対照試料の場合よりも少ないとによって明らかにされるように、結合が、被検試料において、対照試料の場合よりも小さい程度で生じた場合、その候補薬物は C 3 4 と N 3 6 の結合のインヒビターである。あるいは、C 3 4 における標識またはタグを結合形成対の一方の成分とすることができる、そのもう一方の成分が、N 3 6 に対する結合を検出するために使用される。例えば、C 3 4 は、（例えば、標準的な固相ペプチド合成によって）ビオチンで標識（tagged）することができ、そして溶液状態であり得るか、あるいはビーズ、ウェルまたは平坦 / 平面の表面などの固体表面に結合させることができるとされる N 3 6 と、候補薬物とともに合わせることができ（被検試料）、あるいは候補薬物または非存在下で合わせることができる（対照試料）。N 3 6 に対する C 3 4 の結合は、C 3 4 におけるビオチンに結合し、その後、その標識によりそれ自体が検出される標識された streptavidin（例えば、streptavidin - H R P、streptavidin - A P、またはヨウ素化streptavidin）の使用などによって N 3 6 と結合したビオチンの存在を検出することによって評価される。被検試料において N 3 6 で検出されるビオチンが対照試料の場合よりも少ないとによって明らかにされるように、結合が、候補薬物の存在下（被検試料の場合）において、候補薬物の非存在下（対照試料の場合）よりも小さい程度で生じる場合、その候補薬物は C 3 4 / N 3 6 の結合のインヒビターである。そのような候補薬物は、例えば、合成された有機化合物またはランダムなペプチド配列のライブラリーから得ることができる。そのようなライブラリーは、合成的あるいは組換え技術によって作製することができる。

類似する様式で、C 3 4 / N 3 6 の結合を破壊する候補薬物の能力を評価して、C 3 4 / N 3 6 のインヒビター、従って、H I V 感染のインヒビターを同定することができる。この実施形態において、事前に形成されたC 3 4 / N 3 6 複合体が、該複合体を破壊するその能力の評価対象の候補薬物と合わされ、そうして被検試料が作製される。対照試料は、対照試料が候補薬物を含有しないことを除いて被検試料と同じである；対照試料は、被検試料と同じように処理される。C 3 4 / N 3 6 の結合が候補薬物の存在下で破壊され、対照試料中で破壊されない場合、あるいは複合体の破壊が、被検試料において、対照試料の場合よりも大きな程度で生じる場合、その候補薬物はC 3 4 / N 3 6 のインヒビター（破壊剤）である。結合破壊の検出は、（例えば、F R E T または蛍光アッセイによって、あるいは放射性標識またはビオチンなどの他の検出可能な標識を検出することによって）C 3 4 / N 3 6 結合の防止の／妨害の検出に関して上記に記載されているように行うことができる。
10

【 0 0 4 1 】

本明細書中に記載されている結果は、ハイブリッド（すなわち、融合タンパク質）がタンパク質（G C N 4 など）の三量体状のコイルドコイル領域とH I V g p 4 1 のN - ヘリックスコイルドコイルとの間で形成され得ること、およびそのようなハイブリッドが三量体であり（すなわち、凝集しておらず）、100%のらせん状であることを明らかにしている。本明細書中に記載されている結果はまた、そのような融合タンパク質はN - ペプチドの大きなくぼみ（すなわち、疎水性ポケット）の構造を破壊または変化しないことを明確に示している。これは、I Q N 1 7（リガンドを含まず、D 1 0 p e p 1との複合体状態；実施例5を参照のこと）において、本質的にはN 3 6 の場合（すなわち、C 3 4 との複合体状態；C h a n D . C . 他、C e l l 1 、8 9 , 2 6 3 (1 9 9 7) ）と同じである。
20

【 0 0 4 2 】

図5 A、図5 Bおよび図6は、本明細書中に記載されているペプチドの評価結果を示している。図5 A ~ 5 Bにおいて、I Q N 1 7 の結晶構造が、3つの鎖からなる連続したコイルドコイルであることが明らかにされている；H I V g p 4 1 に由来する17残基により、g p 4 1 の結晶構造において見出された疎水性ポケットと非常に類似した疎水性ポケットが形成されている。示されているように、D 1 0 p e p 1 はこのポケットに結合し、そして本明細書中に記載されているD - ペプチドインヒビターのすべてに見出されている保存された残基（ロイシン、トリプトファン、トリプトファン）に対応するD 1 0 p e p 1 の残基がこのポケットに詰め込まれる。明らかに、このことは、これらの保存された残基を含む他のD - ペプチドインヒビターが同じようにI Q N 1 7 に結合するであろうことを示している。図6には、C h a n 他（C h a n , D . C . 他、P r o c . N a t 1 . A c a d . S c i . 、9 5 : 1 5 6 1 3 ~ 1 5 6 1 7 (1 9 9 8) ）によって記載された方法に従って行われたシンシチウムアッセイの結果が示されている。図6にその結果が示されている実験では、本明細書中の記載に従って同定されたD - ペプチドが使用された。それぞれの場合において、プロック基（例えば、アセチル基）がそのN末端に存在し、C O N H₂（アミド）がそのC末端に存在した。これらのアッセイの結果は様々なI C₅₀濃度を示した。この場合、I C₅₀は、ペプチドを含まない対照と比較して、半数のシンシチウムが認められる濃度である。例えば、N末端に2個のリジンを有するD 1 0 p e p 5 は約6 μMのI C₅₀を有している。
30

【 0 0 4 3 】

別の実施形態において、本発明は、H I V g p 4 1 のN - ヘリックスコイルドコイルくぼみを結合する薬物を同定する方法に関する。この場合、さらに、そのアッセイは、上記に記載されているC 3 4 / N 3 6 複合体アッセイとは異なり、結合の喪失または低下を評価することに基づいている。これは、このアッセイが、H I V g p 4 1 のN - ヘリックス領域によって形成される溝の任意の部分との相互作用を含み、あるいはそのような相互作用を検出する点でより一般的なアッセイであり、この実施形態は、H I V g p 4 1 の疎水性ポケット（N - ヘリックスコイルドコイルくぼみ）に注目している。この実施形態
40

において、この方法は、HIV-gp41のN-ヘリックスコイルドコイルのくぼみに結合するその能力についての評価対象の候補薬物を、タンパク質のコイルドコイル領域の三量体型、およびHIV-gp41のくぼみを含むのに充分な部分のHIV-gp41のN-ペプチドを含む融合タンパク質と、ペプチドまたは他の分子による結合のためにHIV-gp41が提示されるのに適切な条件のもとで合わせる工程、および、候補薬物がその融合タンパク質を結合するかどうかを（例えば、高処理能スクリーニングで）測定する工程を含む。結合が生じる場合、その候補薬物は、HIV-gp41のN-ヘリックスコイルドコイルのくぼみを結合する薬物であり得る「当たり(hit)」である。結合が生じる場合、その候補薬物は、N-ヘリックスのコイルドコイルに結合しており、それがコイルドコイルのくぼみに結合しているかどうかを明らかにできる。その後、そのような「当たり」は、その候補薬物が薬物になるかどうかを決定するために、細胞/細胞融合アッセイおよびHIV感染力アッセイなどの二次アッセイでスクリーニングされ得る。あるいは、さらに、そのような「当たり」は、ポケット結合分子が結合しない他の融合タンパク質（またはペプチド）を用いた対抗スクリーニングの使用によってさらに評価することができる。例えば、（IQN17の場合と同じ3つの表面変異を有する）GCN4-pIQ₁、または疎水性ポケットにおける点変異を有するIQN17の一形態であるIQN17(G39W)（これは、グリシン39が、ポケットへの大きな突出をもたらすトリプトファンに変異している）を対抗スクリーニングにおいて使用することができる。この例において、IQN17には結合するが、（IQN17の場合と同じ3つの表面変異を有する）GCN4-pIQ₁またはIQN17(G39W)には結合しない候補薬物が、HIV-gp41のN-ヘリックスコイルドコイルのくぼみを結合する薬物である。
10

【0044】

さらなる実施形態において、競合的アッセイが行われる。この実施形態において、HIV-gp41のN-ヘリックスコイルドコイルのくぼみを結合するペプチドまたはタンパク質が、候補薬物および融合タンパク質と合わされ、その後、候補薬物がHIV-gp41のくぼみを結合するかどうかが、HIV-gp41のN-ヘリックスのらせん状くぼみを結合するペプチドの存在下で測定される。候補薬物が融合タンパク質を結合する場合、その候補薬物は、HIV-gp41のくぼみを結合する薬物である。例えば、GCN4の、三量体状のコイルドコイル領域と、N-ヘリックスコイルドコイルのくぼみを含むHIV-gp41のN-ペプチドのC末端とを含む融合タンパク質（IQN17）が、N-ヘリックスコイルドコイルのくぼみを結合する「参照」D-ペプチド（例えば、本明細書中に記載されているD-ペプチドのいずれかまたはその変異体）、およびHIV-gp41のN-ヘリックスコイルドコイルのくぼみを結合するその能力についての評価対象の候補薬物と合わされ、そして被検試料が作製される。その後、被検試料は、くぼみに結合するD-ペプチドの結合に関して適切な条件のもとで維持される。候補薬物を除いて被検試料と同じ成分を含み、かつ被検試料と同じように扱われる対照試料もまた評価される。両方の試料において、参照D-ペプチドの結合が評価される。参照D-ペプチドの結合が、候補薬物の存在下（被検試料の場合）において、その非存在下の場合（対照試料の場合）よりも小さい程度で生じる場合、その候補薬物は、HIV-gp41のN-ヘリックスコイルドコイルのくぼみを結合する薬物である。結合の検出は、例えば、本発明のC34/N36の実施形態に関して上記に記載されているような類似した方法で評価される。例えば、D-ペプチドは、放射性標識または結合形成対の一方の成分（例えば、ビオチン）などの検出可能な標識で標識され、その後、（参照D-ペプチドがくぼみに結合するのに適切な条件のもとで被検試料が保持された後において）N-ヘリックスコイルドコイルのくぼみが有する標識の程度が測定される。放射性標識が使用される場合、融合タンパク質が放射性標識を有する程度が被検試料において評価され、そして対照試料において融合タンパク質が放射性標識を有する程度と比較される。検出可能な標識が結合形成対の一方の成分（例えば、ビオチン）である場合、融合タンパク質が結合する程度を参照D-ペプチドにより検出するために、その結合形成対の第2成分（結合パートナー）が試料に加えられる。これは、直接的に、あるいは（例えば、結合形成対の第2成分に結合する抗体または他
20
30
40
50

の成分などの分子を加えることによって)間接的に行うことができる。候補薬物がくぼみに対するD-ペプチドの結合を(完全または部分的に)阻害する場合、標識は、融合タンパク質(N-ヘリックスコイルドコイルのくぼみ)にはほとんど存在していない。結合が、被検試料の場合(候補薬物の存在下)において、対照試料の場合(候補薬物の非存在下の場合)よりも小さい程度で生じた場合、その候補薬物は、HIV g p 4 1のN-ヘリックスコイルドコイルのくぼみを結合する薬物である。

【0045】

D-エナンチオマーのIQN17またはその変異体は、ライプラリーまたはコレクションの成分であり、かつg p 4 1のN-ヘリックスコイルドコイルを結合する分子または化合物を同定するために有用である。例えば、ファージディスプレイライプラリーなどの分子または化合物のライプラリーまたはコレクションは、ポケットを結合する成分を同定するために、D-エナンチオマーのIQN17を用いてスクリーニングすることができる。これは、本明細書中に記載されているように問題なく行われている。IQN17の鏡像体またはその変異体は、標的分子として使用される。本明細書中で使用されている用語である「ポリペプチドのD-エナンチオマー」および「D-ペプチド」は、天然の掌体にある分子の完全な鏡像体をいう。従って、第2のキラル中心を含有するアミノ酸残基(IleおよびThrなど)の場合、天然に存在するアミノ酸残基の完全な鏡像体が、ポリペプチドのD体を作製するために使用される。本明細書中で同様に使用されている用語の「D-アミノ酸」および「L-アミノ酸」はともに、非キラルなアミノ酸であるグリシンを含むことを意味する。D-IQN17は、結合形成対の一方の成分(例えば、ビオチン)をそれに付加し、そしてその結合形成対のもう一方の成分(例えば、ストレプトアビシン)を固体表面に付加することなどによって固体表面に固定化することができる。この2成分が結合することにより、ファージパンニングなどのためにD-IQN17が固体表面に固定化される。酵素の認識部位であるリンカー(例えば、L-リジン残基が使用されるGly-Lys-Glyなどのアミノ酸リンカー)を、酵素の認識部位(この場合、トリプシンの認識部位)を提供するためにD-IQN17配列と結合形成対成分との間(ビオチンとD-IQN17との間)に設置することができ、その結果、結合したファージを、酸の添加などの非特異的な溶出よりはむしろ、トリプシン消化によって溶出することができる。ファージディスプレイライプラリーは、適切なファージ遺伝子に融合させた任意の適切な長さのL-アミノ酸ペプチドのライプラリーであり得る。1つの実施形態において、そのようなライプラリーは、M13ファージのgIII遺伝子に融合させたL-アミノ酸ペプチドのファージディスプレイライプラリーである。ペプチドは、1つの実施形態において、両端にシステインまたはセリンのいずれかが隣接した10個のランダムにコードされたアミノ酸残基を含む。典型的には、数回のパンニングが行われる。D-IQN17に特異的に結合するファージが同定される。D-IQN17のg p 4 1領域のみを結合するファージを、パンニング後の評価によって、例えば、抗原を有しないウエルに対してスクリーニングを行い、その後、一連の分子に対してさらに試験することによって同定することができる。例えば、特異的なポケット結合性ファージには、D-IQN17を結合するが、(IQN17の場合と同じ3つの表面変異を有する)D-GCN4-pI_QI、または疎水性ポケットにおける点変異を有するD-IQN17の形態であるD-IQN17(G39W)(これは、グリシン39が、ポケットへの大きな突出をもたらすトリプトファンに変異している)には結合しないファージが含まれる。このような方法で同定されたD-ペプチドは、細胞/細胞融合アッセイおよびHIV感染力アッセイなどの知られているアッセイを使用して、HIV g p 4 1を阻害するその能力について評価することができる。本明細書中に記載されている鏡像ファージディスプレイ法により、IQN17およびIQN17(G39W)ならびにそれらのD-エナンチオマーの価値が、g p 4 1ポケットを結合するHIV-1侵入のインヒビターを同定する際に明らかにされた。同定された9個の特異的なポケット結合性ファージ配列(D-IQN17(G39W)にではなく、D-IQN17に結合するファージ)のうち、8個はEWXWLのコンセンサス配列を含有し、D-ペプチドとして試験されたときにHIV-1 g p 4 1により誘導されるシンシチウ

10

20

30

40

50

ム形成を阻害する。9番目のペプチドは細胞に対して毒性を有していたために、それ以上は調べなかつた。

【0046】

D-IQN17およびD-IQN17(G39W)のD体は、天然酵素による酵素的分解を受けない他のポケット結合分子を発見するために、他の生物学的にコードされるライブラリーを用いた類似する方法において使用することができる。例えば、他のファージディスプレイライブラリーを使用して、(例えば、両側に位置するCys残基間に異なる数の残基を有し、かつ/またはシステイン残基が両側に位置する領域の外側にランダムにコードされたアミノ酸残基を有し、かつ/または3つ以上のシステイン残基を有する)新しいD-ペプチドインヒビターを同定することができる。ファージを用いることなくペプチドライブラリーをコードする方法(例えば、この場合、コードするmRNAがペプチドに結合する)を、D-ペプチドインヒビターを同定するために使用することができる。RNAライブラリーまたはDNAライブラリーを(例えば、SLEX法とともに)使用して、疎水性ポケットには結合するが、天然のヌクレアーゼに対する基質ではないL-リボースまたはL-デオキシリボースに基づくRNAアプタマーまたはDNAアプタマーをそれぞれ同定することができる(例えば、Williams他、PNAS、74:11285(1997))。

10

【0047】

天然のL掌体にあるIQN17およびIQN17(G39W)の形態もまた、生物学的にコードされたライブラリーを用いた類似する方法において使用することはできるが、最も可能性のある適用は、他の非生物学的にコードされたライブラリーとの使用であろう。例えば、(1ビーズに1化合物の多様性を有する)ビーズにおける化学的なコンビナトリアルライブラリーを、(例えば、放射性または発色基により)標識されたIQN17を用いてスクリーニングして、IQN17に結合する分子を含有するビーズを同定することができる。この例において、IQN17(G39W)を、そのようなビーズにおける分子がIQN17のポケットに結合するかどうかを明らかにするための対抗スクリーニングとして使用することができる(分子がIQN17(G39W)に結合した場合、それらはポケット結合分子であるとは考えられない)。別の例として、IQN17が前もって結合しているビーズを、潜在的なポケット結合分子の混合物(例えば、化学物質または天然産物抽出物の混合物)とインキュベーションすることができる。その後、(ビーズに結合している)IQN17を混合物から分離し、洗浄し、次いで、ビーズ上のIQN17に結合している分子を溶出させる条件(例えば、有機溶媒、低いpH、高い温度)に供することができる。溶出された分子(すなわち、潜在的なポケット結合分子)を分析化学的方法(例えば、HPLC、質量分析法)によって同定することができよう。IQN17(G39W)を用いた対抗スクリーニングは、真のポケット結合分子を同定することを助けるために有用である。

20

【0048】

上記に記載されている方法によって同定された薬物は、その後、HIVgp41の機能(膜融合)、従って、細胞内への侵入を(完全または部分的に)阻害するその能力についてさらに試験される。これは、本明細書中に記載されているシンシチウムアッセイおよび/または感染力アッセイあるいは当業者に知られている他のアッセイなどのインビトロアッセイ、および/または適切な動物モデルもしくはヒトにおけるインビトロアッセイをさらに使用して行われる。

30

【0049】

本発明の1つの実施形態は、HIVgp41のN-ヘリックスコイルドコイルに結合する薬物、特に、N-ヘリックスコイルドコイルポケットを結合する薬物を同定する方法である。この方法は、HIVgp41のN-ヘリックスコイルドコイルポケットを結合するその能力についての評価対象の候補薬物と、可溶性三量体のコイルドコイル、およびHIVgp41ポケットを含むのに充分な部分のHIVgp41のN-ペプチドを含むペプチドとを、分子または化合物(例えば、薬物)による結合に関してHIVgp41

40

50

ポケットが提示されるのに適切な条件のもとで合わせる工程、および、その候補薬物がH I V g p 4 1ポケットを結合するかどうかを測定する工程を含む。候補薬物とH I V g p 4 1ポケットとの結合が生じた場合、その候補薬物は、H I V g p 4 1のN - ヘリックスコイルドコイルのポケットを結合する薬物である。所望により、候補薬物の結合は、N - ヘリックスコイルドコイルポケットを結合するペプチド（ポケットを結合するペプチドとして以前に同定されたペプチド）が候補薬物およびそのペプチドが合わされることを除いて、上記に記載されているアッセイで評価することができる。このような競合的アッセイにおいて、N - ヘリックスコイルドコイルのポケットに対する候補薬物の結合が、既知の結合性成分（moiety）（ポケットを結合する分子または化合物）の存在下で評価される。候補薬物の結合がその既知の結合性成分の存在下で生じた場合、その候補薬物は、既知の結合性成分と充分に競合する充分な親和性でN - ヘリックスコイルドコイルのポケットを結合する薬物である。この実施形態において使用される融合タンパク質は、可溶性三量体状のコイルドコイル、例えば、タンパク質の、可溶性三量体状のコイルドコイル領域（例えば、G C N 4 またはG C N 4 - p I_Q Iのタンパク質などの非H I Vタンパク質、しかし、H I Vタンパク質を使用することができる）と、H I V g p 4 1のくぼみを含むのに充分な部分のH I V g p 4 1のN - ペプチドとを含む。例えば、この部分は、配列番号：2 0を含むことができ、あるいはくぼみを含むの充分な部分を含むことができ、そして適切な融合タンパク質または他の可溶性モデルにおいて存在する場合に、結合が得られるような方法でくぼみを提示し得る。あるいは、本明細書中に示されているH I V g p 4 1の配列変異体、ヒトウイルスの別の株（例えば、H I V - 2）に由来する配列、または別の種（例えば、S I V、ネコ免疫不全症ウイルス、V i s n aウイルス（M . S i n g h他、J . M o l . B i o l . 、2 9 0 : 1 0 3 1 (1 9 9 9) ）に由来する配列を融合タンパク質または可溶性モデルにおいて使用することができる。融合タンパク質は、それがH I V成分との融合タンパク質である場合、結合が得られるような方法でH I Vのくぼみが提示されるときには、任意のタンパク質の、可溶性三量体状のコイルドコイルを含むことができる。例えば、G C N 4 - p I_Q I、G C N 4 - p I I、モロニーマウス白血病ウイルス（M o - M L V）またはA B Cヘテロ三量体の融合タンパク質であり得る。1つの実施形態において、融合タンパク質はD型のI Q N 1 7である。別の実施形態において、融合タンパク質は天然のL掌体のI Q N 1 7である。

【0050】

30

競合的アッセイ形式において、N - ヘリックスコイルドコイルのくぼみを結合することが知られているペプチドはどれも、知られている結合性成分として使用することができる。例えば、本明細書中に記載されているペプチド（配列番号：3 ~ 1 2、1 5、1 7 ~ 1 9、2 3、2 4）のいずれか、あるいはその変異体またはその一部を使用することができる。また、ペプチドでない任意のポケット結合分子を競合的アッセイ形式において使用することができる。競合的アッセイは、溶液中で、あるいはビーズ上で、あるいは固体表面で行うことができる。

【0051】

1つの実施形態において、候補薬物は検出可能に標識され、そしてH I V g p 4 1のN - ヘリックスコイルドコイルに対する候補薬物の結合が、（標識された候補薬物がN - ヘリックスコイルドコイルに結合する結果として）H I V g p 4 1のN - ヘリックスコイルドコイルにおける検出可能な標識の存在を検出することにより測定される。可溶性モデルのヘリックスコイルドコイルのポケットにおける標識の検出により、候補薬物がN - ヘリックスコイルドコイルのポケットに結合することが示され、そして候補薬物が、N - ヘリックスコイルドコイルのポケットに結合する薬物であることが明らかにされる。標識された候補薬物が融合タンパク質において検出される場合、候補薬物は、N - ヘリックスコイルドコイルのくぼみを結合する薬物である。

【0052】

H I V g p 4 1のN - ヘリックスコイルドコイルのポケットを結合する薬物を同定する方法の別の実施形態において、薬物による結合が得られるような方法でポケットを提示す

40

50

る可溶性モデルが候補薬物と合わされ、そして候補薬物と可溶性モデルのN-ヘリックスコイルドコイルとの結合が生じているかどうかが測定される。結合が生ずる場合、その候補薬物は、ポケットを結合する薬物である。この場合もまた、競合的アッセイ形式を使用することができる。競合アッセイの成分（例えば、IQN17およびD-ペプチド）を、蛍光基／消光基の組み合わせを含む様々な検出可能な標識のいずれかで標識することができる。候補薬物を、上記に記載されているように、様々な検出可能な標識のいずれかで標識することができる。この実施形態において使用される可溶性モデル（融合タンパク質）の成分、および競合的アッセイ形式において使用される競合性成分もまた、上記のようでありうる。

【0053】

本発明はまた、HIV gp 41のN-ヘリックスコイルドコイルのポケットを結合する薬物を製造する方法に関する。1つの実施形態において、この方法は下記のように行われる；HIV gp 41のN-ヘリックスコイルドコイルのポケットを提示する可溶性モデル、あるいは（例えば、GCN4-pIQI、GCN4-pII、Mo-MLV、ABCヘテロ三量体などの非HIVタンパク質またはHIVタンパク質などのタンパク質の）可溶性三量体のコイルドコイルを含む融合タンパク質が、薬物による結合のためにHIV gp 41のポケットが提示されるのに適切な条件のもとで、HIV gp 41のN-ヘリックスコイルドコイルのポケットを結合して、細胞内への侵入を阻害するその能力についての評価対象の候補薬物と合わされる。候補薬物がHIV gp 41のポケットを結合するかどうかが測定される。この場合、HIV gp 41のN-ヘリックスコイルドコイルのポケットに対する候補薬物の結合が生ずる場合、その候補薬物は、HIV gp 41のN-ヘリックスコイルドコイルくぼみを結合する薬物である。この実施形態において、融合タンパク質は、（例えば、GCN4、GCN4-pIQI、GCN4-pII、Mo-MLV、ABCヘテロ三量体の可溶性三量体コイルドコイルなどの非HIVタンパク質またはHIVタンパク質などのタンパク質の）可溶性三量体コイルドコイルと、HIV gp 41のN-ヘリックスコイルドコイルのポケットを含むのに充分な部分のHIV gp 41のN-ペプチド（例えば、配列番号：20のすべてまたは一部、あるいはその変異体または改变体、あるいは別の株または種から得られる配列）とを含む。本明細書中に記載されているIQN17をこの方法において使用することができる；IQN17のDエナンチオマーもまた、（例えば、鏡像ファージ適用において）使用することができる。HIVの細胞内侵入を阻害するために製造された薬物の能力は、本明細書中に記載されているように、例えば、シンシチウムアッセイおよび／または感染力アッセイにおいて評価される。そのような能力は、適切な動物モデルにおいて、あるいはヒトにおいてさらに評価することができる。

【0054】

本発明はまた、HIV gp 41のN-ヘリックスコイルドコイルのポケットを結合する薬物を製造する方法に関する。この方法は：HIV gp 41のN-ヘリックスコイルドコイルポケットの可溶性モデル（例えば、本明細書中に記載されている融合タンパク質、および特に、IQN17またはその変異体）を製造するか、またはそのようなモデルを得る工程；HIV gp 41のN-ヘリックスコイルドコイルのポケットを結合するその能力についての評価対象の候補薬物（分子または化合物）と、HIV gp 41のN-ヘリックスコイルドコイルポケットの可溶性モデルとを合わせる工程、および、候補薬物がHIV gp 41のN-ヘリックスコイルドコイルのポケットを結合するかどうかを測定する工程を含む。候補薬物がHIV gp 41のN-ヘリックスコイルドコイルのポケットを結合する場合、その候補薬物は、HIV gp 41のN-ヘリックスコイルドコイルくぼみを結合する薬物である；結果として、HIV gp 41のN-ヘリックスコイルドコイルくぼみを結合する薬物が製造される。この実施形態において使用される融合タンパク質は、本明細書中に記載されており、例えば、IQN17、IQN17のDエナンチオマー、またはその変異体であり得る。あるいは、HIV gp 41のN-ヘリックスコイルドコイルのポケットを結合して、HIVの細胞内侵入を阻害する薬物は、下記に記載

10

20

30

40

50

される工程を含む方法によって製造することができる：本明細書中に記載されているようにして、HIV gp 41のN-ヘリックスコイルドコイルポケットの可溶性モデルを製造するか、またはそのようなモデルを得る工程；そのような可溶性モデルと、HIV gp 41のN-ヘリックスコイルドコイルのポケットを結合するその能力についての評価対象の候補薬物とを合わせる工程；候補薬物が可溶性モデル（融合タンパク質）のN-ヘリックスコイルドコイルのポケットを結合するかどうかを測定する工程、この場合、結合が生ずる場合、その候補薬物は、HIV gp 41のN-ヘリックスコイルドコイルを結合する薬物である；およびN-ヘリックスコイルドコイルを結合して、HIVの細胞内侵入を阻害する薬物の能力を評価する工程、この場合、薬物がHIVの細胞内侵入を阻害する場合、その薬物は、HIV gp 41のN-ヘリックスコイルドコイルポケットを結合して、HIVの細胞内侵入を阻害する薬物である。HIVの細胞内侵入を阻害するその能力は、（例えば、シンシチウムアッセイ、感染力アッセイにおいて）インピトロで、あるいは（例えば、適切な動物モデルまたはヒトにおいて）インピボで評価することができる。可溶性モデルは、タンパク質の可溶性三量体コイルドコイル（例えば、GCN4-pI_QI）などの可溶性三量体コイルドコイルと、HIV gp 41のポケットを含むのに十分な部分のHIV gp 41のN-ペプチドとを含むペプチドであり得る。

【0055】

本明細書中に記載されている方法ならびに他の方法によって同定または製造される薬物であって、HIV gp 41のN-ヘリックスコイルドコイルを結合して、HIVの細胞内侵入を阻害する薬物もまた本発明の主題である。

【0056】

本明細書中に記載されている方法ならびに他の方法によって同定または製造される薬物であって、HIV gp 41の2つ以上のN-ヘリックスコイルドコイルに結合して、HIVの細胞内侵入を阻害する薬物もまた本発明の主題である。そのような薬物は、阻害の有効性を増大させるために、例えば、適切なリンカー（例えば、アミノ酸残基または他の化学的成分のリンカー）を介して2つ以上のポケット結合分子（薬物）を連結することによって得ることができる。連結されるポケット結合分子は同じであってもよく、異なっていてもよい。本明細書中に記載されている方法または他の方法によって同定または製造される薬物であって、HIV gp 120、CD4、CCR5、CXCR4、またはHIV gp 41の非ポケット領域に結合することに加えて、HIV gp 41のN-ヘリックスコイルドコイルポケットに結合する薬物もまた本発明の主題である。

【0057】

HIV gp 41を阻害する薬物はまた、IQN17と、IQN17によって提示されるN-ヘリックスコイルドコイルのくぼみを結合するD-ペプチドとの複合体のX線結晶構造を参照して、例えば、本明細書中に示されているIQN17とD10 pep1との複合体のX線結晶構造を参照して設計または改善することができる。あるいは、さらに、HIV gp 41を阻害する薬物はまた、本明細書中に示されている遊離のIQN17のX線結晶構造を参照して設計または改善することができる。

【0058】

本明細書中に記載されているようにして同定された化合物および分子（薬物）は、HIVの細胞内侵入を（部分的または完全に）阻害し、従って、未感染個体（ヒト）および感染個体において、（例えば、未感染個体における感染を防止または低減するために、感染個体におけるさらなる感染を低減または予防するために）治療的に有用であり、そして、gp 41により誘導される膜融合の機構を研究するための研究用試薬、および個体によるウイルスクリアランス速度を評価するための研究用試薬の両方として有用であり、そしてHIVの細胞内侵入を阻害する他の化合物および分子（薬物）を発見または開発するための試薬として有用である。本明細書中に記載されているD-ペプチド（例えば、D10 pep5、D10 pep1）は、本明細書中に記載されている感染力アッセイを使用して、細胞の感染を阻害することが示されている。他のD-ペプチドは、感染力を阻害するその能力について同様に評価することができる。

10

20

30

40

50

【0059】

上記薬剤は、経口投与、鼻腔投与、腹腔内投与、筋肉内投与、腔投与または直腸投与などの様々な経路で投与できる。各態様では、上記薬剤が、適当な担体または医薬組成物に入れて提供される。例えば、くぼみ結合薬は、適当な緩衝液、食塩水、水、ゲル、フォーム、クリームまたは他の適当な担体に含めて投与することができる。上記薬剤ならびに一般に適当な担体および随意の成分（例えば安定化剤、吸収もしくは取込み促進剤、着香料および／または乳化剤など）を含んでなる医薬組成物を製剤化し、それを個体（HIV未感染者またはHIV感染者）に治療有効量で投与することができる。一態様として、g p 4 1 のN-ヘリックスコイルドコイルを結合する薬剤（例えば本明細書に記載するもの、D P 178 (C. T. Wild, D. C. Shugars, T. K. Greenwell, C. B. McDanal, T. J. Matthews, 同上 91:9770 (1994))、HIV-1 g p 4 1 (HXB2株)の残基117-152に相当しアミノ末端がアセチル化されカルボキシ末端がアミド化されているT649) (L. T. Rimsky, D. C. Shugars, T. J. Matthews, J. Virol., 72:986 (1998)などは、殺微生物薬として投与（または適用）され、細胞へのウイルス侵入を妨害する。例えば、HIVくぼみを結合する1または複数の薬剤を、腔、直腸または口腔粘膜などの粘膜表面に適用もしくは粘膜表面と接触させる組成物に組み込むことができる。上記組成物は、上記薬剤の他に、粘膜表面または避妊具（例：コンドーム、子宮頸部（cervical）キャップ、ペッサリー）の表面への適用に適した担体または基剤（例：クリーム、フォーム、ゲル、その他、上記薬剤、水、緩衝液を保持するのに十分な粘性を持つ物質）を含んでなる。上記薬剤は、上記薬剤を含有するフォーム、ゲル、クリーム、水または他の担体の適用などによって、粘膜表面に適用することができる。もう一つの選択肢として、使用条件（例えば腔または直腸の温度、pH、湿度条件）下に（例えば分解、溶解、その他の放出手段によって）薬剤を放出または送達する素材で作られた、1または複数の上記薬剤を含有する担体または基剤である腔坐剤または直腸坐剤を使って適用することもできる。これらの組成物を経口的に投与（例えばカプセル、丸剤、液体、その他の形態で嚥下）して、個体の血流中に移行させることもできる。いずれの態様でも、例えば薬剤を徐々に放出するまたは所定の期間後に放出する組成物に上記薬剤を組み込むことなどによって、薬剤の制御放出または持効性放出（time release）（徐放、投与または挿入後の特定の時点での放出）を達成することができる。もう一つの選択肢として、（例えば腔、口または直腸への）投与または適用後直ちにまたは速やかに薬剤を放出する組成物に、上記薬剤を組み込むこともできる。複合的放出（例えば薬剤の一部を挿入後直ちにまたは速やかに放出すると共に、薬剤の一部を挿入後経時に、または特定の時点で放出すること）も効果的であり得る（例えば、2種類以上の素材から構成され、一つの素材からは放出または送達が挿入後直ちにまたは速やかに起こり、および／または、一つの素材からは放出または送達が徐々に起こり、および／または、一つの素材からは指定の期間後に放出が起こる組成物を製造することなどによる）。例えば、HIVくぼみを結合する1または複数の薬剤を、米国特許第4,707,362号に記載されているような徐放性組成物に組み込むことができる。それらのクリーム、フォーム、ゲルまたは坐剤は、産児制限にも使用されるもの（例えば殺精子剤または他の避妊剤）であってもよいが、そうである必要はない（例えば、抗HIV薬を単独で、または別の非避妊剤（抗菌薬、抗真菌薬または潤滑剤など）と組み合わせて送達するためだけに、それらを使用することもできる）。本発明の抗HIV薬は、HIV g p 4 1 N-ヘリックスコイルドコイルを結合する1または複数の薬剤でコーティングされている、または使用条件下での放出が可能な形でそれらの薬剤が組み込まれている避妊具（例えばコンドーム、子宮頸部キャップ、ペッサリー）を使って、個体に投与することもできる。上述のように、薬剤の放出は直ちに、徐々に、または指定した時点で起こりうる。その結果、それらの薬剤は、HIVと接触しHIVを結合して、細胞へのウイルス侵入を減少させ、または防止する。

【0060】

もう一つの態様では、g p 4 1 N-ヘリックスコイルドコイルくぼみへの結合以外の機

10

20

30

40

50

序によって細胞へのHIV侵入を妨害する薬剤（例えば、CD4段階でgp120結合を妨害することによって、ウイルス侵入を妨害する薬剤）が、gp41 N-ヘリックスコイルドコイルに結合する薬剤について上述したように、粘膜表面に投与または適用される。

【0061】

本発明の融合タンパク質は、可溶性三量体型または可溶性三量体状のコイルドコイル、例えばある（非HIV由来またはHIV由来の）タンパク質の可溶性三量体型または可溶性三量体状のコイルドコイル領域などと、HIV gp41のNペプチドのC末端のうちHIVコイルドコイルくぼみまたは疎水性ポケットを包含する（構成する）のに十分な部分（N-ペプチドのポケット構成残基）とを含んでなる。HIV gp41のNペプチドは、HIV-1、HIV-2、別のHIV株、または他の種に由来する株（例えばサル免疫不全症ウイルス（SIV）、ネコ免疫不全症ウイルスまたはビスナウイルスなど）のものであってよい。例えばHIV-2配列LLRLTVWGTKNLQARVT（配列番号：26）、SIV配列LLRLTVWGTKNLQTRVT（配列番号：27）、またはHIV-1、HIV-2およびSIV中の不变残基からなる配列（LLXLTVWGXKXLQXRXX（配列番号：42）で表される；ここにアミノ酸残基L、T、V、W、G、K、QおよびRはアミノ酸残基に使用される一文字コードであり、Xは任意のアミノ酸残基を表す）。また本発明の主題はHIV gp41疎水性ポケットの可溶性三量体モデルであり、これはD-ペプチドであってもL-ペプチドであってもよく、可溶性三量体コイルドコイルと、HIV gp41のNペプチドのうちHIV gp41のN-ヘリックスコイルドコイル領域のポケットを形成するアミノ酸残基を含むのに十分な部分とを含んでなる。上記D-またはL-ペプチドは、GCN4-pI_QI、GCN4-pII、モロニーマウス白血病ウイルスまたはABCヘテロ三量体のコイルドコイルを、可溶性三量体コイルドコイルとして含んでなることができる。HIV gp41のNペプチドのうち該ポケットのアミノ酸残基を含むのに十分な部分である成分は、例えばHIV-1のLLQLTVWGIKQLQARIL（配列番号：20）、HIV-2のLLRLTVWGTKNLQARVT（配列番号：26）、SIVのLLRLTVWGTKNLQTRVT（配列番号：27）またはこれらの不变残基、すなわちLLXLTVWGXKXLQXRXX（配列番号：42）を含んでなることができる。

【0062】

本発明の一態様は、あるタンパク質（GCN4-pI_QIなど）の三量体状のコイルドコイル領域と、HIV gp41のN-ヘリックスコイルドコイルとの融合タンパク質であって、N-ヘリックスくぼみの全部または一部を含むか、N-ヘリックスくぼみを含まないものである。すなわち、本発明の融合タンパク質は、GCN4-pI_QIの三量体型のコイルドコイル領域と、HIV-1 pg41のN-ペプチドの一部を含んでなることができ、そのgp41のN-ペプチドの一部は、HIV-1 gp41のN-ヘリックスくぼみの一部または全部を含むか、HIV-1 gp41のN-ヘリックスくぼみを含まない。例えば、GCN4-pI_QI由来の残基とN-36由来の残基を含有する融合タンパク質を作成することができる。IQN24nと表記される融合タンパク質は、溶解性を増すための3つの突然変異を含むGCN4-pI_QIの29残基と、N36のN-末端に由来する24残基（SGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLT）（配列番号：21）を含有し、大腸菌での組換え発現用に、余分のMet残基がN-末端に追加されている。例えば、融合タンパク質は、（配列番号：21）のアミノ酸配列を含んでなるHIV gp41のN-ペプチドの一部を含んでなることができる。IQN24nの配列は、MRMKQIEDKIEEIESKQKKIEENEIARIKKLISGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLT（配列番号：22）である。この融合タンパク質は、化学合成法または組換えDNA法などの様々な方法によって、もしくは大腸菌での組換え発現によって製造することができ、その場合はN-およびC-末端はブロックされない。GCN4-pI_QIコイルドコイルのコイルドコイルパラメーターはHIV gp41 N-ヘリックスコイルドコイルとほぼ同一であるので、得られる融合タンパク質分子（IQN

10

20

30

40

50

24n)は、gp41 N-ヘリックスコイルドコイルの一部を(凝集していない)三量体として提示する長い三量体コイルドコイルを形成すると予想される。

【0063】

本発明のもう一つの態様は、個体における免疫反応を誘発する方法を提供する。gp41 N-末端領域コイルドコイルの一部分に関する可溶性三量体モデルを作成するために使用した戦略は、HIVワクチン候補の開発にも役立つ。将来的なHIVワクチンの一つの目標は、HIV-1 gp120/gp41エンベロープタンパク質複合体の「プレヘアピン」中間体に結合する中和抗体反応を誘発することである。この過渡的な形態では、gp41のN-ヘリックス領域は露出しているが、C-ヘリックス領域は露出していない。gp41のN-ヘリックス領域に対する抗体反応を誘発するには、免疫原として、N-ペプチド(N36、N51またはDP-107など)を使用することが妥当であるように思われるが、単離されたN-ペプチドは凝集し、gp41 N-ヘリックスコイルドコイル三量体を正しく提示しない。したがって、一般に、gp41疎水性ポケットに関するこの問題を解決するために本明細書に記載する戦略と同じ戦略を、gp41 N-ヘリックスコイルドコイル領域の可溶性三量体モデルの開発にも適用することができる。このような三量体モデル(IQN17など、ただし例えばgp41のポケット残基を含まないペプチドも挙げられる)を免疫原として使用することにより、プレヘアピン中間体に対する抗体反応を誘発し、それによってHIV-1感染を阻害することができる。例えば、免疫化しようとする個体には、あるタンパク質の三量体型のコイルドコイル領域とHIV-1 gp41由来のN-ペプチドの一部とからなり、そのgp41由来の部分がN-ヘリックスコイルドコイルくぼみの一部または全部を含むか、N-ヘリックスコイルドコイルくぼみを含まない融合タンパク質を、医薬的に許容できる担体に入れて投与することができる。例えばIQN24nを単独で、または他の物質と組み合わせて、ワクチンに使用することができ、そのワクチンは、それが投与される個体(ワクチン接種者)中で上記コイルドコイルに結合する抗体の産生を誘発し、それによって感染および/または疾患からの保護を与えるだろう。IQN24nはN-ヘリックスコイルドコイルに結合する抗体(モノクローナルおよび/またはポリクローナル抗体)を(ヒト、その他の動物、または抗体ライブラリーから)同定するため、および/または、それらの抗体を産生させるためにも使用できる。これは、IQN24n(またはIQN17もしくは他の可溶性三量体モデル)を使って、生物学的試料(例えば血液)中のN-ヘリックスコイルドコイルを結合する抗体の存在/不在/レベルを評価する診断法の基礎になる。

【0064】

本明細書に記載する融合タンパク質(例えばIQN17またはIQN24n)のGCN4-pI。I成分には、それらの変化がコイルドコイルの三量体状態を変化させないという条件で、任意の多種多様な変異を施し、上記の方法に使用することができる。HIV gp41 N36ペプチドに由来する部分である融合タンパク質成分のアミノ酸組成を変化させて、変異体(例えばIQN17またはIQN24nの変異体)を作成することもできる。コイルドコイルの三量体状態およびHIV gp41のN-ペプチドコイルドコイルに相当する融合タンパク質の表面の構造が維持されるのであれば、可能なアミノ酸残基変化の数または種類に制限はない。HIV gp41 N-ペプチドの一部である融合タンパク質成分は、N-ヘリックスくぼみの全部または一部を含んでもよいし、N-ヘリックスくぼみを含まなくてもよい。例えば、N51、N36、DP-107の他の部分またはHIV gp41 N-ヘリックス領域の他の領域を、GCN4-pI。I(または別の三量体状のタンパク質のコイルドコイル領域)に融合して、(凝集していない)三量体らせんコイルドコイル融合タンパク質を作成し、それを上記の方法に使用することができる。コイルドコイルの三量体状態およびHIV gp41のN-ペプチドコイルドコイルに相当する融合タンパク質の表面の構造が維持されるのであれば、設計し作成することができる融合タンパク質の数と種類に制限はない。そのような融合タンパク質は、例えばコイルドコイルのヘプタドリピート位置またはコイルドコイルパラメーターを評価するなどといった、当業者に知られている方法を使って、設計し作成できる。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 5 】

本明細書には、HIVエンベロープ糖タンパク質gp41（例えばHIV-1、HIV-2）のN-ヘリックスコイルドコイルの表面にあるくぼみに結合するペプチド（D-ペプチドであってもL-ペプチドであってもよい）が記載される。そのようなペプチドは、それらが、N-ヘリックスコイルドコイルくぼみとHIV gp41のC-ペプチド領域のアミノ酸残基の相互作用を妨害し細胞へのHIV侵入を防止するような形でくぼみを結合するのに足りる長さを持つのであれば、どのような長さであってもよい。例えば、D-またはL-ペプチドは少なくとも2つのアミノ酸残基からなり、一般的には約2～約21アミノ酸残基になるだろう。すなわち、それらは約2～約21個の範囲の任意のアミノ酸残基数からなりうる。アミノ酸残基は、後述するように、天然型または非天然型または修飾型のアミノ酸残基でありうる。ペプチドは直鎖状でも環状でもよい。

10

〔 0 0 6 6 〕

本明細書に記述するように同定される D - ペプチドの例を図 3 に示す。ライブラリーの設計上、各ペプチドには、示したアミノ酸残基に加えて、N - 末端に G A が、C - 末端に A A が隣接している。N - 末端のリジン残基は水溶性を向上させるために付加した。

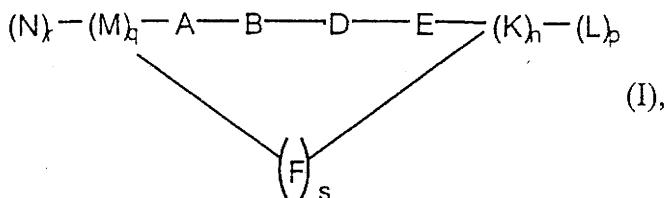
[0 0 6 7]

一態様として、本発明は、HIV-1 gp41エンベロープタンパク質のC-ヘリックスに対するN-ヘリックスコイルドコイルの結合を阻害する化合物を提供する。このような化合物はHIVに感染した患者または潜在的にHIVに感染しやすい患者を治療する方法に役立つ。これらの化合物は、もう一つの化合物のN-ヘリックスコイルドコイルくぼみへの結合能を評価する方法にも役立つ。

20

[0 0 6 8]

一様として、HIV-1 gp41 エンベロープタンパク質の C-ヘリックスに対する N-ヘリックスコイルドコイルの結合を阻害する化合物は、次の式 I の化合物である：



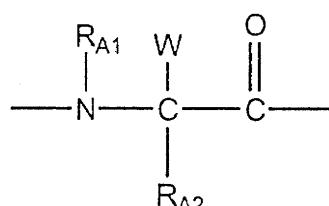
30

式中、A、B、DおよびEはそれぞれ独立して1つのD-アミノ酸残基、1つのL-アミノ酸残基、または1つのN-置換グリシル残基である。天然アミノ酸残基または非天然アミノ酸残基を使用できる。K、L、MおよびNはそれぞれ独立して1つのアミノ酸残基、または同一でも異なってもよい2～約6アミノ酸残基のポリペプチド基であり、n、p、qおよびrはそれぞれ独立して0または1である。Fは直接結合または二官能性連結基であり、sは0または1である。

[0 0 6 9]

式 I の化合物の部分集合の一つでは、 A が次式の D - アミノ酸残基、 L - アミノ酸残基または N - 置換グリシル残基である：

40



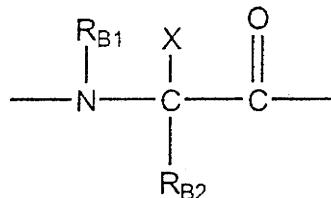
式中、 R_{A1} と R_{A2} の一方は、置換されたまたは非置換のアリール、ヘテロアリール、アリールメチル、ヘテロアリールメチル、ベンゾ縮合アリール、ベンゾ縮合ヘテロアリール、ベンゾ縮合アリールメチル、ベンゾ縮合ヘテロアリールメチル、シクロアルキルまたはビ

50

シクロアルキルであり、他方は水素である。Wは水素、メチル、トリフルオロメチルまたはハロゲン（例えはフッ素、塩素、臭素またはヨウ素）である。

【0070】

Bは、グリシル残基または次式のD-アミノ酸またはN-置換グリシル残基である：

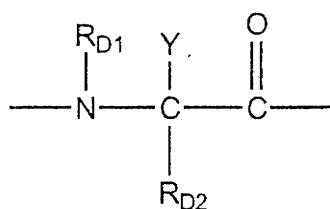


10

式中、 R_{B1} と R_{B2} の一方は、置換されたまたは非置換の直鎖状、分枝鎖状または環状アルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアリールまたはヘテロアリールアルキル基であり、他方は水素である。Xは水素、メチル、トリフルオロメチルまたはハロゲン（フッ素、塩素、臭素またはヨウ素など）である。

【0071】

Dは、次式のD-アミノ酸残基またはN-置換グリシル残基である：



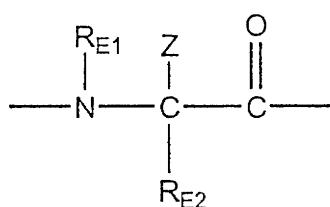
20

式中、 R_{D1} と R_{D2} の一方は、置換されたまたは非置換のアリール、ヘテロアリール、アリールメチル、ヘテロアリールメチル、ベンゾ縮合アリール、ベンゾ縮合ヘテロアリール、ベンゾ縮合アリールメチル、ベンゾ縮合ヘテロアリールメチル、シクロアルキルまたはビシクロアルキルであり、他方は水素である。Yは水素、メチル、トリフルオロメチルまたはハロゲン（フッ素、塩素、臭素またはヨウ素など）である。

【0072】

30

Eは、次式のD-アミノ酸残基またはN-置換グリシル残基である：



式中、 R_{E1} と R_{E2} の一方は、置換されたまたは非置換の直鎖状、分枝鎖状または環状アルキル、アリールまたはアリールアルキル基であり、他方は水素である。Zは水素、メチル、トリフルオロメチルまたはハロゲン（フッ素、塩素、臭素またはヨウ素など）である。

40

【0073】

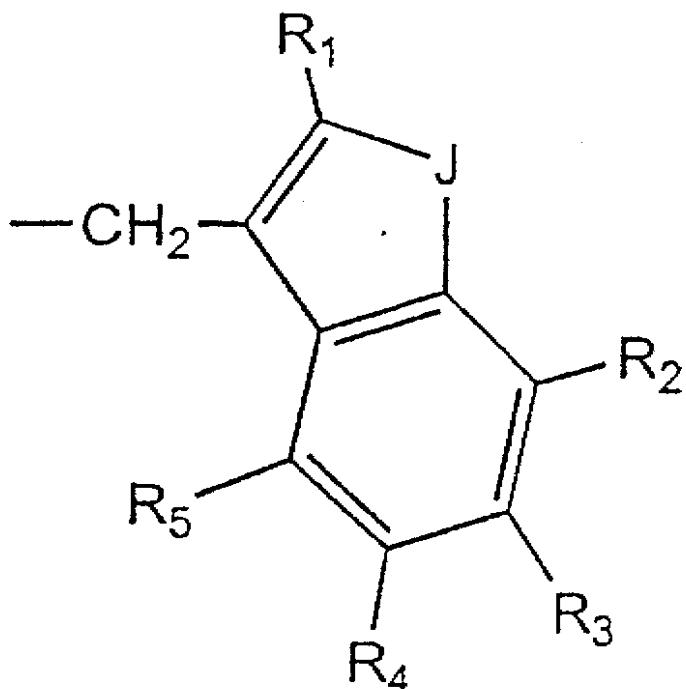
K、L、MおよびNはそれぞれ独立して、1～約6個の（同一でも異なってもよい）D-アミノ酸残基、L-アミノ酸残基、N-置換グリシル残基またはそれらの組み合せからなる。天然アミノ酸残基または非天然アミノ酸残基を使用できる。1つまたは複数のアミノ酸残基またはN-置換グリシル残基が、随意に、-炭素がメチルまたはトリフルオロメチル基もしくはハロゲン（フッ素、塩素、臭素またはヨウ素原子など）で置換されていてもよい。

【0074】

好みしい一態様として、 R_{A1} と R_{A2} の一方および R_{D1} と R_{D2} の一方は独立してフェニル、

50

置換フェニル、ナフチル、置換ナフチル、ナフチルメチル、置換ナフチルメチル、ベンジルまたは置換ベンジル基であるか、式：



10

20

30

[式中、JはO、SまたはN Rであり、RはHまたは直鎖状、分枝鎖状もしくは環状のC₁ - C₆アルキル、好ましくはメチルである。R₁、R₂、R₃、R₄およびR₅は、水素、ハロゲンおよびアルキル、好ましくは直鎖状、分枝鎖状、または環状のC₁ - C₄アルキル（メチルなど）からなる群より独立して選択される]の基である。好適なフェニル、ナフチル、ナフチルメチルおよびベンジル置換基としては、アルキル、好ましくは直鎖状、分枝鎖状または環状のC₁ - C₄アルキル（メチルなど）およびハロゲン（フッ素、塩素、臭素またはヨウ素など）が挙げられる。より好ましくは、R_{A1}とR_{D1}は共に水素であり、R_{A2}とR_{D2}はそれぞれ独立して上述した基の一つである。

【0075】

R_{B1}とR_{B2}の一方は水素、置換されたまたは非置換の直鎖状、分枝鎖状または環状C₁ - C₄アルキル、フェニル、ベンジル、ナフチルまたはナフチルメチルであることが好ましい。好適な置換基としては、直鎖状、分枝鎖状または環状のC₁ - C₄アルキル基およびハロゲン（フッ素、塩素、臭素またはヨウ素など）が挙げられる。より好ましくは、R_{B1}は水素であり、R_{B2}は上述した基の一つである。

【0076】

R_{E1}とR_{E2}の一方は、置換されたまたは非置換の直鎖状、分枝鎖状または環状C₁ - C₆アルキル基であるか、置換されたまたは非置換のフェニルもしくはナフチル基であることが好ましい。好適な置換基としては、直鎖状、分枝鎖状または環状のC₁ - C₄アルキル基（メチルなど）およびハロゲン（フッ素、塩素、臭素およびヨウ素など）が挙げられる。R_{E1}は水素であり、R_{E2}は上述した基の一つであることが、より好ましい。

【0077】

式Iの化合物の好ましい部分集合では、AとDが、それぞれD - トリプトファン残基であり、EはD - ロイシン残基である。

【0078】

Kは、アミノ-、カルボキシリ-またはスルフヒドリル置換側鎖を含有するD - アミノ酸残基またはN - 置換グリシル残基（システイン、グルタミン酸、アスパラギン酸またはリジン残基など）であり、Lは2 ~ 3個のD - アミノ酸残基、L - アミノ酸残基（それらD - またはL - アミノ酸残基は同一でも異なってもよい）またはN - 置換グリシン残基から

40

50

なるポリペプチドであることが好ましい。例えば一態様として、Lは、D-グリシン、D-アラニンまたはD-₁-C₁-C₄-アルキルグリシンの中から選択される2~3個の残基からなる。

【0079】

Mは、2~約8個のD-アミノ酸残基(そのうち少なくとも一つは、アミノ-、カルボキシ-またはスルフヒドリル-置換側鎖を含有するシステイン、グルタミン酸、アスパラギン酸またはリジン残基などのアミノ酸残基)からなるポリペプチド基であることが好ましい。Nは、1~約6個のアミノ酸残基(そのうち少なくとも一つはリジン残基である)からなるポリペプチド基であることが好ましい。

【0080】

二価連結基Fの独自性は、それが、N-ヘリックスコイルドコイルくぼみと相互作用する位置にA~Eの残基を配置させるのに適した長さであるならば、重要ではない(J. R. Morphy, Curr. Op. Drug Discov. Develop., 1: 59-65 (1998))。例えばFは、約2~約40原子の長さを持つことが好ましい。一態様として、Fは直接結合であるか、式:-P_n-のポリペプチド連結基である(式中、nは1~約12であり、各Pは独立してL-またはD-アミノ酸もしくはN-置換グリシル残基またはグリシル残基もしくはN-置換グリシル誘導体である)。

【0081】

もう一つの態様では、Fが、置換されたまたは非置換のC₄-C₄₀-アルキレン基、例えば式:- (CH₂)_m-のポリメチレン基(式中、mは約4~約40である)などであるか、1または複数の位置が窒素、酸素またはイオウ原子などのヘテロ原子によって介在されているアルキレン基である。例えばFは、(CH₂CH₂O)_q-の基(式中、qは1~約20である)でありうる。またFは、1または複数の位置が、フェニレンまたはヘテロアリーレン基もしくは多糖基(例えばグリコシド基、もしくは1または複数のグリコシド基(例えば1~約10個のグリコシド基)からなるポリ(グリコシド)基)で介在されているアルキレン基であってもよい。好適なグリコシドとしては、グルコシド、ラクトシド、マンノシド、ガラクトシド、フコシド、フルクトシド、グロシド、アロシド、アルトロシド、タロシド、イドシド、その他当該技術分野で知られているもの(ピラノシド類およびフラノシド類など)が挙げられる。

【0082】

C-末端アミノ酸残基を持つ式Iの化合物では、そのC末端残基は、当該技術分野で知られているように、例えばアミド、N-置換アミドまたはカルボン酸保護基の形であってもよい。N-末端残基の窒素原子は、当該技術分野で知られているように、アシル化(例えばアセチル化)されていてもよく、あるいはアミノ保護基で置換されていてもよい。

【0083】

本明細書において「D-アミノ酸残基」という用語は、D-グリセルアルデヒドと同じ絶対配置を持つ-L-アミノ酸残基を指す。そのアミノ酸残基が、第1の非水素置換基と、メチルおよびハロゲンから選択される第2の置換基とを含む場合、その絶対配置は、グリセルアルデヒド炭素上に水素原子の代わりに当該第2の置換基を持つD-グリセルアルデヒドと同じである。

【0084】

本明細書に記載のペプチド、当該ペプチドの一部、当該ペプチドの変異体/誘導体または当該変異体/誘導体の一部は、細胞へのHIV侵入のインヒビターとして使用できる。図3に記載のペプチド、またはコイルドコイルのC末端にある疎水性ポケットに收まり、gap41のC-ペプチド領域のN-ペプチド領域との相互作用を防ぐのに十分なペプチドの一部は、HIV感染を阻止するのに役立つ。記載した任意のペプチドまたはその誘導体の一部は、2~20アミノ酸残基(2から20までの任意の残基数)の大きさをとりうる。本明細書に記載のコンセンサス配列トリプトファン-トリプトファン-ロイシンまたは配列トリプトファン-トリプトファン-ロイシン-グルタミン酸および追加の残基からなるD-ペプチドを使用することができる。そのようなD-ペプチド中に存在する他の残基と

10

20

30

40

50

そのD-ペプチドの大きさは、本明細書に記載のペプチドを参照して選択することができ、あるいは、そのペプチドが疎水性ポケットに収まりインヒビターとして作用できるような形で上記の3または4残基が配置されるという条件で、本明細書に記載のペプチドとは無関係に設計することもできる。本明細書に記載のD-ペプチドのN-末端、C-末端または両方に追加のアミノ酸残基が存在して、より大きなペプチドになっていてもよい。あるいは、例えば結合親和性を高めるために、選択された他のアミノ酸残基が存在してもよい。あるいは、図3のD-ペプチドの保存されたアミノ酸残基を含んでなるペプチドを使用することもできる。例えばそのようなペプチドは16アミノ酸残基の大きさで、保存されたアミノ酸残基を含むことができ、それら保存されたアミノ酸残基は図3に示すペプチドにおけるそれらの位置と同じ位置にありうる。介在アミノ酸残基は図3に示すいずれかのペプチド中でそれらの位置にあるアミノ酸残基とは異なってもよく（例えばそれら介在アミノ酸残基はイソロイシンまたはアスパラギンまたは図3に記載のペプチドには認められない他のアミノ酸残基であってもよく）、あるいは、それら介在アミノ酸残基で図3に示す別のペプチドの特定の位置に示されるアミノ酸残基を置換するか、それら介在アミノ酸残基を当該別のペプチドの特定の位置に示されるアミノ酸残基で置換することができる（例えばD10 pep1中のアスパラギン酸残基をセリン残基で置換することができる）。天然タンパク質中に見出される20種類のL-アミノ酸のD-状以外のアミノ酸残基も使用できる。そのような改変は、例えば、ペプチドの生物学的利用能、結合親和性または他の特性を向上させるために施すことができる。D-ペプチドは図3に示すペプチド中に存在する保存されたアミノ酸残基を含んでなりうるが、それらは図3に示す介在アミノ酸残基の数よりも少ない（または多い）アミノ酸残基で分離されてもよい。例えば図3に示すコンセンサス配列中の最初のシステインとグルタミン酸との間には、5残基より少ないアミノ酸残基が存在してもよい（例：Tarrago-Litvak, L.ら, FASEB, J., 8:497 (1994); Tucker, T. J.ら, Methods Enzymol., 275:440 (1996)、Tarrago-Litvak, L.ら, FASEB, J., 8:497 (1994); Tucker, T. J.ら, Methods Enzymol., 275:440 (1996)）。あるいは、これら2つの残基は、5残基より多いアミノ酸残基で分離されてもよい。内部修飾も（例えばペプチドの結合を増進したり、溶解度を増大させるために）施しうる。例えばD10 pep5の最初のトリプトファンは、溶解度を増大させるためにアルギニンで置換することができる。D-ペプチドはそのN-末端に追加の成分またはアミノ酸を持つことができる。例えばN末端を保護する成分またはN末端に本来存在する電荷を除く成分を付加することができる。この成分は、例えば、グリシン（G）に直接結合したアセチル基などのブロック成分、またはGのN-末端に結合した1または複数の追加のアミノ酸残基に結合したアセチル基、例えばN末端のGに順番に結合している1または複数のリジン残基に結合しているアセチル基などでありうる。一態様として、例えばペプチドの溶解度を増大させるために2つのリジン残基をN-末端のGに結合し（KKGAC...）、その末端リジンにアセチル基などのブロック成分を結合することができる（アセチル基KKGAC...）。もう一つの態様として、4つのリジン残基をN-末端のGに結合する。これに加えて、D-ペプチドはそのC-末端にも、追加のおよび/または改変された成分もしくはアミノ酸を持ちうる。例えば、C末端にあるアラニン残基の1つまたは両方を改変し、および/または、1または複数の残基をC末端に追加して、例えば結合を増進させることができる。もう一つの選択肢として、アミノ酸残基以外の官能基（化学基）を組み込んで、本発明のインヒビターを作成することもできる。例えば、これら追加の化学基は、N末端、C末端、両末端、または内部に存在できる。また、阻害の有効性を増大させるために、2またはそれ以上のD-ペプチドを適当なリンカー（例えばアミノ酸残基または他の化学成分のリンカー）を介して連結することもできる。もう一つの選択肢として、阻害の有効性を増大させるために、1または複数のD-ペプチドを、HIV gp120、CD4、CCR5、CXCR4またはHIV gp41の非ポケット領域に結合する分子（薬剤）に、適当なリンカーを介して連結することもできる。

【0085】

D-ペプチド（またはL-ペプチドもしくはD-アミノ酸とL-アミノ酸の両方を含むペプチド）は、化学法や組換え法などの既知の方法を使って製造できる。ポリペプチド主鎖は、そのペプチドの1または複数の位置で、改変（例えばN-メチル化）し、または代替骨格（例えばペプトイド）で置換することができる。ペプチドには、例えばそのペプチドのアミノ酸間またはアミノ酸部分間に配置されるリンカー（化学リンカー、アミノ酸リンカー）などの追加の成分を（例えば柔軟性を向上させるために、または剛性を高めるために）組み込んでもよい。本明細書に述べるように、D-ペプチドを同定する際に使用したライブラリーの設計上、本発明のD-ペプチドにはN-末端にGAが、またC-末端にAAが隣接している。例えば吸収、分布、代謝および／または排出性が異なるD-ペプチドを製造するために、これら4つのアミノ酸残基の一部または全部を、改変、置換または削除することができる。一態様として、C-末端アミドの直前にグリシン残基を付加することによってC-末端を修飾する。もう一つの態様として、最もC-末端側のAを改変／修飾するか、異なるアミノ酸残基で置換するか、削除する。

【0086】

天然に存在するペプチドの対称性とは反対の対称性を持つD-ペプチドは、プロテアーゼなどの酵素にとって効率のよい基質にはならず、したがって、L-ペプチドほど容易には分解されない。また、D-ペプチドを標的とする効果的な免疫反応もないで、D-ペプチドはLアミノ酸ペプチドによって誘発される免疫反応に匹敵するような免疫反応は誘発しない。

【0087】

以下、実施例によって本発明を説明するが、これらの実施例は決して限定を意図するものではない。

【0088】

実施例1 C34ペプチドの変異体の合成

固相F M O Cペプチド化学によって突然変異型ペプチドを合成した。これらの突然変異型ペプチドはアセチル化されたアミノ末端とアミド化されたカルボキシ末端を持つ。樹脂から切り離した後、ペプチドをセファデックスG-25カラム（ファルマシア社）で脱塩し、次に直線的水-アセトニトリル勾配および0.1%トリフルオロ酢酸を用いるVydac C18分取用カラムでの逆相高速液体クロマトグラフィー（ウォーターズ社）によって精製した。ペプチドの確認はM A L D I質量分析（Voyager Elite、バーセプティブ・バイオシステムズ社）で行なった。ペプチド濃度は6M GuHCl中のトリプトファンおよびチロシン吸収によって測定した[H. Edelhoch, Biochemistry, 6: 1948 (1967)]。

【0089】

実施例2 突然変異型N36/C34複合体のヘリックス含量と熱安定性の定量

先に記述されているように（M. Lu, S. C. Blacklow, P. S. Kim, Nat. Struct. Biol., 2: 1075 (1995)）、アビブ（Aviiv）製モデル62DS分光計を使って、リン酸緩衝食塩水（50mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl、pH 7.0）中で、CD測定を行なった。各複合体の見かけ上の融点は、温度に関する $[\quad]_{222}$ の一次導関数の極大から見積もった。0°における平均残基構成率（ $[\quad]_{222}$ 、 $10^3 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ ）は次の通りだった：野生型、-31.7；Met⁶²⁹Ala、-32.0；Arg⁶³³Ala、-30.7；Ile⁶³⁵Ala、-25.9；Trp⁶²⁸Ala、-27.0；Trp⁶³¹Ala、-24.9。Trp⁶²⁸AlaおよびTrp⁶³¹Ala突然変異の場合、 $[\quad]_{222}$ の減少はヘリックス含量の実際の減少を高く見積もりすぎているようである。モデルヘリックスからトリプトファン残基を除去すると、ヘリックス含量にほとんど変化がない場合でも $[\quad]_{222}$ の絶対値が有意に減少すると報告されている（A. Chakrabarty, T. Kortemme, S. Padmanabhan, R. L. Baldwin, Biochemistry, 32: 5560 (1993)）。

10

20

30

40

50

【0090】

実施例3 H I V - 1 g p 4 1 の N - ヘリックスコイルドコイルの表面にあるポケットに結合するペプチドの同定

H I V エンベロープ糖タンパク質 g p 4 1 の N - ヘリックスコイルドコイルの表面にあるくぼみに結合する D - ペプチドを同定するのに役立つ方法がある。以下に詳述するように、H I V - 1 エンベロープ糖タンパク質 g p 4 1 の N - ヘリックスコイルドコイルの表面にあるくぼみに結合する D - ペプチドを、鏡像ファージディスプレイ法 (m i r r o r - i m a g e p h a g e d i s p l a y) によって同定した。この方法では、ファージディスプレイライブラリーをスクリーニングすることによって、D - アミノ酸からなるリガンドを同定する。D - アミノ酸含有リガンドは、基質とインヒビターに対して、天然に存在する L - アミノ酸リガンドとは反対のキラル特異性を有する。ファージディスプレイライブラリーを使って、標的または所望の L - アミノ酸ペプチドを結合する D - アミノ酸ペプチドリガンドが同定されている (S c h u m a c h e r ら, S c i e n c e , 2 7 1 : 1 8 5 4 - 1 8 5 7 (1 9 9 6))。

【0091】

g p 4 1 の疎水ポケットに結合する D - ペプチドは、N - 末端に G C N 4 - p I Q I の 2 9 残基を含有し C 末端に g p 4 1 の 1 7 残基を含有するハイブリッド分子 I Q N 1 7 のエナンチオマーである標的を使って同定された。選択に使用したファージライブラリーは、米国特許第 5 , 7 8 0 , 2 2 1 号および S c h u m a c h e r ら, S c i e n c e , 2 7 1 : 1 8 5 4 - 1 8 5 7 (1 9 9 6) に記載されている。ライブラリーの複雑度は 1 0 ⁸ 種類の配列を超える。各配列は両端にシステインまたはセリンを持ち、中間に 1 0 個のランダムな残基がある。これらの配列は、ファージの外面に約 5 コピーとして発現されるコートタンパク質、ファージの p I I I 遺伝子中に配置されている。

【0092】

ここに記載する例では以下の実験手順を使用した。

【0093】

ファージディスプレイ

N e u t r A v i d i n (ピアス社、1 0 0 μ L の 1 0 0 mM Na H C O ₃ 中 1 0 μ g) を 9 6 ウェル高吸着スチレン製プレート (コースター社) の各ウェルに入れ、振盪台上で一晩インキュベートした。N e u t r A v i d i n を除去し、ウェルを T B S / T w e e n 溶液で 4 回洗浄した。ビオチン化 D - I Q N 1 7 (1 0 0 mM Na H C O ₃ 中の 1 0 μ L ペプチド溶液 1 0 0 μ L) を各ウェルに加え、2 5 で 1 時間インキュベートした。ビオチン化標的を除去し、ブロッキング溶液 (1 0 0 mM Na H C O ₃ 中の 3 0 mg / m l 脱脂粉乳) を各ウェルに加え、振とうしながら 4 で 2 時間インキュベートした。ブロッキング溶液を除去し、ウェルを再び上述のようにビオチン化標的でコーティングした。標的を除去し、5 mM ビオチンを含むブロッキング溶液を添加することにより、リガンドと結合していない N e u t r A v i d i n をブロックした。ビオチンを除去した後、各ウェルを T B S / T w e e n 溶液で 6 回洗浄した。次に、ファージストックを各ウェルに加えた (5 0 μ L のファージストック + 5 0 μ L のファージ結合緩衝液 : T B S 、0 . 1 % T w e e n - 2 0 、1 mg / m l ミルク、0 . 0 5 % アジ化ナトリウム) 。ウェルでのファージストックのインキュベーション時間は、選択ラウンド数が増すにつれて短くした。インキュベーション後に、ファージ溶液を除去し、結合していないファージを除去するために、ウェルを T B S / T w e e n で 1 2 回洗浄した。奇数回目の洗浄はインキュベーション時間なしですばやく行ない、偶数回目の洗浄は、ファージ選択のラウンド数が増えるごとに時間を増やしてインキュベートした。1 0 0 μ L のファージ結合緩衝液および 2 . 5 mM C a C l ₂ 中のトリプシン 2 μ g を添加し、3 7 で 1 時間インキュベートすることにより、ファージを溶出させた。回収率を決定するために、溶出したファージの希釈液を使って、K 9 1 k a n 細胞を感染させた。1 時間のインキュベーション後に、細胞 1 0 0 μ L を取り出し、L B で 1 : 1 0 、1 : 1 0 0 および 1 : 1 0 0 に希釈した液を L B / テトラサイクリンプレートに播種した。ファージ回収率は、回収された形質

10

20

30

40

50

導入単位（溶出したファージの力価）の、投入した形質導入単位数（そのラウンドで使用したファージストックの力価）に対する割合として決定した。形質導入単位は L B / テトラサイクリンプレート上のテトラサイクリン耐性コロニーの数を数えることによって決定した。非特異的ファージ回収が一般に $10^{-8} \sim 10^{-9}$ の桁の比率を持つのに対して、特異的に増幅されたファージは 10^{-7} 以上の比率を持つ。個々のクローンを増幅し、配列決定した。それらを結合測定法で測定して、結合特異性を決定した。

【 0 0 9 4 】

5 ラウンドのファージ選択後に D 1 0 p e p 7 が同定された。7 ラウンドのファージ選択後に、D 1 0 p e p 1 、D 1 0 p e p 3 、D 1 0 p e p 4 、D 1 0 p e p 5 および D 1 0 p e p 6 が同定された。インキュベーション時間を短く、また洗浄を長くしてファージ選択を再び行ない、3 ラウンドの選択後に D 1 0 p e p 1 0 および D 1 0 p e p 1 2 が同定された。（9 番目の D - ペプチドが同定されたが、細胞に対して毒性であることが分かつて、それ以上は調べなかった。）

【 0 0 9 5 】

同定されたファージクローンの D - I Q N 1 7 のポケットに対する結合の特異性を調べるために、それらのファージクローンを、上述のように D - I N Q 1 7 、D - G C N 4 - p I_Q I (3 つの突然変異を持つもの) または D - I Q N 1 7 (G 3 9 W = グリシン 3 6 がトリプトファンで置換されているもの) でコーティングした 9 6 ウェルプレートのウェルもしくは標的を含まないウェルに加えた。ファージを、それらが同定された時のラウンドと同じ時間にわたって、プレート上でインキュベートし、洗浄した。溶出したファージを使って K 9 1 - k a n 細胞を感染させ、回収される形質導入単位を上述のように決定した。これらの配列は D - I Q N 1 7 を含むウェルに特異的に結合した。

【 0 0 9 6 】

ペプチド精製

I Q N 1 7 と各 D 1 0 ペプチドは、F M O C ペプチド化学によって合成した。それらはアセチル化された N - 末端と C - 末端アミドを持つ。I Q N 1 7 は G C N 4 - p I_Q I に由来する 2 9 残基を N - 末端に含有し、N 3 6 の C - 末端に由来する 1 7 残基を C - 末端に含有する。G C N 4 - p I_Q I と N 3 6 領域には 1 残基の重複があるので、4 5 残基長のペプチドになる。溶解度を改善するために、元の G C N 4 - p I_Q I 配列と比較して 3 つのアミノ酸置換を、I Q N 1 7 の G C N 4 - p I_Q I 領域に施した (E c k e r t , D . M . ら , J . M o l . B i o l . , 2 8 4 : 8 5 9 - 8 6 5 , 1 9 9 8)。それらの置換は L 1 3 E 、Y 1 7 K および H 1 8 K である。したがって I Q N 7 の配列は、
a c - R M K Q I E D K I E E I E S K Q K K I E N E I A R I K K L L Q L T V W G I
K Q L Q A R 1 L - a m

(a c - は N - 末端アセチル基を表し、- a m は C - 末端アミドを表す)

であり、下線部は H I V 部分である。鏡像ファージディスプレイのために、D - アミノ酸を使って I Q N 1 7 を合成した (I 1 e や T h r などの 2 つ目のキラル中心を含むアミノ酸残基については、天然に存在するアミノ酸残基の正確な鏡像を使って D 型の標的を作成する)。また、ペプチドの N - 末端を N H S - L C - ビオチン I I (ピアス社、カタログ番号 2 1 3 3 6) を使ってビオチン化した。ビオチンと I Q N 1 7 配列の間には G K G の 3 アミノ酸リンカーがあり、そのリジンは天然に存在する L - 型である。このリジンはトリプシン認識部位として挿入した。

【 0 0 9 7 】

D - ペプチドの配列は次の通りである (全てのアミノ酸は D - エナンチオマーであり、2 つ目のキラル中心を含む I 1 e と T h r については、天然に存在するアミノ酸残基の正確な鏡像を使用した) :

- D10pep1: Ac-GACEARHREWAWLCAA-CONH₂ (配列番号 : 34) ;
 D10pep3: Ac-KKGACGLGQEEFWLCAA-CONH₂ (配列番号 : 64) ;
 D10pep4: Ac-GACDLKAKEFWLCAA-CONH₂ (配列番号 : 35) ;
 D10pep5: Ac-KKGACELLGWEWAWLCAA-CONH₂ (配列番号 : 65) ;
 D10pep6: Ac-GACSRSPQPEWEWLCAA-CONH₂ (配列番号 : 36) ;
 D10pep7: Ac-GACLLRAPEWGWLCAA-CONH₂ (配列番号 : 37) ;
 D10pep10: Ac-KKGACMRGEWEWSWLCAA-CONH₂ (配列番号 : 67) ; および 10
 D10pep12: Ac-KKGACPPLNKEWAWLCAA-CONH₂ (配列番号 : 68) .

【 0 0 9 8 】

樹脂から切り離した後、ペプチドをセファデックス G - 25 カラム (ファルマシア社) で脱塩し、凍結乾燥した。凍結乾燥ペプチドを、 V y d a c C 18 分取用カラムでの逆相高速液体クロマトグラフィー (ウォーターズ社) によって精製した。次に凍結乾燥粉末を 20 mM Tris (pH 8.2) に溶解し、室温で数日攪拌することにより、それら D - ペプチドを空気酸化した。酸化されたペプチドを先と同様に HPLC 精製した。予想されるペプチドの分子量を MALDI - TOF 質量分析法で確認した (パーセプティブ・バイオシステムズ社) 。ペプチド濃度は 6 M GuHCl 中 280 nm でのチロシン、トリプトファンおよびシスティン吸収を使って決定した (Edelhoch, 1967) 。ペプチド原液は DMSO 中に調製した。 20

【 0 0 9 9 】

D10pep3、D10pep5、D10pep7a、D10pep10 および D10pep12 において N - 末端リジンを付加し、ペプチドの水溶性を増大させた。ペプチドの阻害活性に対する添加したリジンの効果を調査するために、D10pep1 を、 2 つの N 末端リジンを有するように合成し (D10pep1a と示す) 、リジンを有さない D10pep1 と比較した : D10pep1a が、シンシチウム形成の阻害に関して D10pep1 (すなわち、リジンなし) よりも約 2 倍高い IC₅₀ を有することを見出した。さらに、D10pep5 を、 2 つのさらなる N 末端リジン (D10pep5a) を意味するペプチドを産生するために合計 4 つのリジン) を有するように合成した。 D10pep5a のシンシチウム形成の阻害に関する IC₅₀ は、 D10pep5 よりも約 2 倍高かった。 D ペプチドへの N 末端リジン残基の添加は、阻害活性の穏やかな減少を生じただけであった。 30

【 0 1 0 0 】

研究のために合成した N 末端に付加した更なる D - Lys 残基を有する D - ペプチドは、ペプチドの名称に「 a 」を付して示され、下記 :

- D10pep1a: Ac-KKGACEARHREWAWLCAA-CONH₂ (配列番号 : 38) ;
 D10pep4a: Ac-KKGACDLKAKEFWLCAA-CONH₂ (配列番号 : 39) ;
 D10pep5a: Ac-KKKKGACELLGWEWAWLCAA-CONH₂ (配列番号 : 66) ; 40
 D10pep6a: Ac-KKGACSRSPQPEWEWLCAA-CONH₂ (配列番号 : 40) ; および
 D10pep7a: Ac-KKGACLLRAPEWGWLCAA-CONH₂ (配列番号 : 41)

を含む。

【 0 1 0 1 】

これらの配列はまた、図 3 に示される。各 D - ペプチドの 12 アミノ酸「コア」 (次いで、 10 マーおよび本明細書中に記載されるコンセンサス配列を含む) は下記 :

CDLKAKEFWLCL	(配列番号：3)	
CEARHRERAWLCL	(配列番号：4)	
CELLGWEWAWLCL	(配列番号：5)	
CLLRAPEWGWLC	(配列番号：6)	
CSRSQPEWEWLC	(配列番号：7)	
CGLGQEEFWLCL	(配列番号：8)	
CMRGEWEWSWLCL	(配列番号：9)	10
CPPLNKEWAWLCL	(配列番号：10)	

CVLKAKEFWLCLはペプチド配列番号：3の改変配列である（配列番号：11）

【0102】

これらのペプチド間に高度に保存されたコンセンサス配列が存在することはただちに明らかである。図3に示される12アミノ酸ペプチドは、C X X X X X E W X W L C（配列番号：63）で表され得、ここで、複数のペプチドで共通するアミノ酸を示し、Xは、ペプチド間で保存されていないアミノ酸残基を示す。

【0103】

実施例4 C34ペプチドおよびD-ペプチドの活性の評価

20

ウイルス感染を阻害することにおけるC34ペプチドの効力およびD-ペプチドのHIV-1感染阻害活性を、組換えルシフェラーゼ発現HIV-1（Chen, B. K.ら、J. Virol.、68:654 (1994)）；Malashkevich, V. N.ら、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 95:9134 (1998)）。ウイルスを、293T細胞へのエンベロープ欠損HIVゲノムNL43LucR-E-（Chen, B. K.ら、J. Virol.、68:654 (1994)）およびHXB2gp160（Chan, D. C.ら、Proc. Natl. Acad. Sci., 95:11513 (1998)）の同時トランスフェクトによって産生した。低速度遠心分離を用いて細胞細片のウイルス上清を清澄化した。上清を、0～500 μMの範囲の濃度のD-ペプチドの存在下でHOS-CD4/融合細胞（N. Landau, NIH AIDS Reagent Program）を感染させるために使用した。細胞を、感染の48時間後に回収し、ルシフェラーゼ活性をWallac Autolumat LB953 ルミノメーター（Gaithersburg, MD）でモニターした。IC₅₀は、ペプチドを欠失した対照試料と比較して50%の活性の減少を生じるペプチド濃度である。IC₅₀を、ラングミュア式 [y = k / (1 + ([ペプチド] / IC₅₀) + x)]（式中、y = ルシフェラーゼ活性、kおよびxは換算定数（scaling constant）である）にデータを当てはめることにより計算した。

30

【0104】

細胞/細胞融合アッセイ

40

細胞/細胞融合（すなわち、シンシチウム形成）の阻害を、HXB2エンベロープを発現するチャイニーズハムスター卵巣細胞（K. Kozarskyら、J. Acquir. Immune. Defic. Syndr., 2:163 (1989)）およびHeLa-CD4-LTR--gal細胞（M. Emerman, NIH AIDS Reagent program）を、異なる濃度のペプチドの存在下で共培養することによってアッセイした。混合した場合、これらの細胞はシンシチウム、または多核細胞を形成するか、-ガラクトシダーゼを発現する。細胞を共培養した約20時間後、シンシチウムを視覚化するために単層を5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル--D-ガラクトシドで染色した。シンシチウムを顕微鏡で視覚化し、手作業で計数する（シンシチウムを、3またはそれ以上の核を含有する融合細胞として得点づけた）。IC₅₀を、ラングミュア式 [

50

$y = k / (1 + [ペプチド] / IC_{50}) + x$ (式中、 y = シンシチウムの数、 k および x は換算定数 (scaling constant) である) にデータを当てはめることにより計算した。

【0105】

【表1】

表1 変異型N36/C34複合体の安定性およびC34変異型の阻害能

ペプチド	T_m (°C)	IC_{50} (nM) ウイルス侵入	IC_{50} (nM) 細胞融合
野生型	66	2.1 ± 0.31	0.55 ± 0.03
<u>くぼみ結合</u>			
Trp ⁶²⁸ →Ala	53	10 ± 2.0	3.8 ± 0.33
Trp ⁶³¹ →Ala	37	61 ± 16	15 ± 0.82
Ile ⁶³⁵ →Ala	55	4.1 ± 0.91	0.96 ± 0.12
<u>対照 残基</u>			
Met ⁶²⁹ →Ala	66	2.0 ± 0.27	0.74 ± 0.03
Arg ⁶³³ →Ala	65	2.6 ± 0.89	0.76 ± 0.07

10

20

30

【0106】

変異体C34ペプチド (10 μ M) を、円偏光二色性測定のためにリン酸緩衝化生理食塩水 (pH 7.0) 中のN36ペプチド (10 μ M) と複合体化させた。見かけ上の溶解温度 (T_m) を、222 nmでのCDシグナルの温度依存性から推定した。ウイルス侵入の阻害を、組換えルシフェラーゼ発現HIV-1を用いた細胞培養感染アッセイにおいて測定した。細胞-細胞融合の阻害を、シンシチウムアッセイにおいて測定した。平均および標準誤差は3連試行に由来する。

【0107】

同様に、記載したD-ペプチドの活性を、上記の2つのアッセイを用いて評価した。図6A~6Bおよび図8A~8Bに結果を示す。

40

【0108】

実施例5: IQ17/D10 pep1複合体およびリガンド非含有IQN17の結晶化
ペプチド精製、結晶化

ペプチドIQN17およびD10 pep1を、上記のようにFMOOCペプチド化学によって合成した。

【0109】

IQN17とD10 pep1との混合物の10 mg / mlストックを調製した。IQN17の最終濃度は約1.37 nMであり、D10 pep1の最終濃度は約1.51 mMであった。最初の結晶化の条件を、Crystal Kit IおよびII (Hampton Research) を用いて見出し、次いで至適化した。最もよい回折用結晶を成長さ

50

するために、 $1 \mu\text{l}$ の当該ストックを $1 \mu\text{l}$ の貯蔵緩衝液 (10% PEG 4000、0.1M NaCl pH 5.6、20% 2-プロパノール) に添加し、貯蔵緩衝液に対して平衡化させた。結晶は、空間群 P 3 2 1 ($a = b = 41.83$ オングストローム; $c = 84.82$ オングストローム; $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$) に属し、非対称単位において 1 つの IQN17/D10 pep1 モノマーを含有する。有用なオスミウム誘導体を、貯蔵溶液中の PEG 4000 の濃度を 4% 上昇させ、5 mM の最終濃度で (NH_4)₂OsCl₆ を貯蔵溶液に添加し、得られた溶液の $5 \mu\text{l}$ を、タンパク質結晶を含有するドロップに添加することによって生産した。データ収集の前に、天然および重原子誘導体の結晶を、20% PEG 4000、0.1M NaCl pH 5.6、20% 2-プロパノールを含有するクライオ溶液に移し、X-stream cryogenic crystal cooler (Molecular Structure Corporation) を用いて瞬間凍結させた。
10

【0110】

リガンド非含有 IQN17 の最もよい回折用結晶を、上記と同様の技術で成長させた: 1 (on) μl の IQN17 の 10 mg / ml 水溶液を $1 \mu\text{l}$ の貯蔵緩衝液 (1.0M 酒石酸 K、Na、0.1M NaHEPES pH 7.0) に添加し、貯蔵緩衝液に対して平衡化させた。瞬間凍結の前に、結晶を、23% グリセロールの最終濃度に増大した量のグリセロールを有する貯蔵溶液からなる緩衝液に移した。結晶は、空間群 C 2 2 2₁ ($a = 57.94$ オングストローム、 $b = 121.96$ オングストローム、 $c = 73.67$ オングストローム; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$) に属し、非対称単位において 1 つの IQN17 トリー₂₀ マーを含む。

【0111】

X 線データ収集および処理

最初のデータを、R 軸 IV エリア検出器に据え付けた Rigaku RU300 回転陽極 X 線発生装置 (Molecular Structure Corporation) で収集した。IQN17 の回折データを Quantum-4 CCD 検出器を用いて 100 K で、そして Advanced Light Source (Berkeley, USA) で 5.0.2 ビームライン (beamline) で収集した。IQN17/D10 pep1 に関する最終の天然の、および多波長変則回折 (multiwavelength anomalous diffraction; MAD) データを、Raxis-IV detector を用いて Howard Hughes Medical Institute Beamline X4A で収集した。MAD データに関して、オスミウム L-II 吸収端付近の 4 つの波長を、Os 誘導体結晶の蛍光スペクトルに基づいて選択した (表 2)。4 つの波長は: 1.1398 オングストローム、1.1403 オングストローム、1.1393 オングストローム、1.1197 オングストロームであった。データセット間の結晶崩壊を最小化するために、データセットを、20° バッチで収集し、次のバッチに移る前に各波長で同じバッチを収集することを可能にした。反射を、プログラム DENZO および SCALPEACK で積分し、計測した (Otwinski, Z. (1993)、Data Collection and Processing, Sawyer, L.、Isaacs, N. および Bailey, S. 編 (SERC, Daresbury Laboratory, Warrington, England)、pp. 55-62)。
30

【0112】

さらなる回折データ処理、位相決定およびマップ計算を、CCP4 一式 (suite) のプログラム (CCP4、Acta Cryst. D50: 760-763 (1994)) を用いて行った。強度をプログラム TRUNCATE で振幅に減少させ、Os L-II 吸収端に最も近い波長 (1、2、3) に関するデータセットを、離れた波長 (4) データセットまで SCALING で計測し除去した (表 2)。
40

【0113】

位相決定および結晶学的精密化

最初に、IQN17/D10pep1結晶に関する位相決定を、ポリセリン鎖に切断された側鎖を有する公開されたGCN4-pIQIおよびHIV-gp41構造に由来する理論モデルのIQN17構造(build)(Eckert, D. M.ら、(1998)J. Mol. Biol. 284: 859-865; Chan, D. C.ら、(1997)Cell 89, 263-273)を用いて分子置換技術で試みた。得られた分子置換溶液は、あいまいであり、電子密度図は、D10pep1ペプチドのコンホーメーションを示さなかった。しかし、分子置換位相は、差異および多義的なフーリエマップを用いて対応する誘導体中の単一のOs原子の座標を決定するのに充分に良好だった。重原子は、結晶学的3倍軸(cryaallographic three-fold axis)(0.222, 0.667, 0.047)に結合する。次いで、MAD位相を、プログラムMLPHARE(表2)で產生し、プログラムDMでより高い分解能に拡大した。1.5オングストロームでのMAD電子密度図の質は、例外的であり、明快さを伴ってIQN17およびD10pep1ペプチドの構造的詳細を示した。電子密度図解釈およびモデル構築をプログラムO(Jones, T. A.ら、(1991)Acta Crystallogr. D 47, 110-119)で行った。IQN17-D10pep1複合体の構造を、プログラムCNS(Breuninger, A. T.ら、Acta Crystallogr. D 54, 905-921(1998))を用いて精密化した。構造の正確さを、シミュレートしたアニーリング省略マップおよびプログラムWHAT CHECK(Hoff, R. WW.ら、Nature 381: 272(1996))でチェックした。IQN17およびD10pep1ペプチド(その鏡像に変換されていない場合)の全ての残基は、ラマチャンドランプロットの最も好ましい領域を占める。IQN17の2つの最もN末端の残基ならびにD10pep1ペプチドのArg-6およびArg-8の側鎖以外については、残基の大部分のコンホーメーションは充分に規定されている。

【0114】

リガンド非含有IQN17の構造を、プログラムAMORE(Navaza, J. (1994)Acta Crystallogr. A 50, 157-163)および試験モデルとして精密化されたIQN17/D10pep1構造のIQN17部分を用いて解析した。3倍非結晶学的平均化、溶媒平坦化およびプログラムDMとのヒストグラムマッチングを位相改善のために使用した。電子密度図解釈およびモデル構築をプログラムO(Jonesら、Acta Crystallogr. D 54, 905-921(1991))で行った。IQN17/D10pep1複合体の構造をプログラムCNS(Bruninger, A. T.ら、Acta Crystallogr. D 54, 905-921(1998))を用いて精密化した。

【0115】

結晶構造は、HIV感染性を阻害するより有効なおよび/または新規のD-ペプチド、ペプチド擬似体または他の低分子を設計するために使用され得る。

【0116】

実施例6 gp41のN-ヘリックス疎水性ポケットに結合する化合物を同定するための核磁気共鳴(NMR)法

A. IQN17疎水性ポケットとD-ペプチドとの特異的結合アッセイ
IQN17への各D-ペプチドの結合をアッセイするためにNMR実験を使用した。IQN17の単一のトリプトファン残基(Trp-571で示される)は、gp41の疎水性ポケットへの特異的結合の最良のプローブを提供する。酸化重水素(重水素水)緩衝液において、IQN17の単純な均一核一次元¹H NMRスペクトル(図9A、中段)は、この分子の他の全てのシグナルから特に充分に分離した、Trp-571インドール由来の5つのシグナルを示す。gp41ポケットへの結合に関して化合物を試験するために、2つの一次元¹H NMR測定を重水素化緩衝液中の試料で行った。最初に、IQN17の参照(対照)スペクトルを採取し、非結合形態のTrp571化学シフトを同定した。第2のスペクトルを、IQN17および目的の化合物を含有する試料で得た。選択任意の第3のD-ペプチド(もしくは他の低分子、または分子の混合物)もまた採取した。¹H

NMR実験をBruker AMX 500スペクトロメーターにおいて行った。データを、Silicon GraphicsコンピュータにおいてのFlex 98.0 (MSI)で処理し、全てのスペクトルをDSSに対して照会した。全ての実験を、100 mM NaCl、50 mMリン酸ナトリウム(pH 7.5)において25°で行った。使用した全ての緩衝液は、交換可能な骨格および側鎖のプロトンに由来する重複する共鳴を除去するために>99.7%D₂Oであった。溶質濃度は、個々のペプチドに関して0.3~1.0 mMの範囲であり、IQN17と各Dペプチドとの1:1複合体に関しては0.8~1.0 mMの範囲であった。

【0117】

2またはそれ以上の成分の単結合は、よりブロードなピーク(複合体の増大したサイズによる)および化学シフトにおける変化(遊離形態および結合形態の核により経験される異なる化学環境による)を生じることが予想される。疎水性ポケットへの特異的結合は、Trp-571化学シフトにおける変化、ならびにピークのブロード化によって示される。また、結合は、アッセイした分子(例えば、ペプチドおよび低有機分子)の化学シフトにおける類似した変化およびピーク幅により示されうる。図9Aは、これらの効果の例を示す: IQN17/D10 pep1a複合体のNMRスペクトルは、よりブロードなピークおよび2つの分離した化合物のいずれのスペクトルとも劇的に異なる化学シフトを示す。研究した全てのIQN17/D-ペプチド複合体は、化学シフト分散の程度に違いはあるが、類似した結果を示した。従って、結合は全てのケースで示された。

【0118】

D10 pep1における2つの保存されたTrp残基、および保存されたLeu残基が、IQN17ポケットの結合に直接関与するというX線結晶学的知見は、他のD-ペプチドがポケットに結合する場合にこれらの保存された残基が同様の様式で関与することを強く示唆する。これらの保存されたトリプトファン残基、およびIQN17のTrp-571は、結合界面を大いにより詳細に研究する機会を提供する。IQN17/D10 pep1結晶構造において、IQN17のTrp-571側鎖は、Trp-10インドール基の平面上のTrp-571のいくつかのプロトン(H₂, H_{2'}, H₃, H_{3'}; 芳香族環の4つのスカラー共役プロトン)によりD10 pep1のTrp-10と密接に接触する。この位置において、芳香族環電流相互作用(current interaction)(F. A. Bovey, Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (1988))は、それらのプロトンの内のいくつかの化学シフトを変化させ、理解されるような様式で高磁場にピークを移動させる(図9A、下段)。構造に基づく化学シフト予想プログラムSHIFTS(3.0b2版、K. Osapay, D. Sittkoff, D. Case)の使用はまた、Trp-571に由来するプロトンのみが、特にH₃プロトンが、大きな高磁場シフトを経験することを予想する。他のD-ペプチドがD10 pep1と同じ様式でIQN17ポケットに結合する場合、Trp-571とTrp-10との同様の並列(juxtaposition)が生じ、高磁場シフトしたピークを生じるはずである。研究した全てのD-ペプチド/IQN17複合体は、シフトの程度に違いはあるが、このようなピークを示した(図9B)。D10 pep1複合体は、最も極度の高磁場シフトを示し、D10 pep7aが最も小さな高磁場シフトを示した。これらの変化の振幅は非常に大きく、最も高磁場シフトしたプロトン(割り当てられ得る全てのケースにおいて、H₃)に関しておおよそ0.5~2 ppmの範囲である。比較すると、NMR実験よりSARにおける結合を検出するのにしばしば使用される化学シフトの差異(Shuker, S. B., Hajduk, P. J., Meadows, R. P., Fesik, S. W., Science 274: 1531-1534 (1996))は、頻繁に0.05~0.2 ppmの範囲である。広範囲の高磁場化学シフトが観察されたが、環電流効果は、距離および方向に高度に敏感でありうるので、小さな構造の差異が、化学シフトにおいてかなりの変化を生じるかもしれない。(観察された全ての高磁場シフトは、X線結晶構造から予測されたTrp側鎖のおおよその方向と一致する。)さらに、高磁場シフトしたピークは、これらのNMRスペクトルの他のものと比

10

20

30

40

50

較して幾分プロードである（交換プロセスのある型によるようである）、この効果は、D 10 pep 5 aとのおよびD 10 pep 7 aとの複合体について特に明白である。

【0119】

強く高磁場シフトしたピークが全ての単一の側鎖（ほぼ間違いなくTrp-571）に対応することを確認するために、二次元NMR（TOCSY）実験を、各々のIQN17/D-ペプチド複合体で行った。予想したように、TOCSY実験は、各複合体において、強く高磁場シフトした共鳴は全て同一の芳香族側鎖に属し、4スカラー共役プロトンの基として同定される。1例のTOCSYスペクトルを図9Cに示す。研究したいいくつかの複合体について、NOESY実験はまた、IQN17/D10 pep 1構造から予想したように、この側鎖と他の（割り当てられていない）芳香族基との接触を示している。6.8 ~ 7.6 ppm領域における激しいスペクトルの重複のために、潜在的なNOE交差ピークの全てを分離することはできなかった。J. Cavanaugh, W. J. Fairbrather, A. G. Palmer, N. J. Skelton, Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice (1996)に記載されるような2D NOESYおよびTOCSYの実験を、IQN17および各複合体の試料で30~90ms (NOESY) および30~70ms (TOCSY) の範囲のミックス時間により行った。11, 111 Hzおよび5555 Hzのスペクトル幅を、獲得 (acquisition) (t_2) および間接 (indirect) (t_1) の次元の各々に使用した。TOCSY実験には、DIPS1-2rcミックス配列 (J. Cavanaugh, M. Rance, J. Magn. Reson. Sery. A., 105: 328 (1993)) を使用した。

【0120】

我々は、アッセイした全てのD-ペプチドが、IQN17の疎水性ポケットに明白に結合すると結論付ける。さらに、これらのIQN17複合体の大多数（すなわち、D 10 pep 1、D 10 pep 3、D 10 pep 4、D 10 pep 6、D 10 pep 10、およびD 10 pep 12）において、D-ペプチドは、非常に類似した結合界面でポケットと接触し、Trp-571をTrp-10の芳香族環との近接した接触にもたらす。D 10 pep 5 aとの複合体およびD 10 pep 7 aとの複合体の場合には、より限られた化学シフト分散およびよりプロードなピークは、幾分他の様式の結合のわずかな可能性を生じさせるが、この結論はまた非常に妥当であるようである。

【0121】

本明細書中で使用された結合アッセイはまた、gp 41（例えば、IQN17中に見出されるような）の疎水性ポケットに他の分子の結合をアッセイするのに使用されうる。上記アッセイは、上記のD-ペプチドのセットに関するように、芳香族環がポケットに結合する場合に解釈することが特に容易である。しかし、いかなるポケット結合分子も、容易に注目すべき影響であるTrp-571の化学シフトを混乱させるはずである。さらに、結合において低分子自身によって産生された新規NMRシグナルもまた、結合の指標である。

【0122】

一次元の同核¹H NMRの使用は、特異的結合を決定するための、多次元の異核を超える有意な利点を提供する：（1）感受性がより高く、より迅速に試料をアッセイすることができる；交互に、より高い感受性は、低濃度のIQN17と推定上の結合因子との使用は、より高い親和性の化合物を、それらの多くを同時にスクリーニングすることを可能にする。（2）非アイソトープ標識したタンパク質は生産することが容易であり、より経済的である。しかし、同核または異核（¹⁵Nおよび/または¹³Cアイソトープ標識による）の二次元NMR実験もまた使用されうる。

【0123】

B. 化学ライブラリースクリーニング

上記（A）に記載される結合アッセイは、化学ライブラリー中に存在する多数の化合物をスクリーニングするのに使用されうる。単純な一次元の同核¹H NMR実験は、アイソ

10

20

30

40

50

トップ標識を必要とすることなく結合を評価するのに充分である。同核または異核 (^{15}N および / または ^{13}C アイソトープ標識による) 二次元 NMR 実験もまた使用されうる。単一化合物を、本プロセスの時にスクリーニングし得る。しかし、多数の化合物もまた、IQN 17 (または g p 4 1 N - ヘリックスコイルドコイルの任意の代表) と同一のアッセイで組み合わされ、同時にスクリーニングされうる。上記混合物の任意の成分によるポケットへの結合は、Trp - 571 化学シフトにおける変化によって示される。多数の化合物からの NMR シグナルは、共に Trp - 571 からのシグナルを不明瞭にする可能性を有する; 非結合分子に由来するこれらのシグナルは、当該技術分野で充分知られているパルスフィールドグラジエント技術を用いて排除されうる。これらの技術および市販されている NMR チューブサンプルチェンジャーの使用により、多数の化合物の自動スクリーニングが容易になる。10

【0124】

C. 多数の組み合わせ合成の産物の評価

上記 (B) に記載されるスクリーニングプロセスは、組み合わせ有機合成法を利用するこ^トとを意図しうる。かかる方法は、多数の化学的に関連する化合物を含む各ファミリーに関して、化合物の全ファミリーを作製するために使用されている。上記のシンプルなアッセイにより、全体の組み合わせ合成の産物が、同時にスクリーニングされうる。結合が示されない場合、その化合物のファミリーのいかなるメンバーにおいてもさらに注意を払う必要はない。単純な一次元の同核 ^1H NMR 実験は、アイソトープ標識を必要とすることなく結合を評価するのに充分である。同核または異核 (^{15}N および / または ^{13}C アイソトープ標識による) の二次元 NMR 実験もまた使用されうる。20

【0125】

【表 2】

表2 データ収集および精密化統計値

データ収集						10
結晶	λ (Å)	完全性 (%)	R_{sym}^1 (%)	分解能 (Å)		
IQN17	1.0000	89.5	3.7	2.1		
IQN17/D10	1.1197	93.8	4.8	1.5		
Os $\lambda 1$	1.1403	98.6	6.3	2.0		
Os $\lambda 2$	1.1399	96.8	9.7	2.0		
Os $\lambda 3$	1.1393	96.9	7.9	2.0		
Os $\lambda 4$	1.1197	97.0	8.4	2.0		

MAD位相統計学 (22.0-2.0A)									
誘導体	R_{iso}^2 (%)	R_{cullis}^3 Acentric	R_{cullis}^3 Centric	R_{cullis}^3 Anom.	Ph. Power ⁴ Acentric	Ph. Power ⁴ Centric	Occ. ⁵	Occ. ⁵	Anom.
Os $\lambda 1$ vs. $\lambda 4$	7.3	0.75	0.61	0.47	1.41	1.21	-0.039	0.337	
Os $\lambda 2$ vs. $\lambda 4$	5.2	0.83	0.71	0.44	1.04	1.15	-0.027	0.533	
Os $\lambda 3$ vs. $\lambda 4$	3.3	0.97	0.97	0.49	0.35	0.28	-0.005	0.295	

利点の全体図 (溶媒平坦化前) :	0.68	20							
精密化統計値									
結晶	非水素タンパク質 原 子	水 S	イオン	分解能 (Å)	反射 合計	R_{crys}^6	R_{free}^6	結合 (Å)	偏 向 (°)
IQN17/D10	516	150	1	10.0 - 1.5	13549	0.214	0.245	0.012	1.498
IQN17	1143	160	1	5.0 - 2.5	7541	0.282	0.352	0.009	1.252

¹ $R_{sym} = \sum \sum_j |I_j - \langle I \rangle| / \sum \sum_j |I_j|$ 、式中、 I_j は、反射 j の記録された強度であり、 $\langle I \rangle$ は複数の記録において記録された強度の平均である。

² $R_{iso} = \sum ||F_{(\lambda i)} - |F_{(\lambda i)}|| / \sum |F_{(\lambda i)}|$ 、式中、 $F_{(\lambda i)}$ は、波長 λi での構造係数であり、 $F_{(\lambda 4)}$ は、参照波長 $\lambda 4$ での構造係数である。

³ $R_{cullis} = \sum ||F_{(\lambda i)} - |F_{h(\lambda i), c}|| / \sum |F_{(\lambda i)}| = F_{(\lambda 4)} - |F_{h(\lambda 1), c}|$ 、式中、 $F_{h(\lambda i), c}$ は、計算された重原子構造因子である。

⁴ 位相倍率 = $\langle F_{h(\lambda i)} \rangle / E$ 、式中、 $\langle F_{h(\lambda i)} \rangle$ は、根平均二乗 (root-mean-square) 重原子構造因子であり、 E は閉鎖誤差 (closure error) の残渣欠失 (residual lack) である。

⁵ 占有率は、MLPHAREからの出力値である。

⁶ $R_{crys, free} = \sum ||F_{obs} - |F_{calc}|| / |F_{obs}|$ 、式中、結晶学的および遊離 R 係数は、ワーキングセットおよびテストセットの各々を用いて計算されている。テストセットは、10%の反射を含んでいた。

【0126】

本発明を、特にその好ましい態様に関して示し、記載してきたが、形式および細部における種々の変化が、付随する特許請求の範囲に規定される本発明の意図および範囲を逸脱することなくなされ得ることが当業者に理解される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、4, 3疎水性ヘプタドリピート (heptad repeats) (標準されたヘプタドリピート1およびヘプタドリピート2、それぞれN-ペプチド領域およびC-ペプチド領域ともいう) を含む2つの領域内に位置する、N36 (SGIVQQNNLLRAIEQQHLQLTVWGIKQLQARIL) (配列番号: 13) およびC34 (WMEWDREREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQEL) (配列番号: 14) のペプチドを示すHIV-1 gp41の概略図である。C34における下線部の残基は、本研究において変異させた。これらの残基のうち3個 (W、WおよびI) は、N36くぼみ内に突出するが、これらの残基のうちの2個 (MおよびR) は突出しない。FPは融合ペプチド；S-Sはジスルフィド結合；TMは膜貫通領域；IN

T R A はウイルス内領域。

【図2】 図2は、C34阻害能力とN36/C34安定性との相関を示すグラフである。Trp⁶³¹位における置換を有するC34ペプチドバリエントを、ウイルス侵入（黒丸）および細胞-細胞融合（白丸）の阻害について試験した。対応するN36/C34複合体の T_m （融解温度）に対してIC₅₀値を対数スケールでプロットする。置換の様子（identity）と化学構造を、対応するデータ点の下に示す。疎水性のかさ高さが増加する順では、置換は：グリシン（Gly）、アラニン（Ala）、L-アミノ酸（Abu）、バリン（Val）、ロイシン（Leu）、フェニルアラニン（Phe）、野生型残基トリプトファン（Trp）、およびL-（1-ナフチル）アラニン（Nal）であった。エラーバーは、3回の実験の標準誤差を示す。

【図3】 図3は、D-ペプチドのアミノ酸配列（配列番号：34、38、15、35、16、17、36、40、41、18および19）ならびにコンセンサス配列（配列番号：12）を示す。図示のように、各ペプチドは、N-末端でGAにより、C-末端でAAによりフランギングされており、N-末端にプロッキング基：（アセチル-GA-C-十量体-C-AA-CO NH₂；これはac-GA-C-十量体-C-AA-amと表すこともできる）を有する。アミノ酸残基を表すために使用する1文字記号は、以下の通りである：G=グリシン；A=アラニン；C=システイン；D=アスパラギン酸；L=ロイシン；K=リジン；E=グルタミン酸；W=トリプトファン；F=フェニルアラニン；R=アルギニン；H=ヒスチジン；S=セリン；およびQ=グルタミン。

【図4】 図4は、D-IQN17標的による鏡像ファージのディスプレイの概略図である。ここで、（1）ファージ選択のラウンドは、D-IQN17へのバインダー（binders）を同定するために行われる；（2）個々のクローンを配列決定する；（3）結合特異性を、ファージがD-IQN17のgp41領域に結合するか否かを調べることにより評価する；（4）結合するファージ配列であるD-ペプチドを作製する；および（5）D-ペプチドの抗HIV活性をアッセイする。

【図5】 図5Aおよび5Bは、D10 pep1に結合したIQN17の結晶構造を示す。IQN17は、連続的な三本鎖コイルであることを示し、D10 pep1の保存アミノ酸残基の結合は、HIV-gp41由来の17残基により形成される、IQN17の疎水性ポケットに対して存在することを示す。図5Aは、HIV-1 gp41残基に融合したGCN4-pI_QI残基からなるIQN17、およびIQN17の疎水性ポケット（囲まれた領域内）へのD10 pep1の結合を示す。該ポケットに結合するD-ペプチドは、枝分かれした伸長部により表わされる（すなわち、棒状に示した部分）。図5Bは、囲まれた領域の拡大であり、ポケット内に詰められた保存残基（Trp、Trp-Leu）およびグルタミン酸（Glu）を示す。

【図6】 図6Aおよび6Bは、本明細書に記載のD-ペプチドを用いたシンシチウムアッセイの結果を示す。図6Aはシンシチウムアッセイの結果のグラフである。図6Bは、1回またはそれ以上の実験の結果を伴うD-ペプチドのIC₅₀データを表わす。

【図7】 図7A～7Nは、IQN17に結合したD10 pep1の結晶構造の原子座標を列挙するPDBファイルであり、ここで、A鎖の0～28残基はGCN4-pI_QI配列（3個の変異を有する）に由来し、A鎖の29～45残基はHIV-gp41配列に由来し、D鎖の0～16残基はD-ペプチドを表し、整列した（ordered）水分子をWで表し、結合した塩化物イオンはI鎖で表す。残基0はアセチル基を表す。PDBファイルは一量体を表わし；三量体は結晶学的対称により形成される。

【図8】 図8Aおよび8Bは、D-ペプチドによるHIV-1膜融合の阻害の評価の結果を示す。図8AはD-ペプチドを用いないシンシチウムアッセイの結果を示す。図8BはD-ペプチドを用いるシンシチウムアッセイの結果を示す。

【図9】 図9A～9Cは、IQN17/D-ペプチド複合体の芳香族残基を特性付けする¹H NMR実験の結果を示す。図9Aは、D10 pep1a（上）、IQN17（中央）およびD10 pep1aとIQN17の1:1複合体（下）の1D-NMRスペクトルを示す。x軸は下の（C）と同じである。Trp-571の4個のスカラー結合（sc）

10

20

30

40

50

alar-coupled) 芳香環プロトンに割り当てられた高磁場側ピークを示す。下部痕跡のマークしていない(unmarked)高磁場側ピークは、割り当てられていないH共鳴に対応する。図9Bは、IQN17と(標識された)各D-ペプチドとの1:1複合体の1Dスペクトルを示す。同じ4個のプロトンがいくつかのスペクトルにより示されている。図9Cは、IQN17/D10pep1a複合体の2D-NMR TOCSYスペクトルを示す。これらの4個のトリプトファンプロトンに関連する交差ピーク(cross-peak)を、特定の割当(specific assignment)とともに示す。TOCSY混合時間は42msであった。

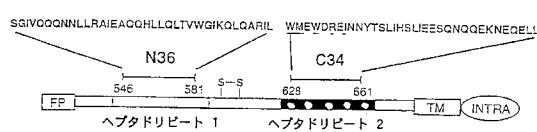
【図10】図10は、X線結晶学により測定した、IQN17との複合体における場合のD10pep1ペプチドの立体配座を示す。

【図11】図11A~11Vは、IQN17の結晶構造の原子座標を列挙するPDBファイルであり、ここで、IQN17三量体のA、BおよびC鎖の残基0~28はGCN4-pIQ配列(3個の変異を有する)に由来し、A、BおよびC鎖の残基29~45はHIVgp41に由来し、整列した水分子をWで表わし、結合した塩化物イオンをI鎖で表す。PDBファイルは結晶学的に非対称な単位で三量体全体を表わす。

10

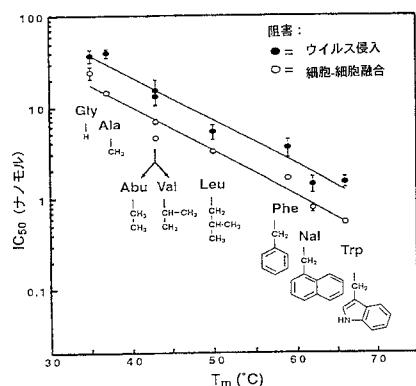
【図1】

Figure 1



【図2】

Figure 2: N36/C34安定性とのC34阻害能力の相関



【図3】

Figure 3: D-ペプチド配列

Figure 3 displays the D-peptide sequence for various peptides (D10pep3 to D10pep12) and a consensus sequence. The peptides are shown as Ac-G sequence followed by a variable part and a CONH2 group. The consensus sequence is CXXXXXEWXWL.

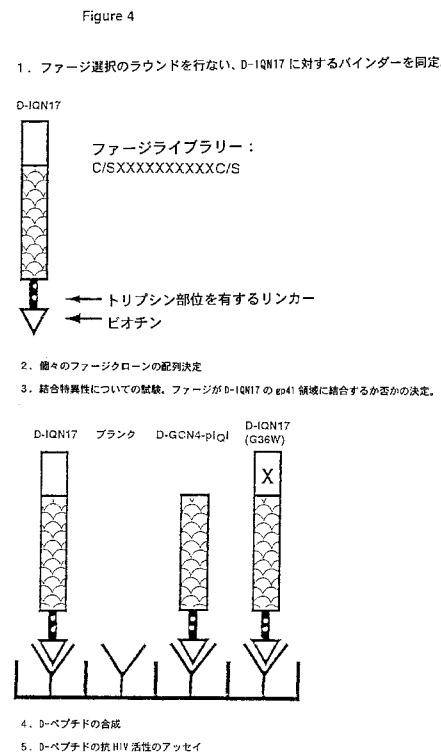
D10pep3 :	Ac- G A C E A R H R E W A W L C A A - CONH2
D10pep4 :	Ac - K R G A C E A R H R E W A W L C A A - CONH2
D10pep5 :	Ac - K K G A C E L L G Q P E W F W L C A A - CONH2
D10pep6 :	Ac - K K G A C E L L G Q P E W E W L C A A - CONH2
D10pep7a :	Ac - K K G A C L L R A P E W G W L C A A - CONH2
D10pep10:	Ac - K K G A C M R G E W E W S W L C A A - CONH2
D10pep12:	Ac - K K G A C P P L N K E W A W L C A A - CONH2

コンセンサス配列

式:

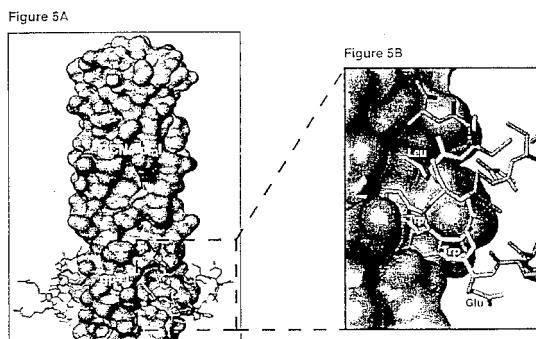
- G = グリシン
- A = アラニン
- C = システィン
- D = フィバラギン酸
- I = ロイシン
- K = リジン
- E = グルタミン酸
- W = トリプトファン
- F = フェニルアラニン
- R = アルギニン
- H = ヒスチジン
- S = セリン
- Q = グルタミン

【図4】

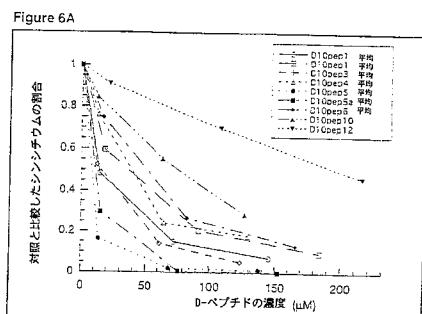


【図5】

IQN17 に対する D-ペプチドの関係



【図6】



【図7】

REMARK 3 REFINEMENT.
REMARK 3 PROGRAM : CNS 0.5
REMARK 3 AUTHORS : BRUNGER, ADAMS, CLORE, DELANG,
REMARK 3 CRRCS, GROSSE-KUNSTLEVE, JEANG,
REMARK 3 KUSIMENSKI, NILGREN, PANNU, READ,
REMARK 3 RICE, SIMMONSON, WARREN
REMARK 3
REMARK 3 DATA USED IN REFINEMENT.
REMARK 3 RESOLUTION RANGE HIGH (ANGSTROMS) : 1.50
REMARK 3 RESOLUTION RANGE LOW (ANGSTROMS) : 10.00
REMARK 3 DATA CUTOFFS : 0.0
REMARK 3 DATA CUTOFFS HIGH (SIGMA(P)) : 646189.44
REMARK 3 DATA CUTOFFS LOW (SIGMA(P)) : 0.000000
REMARK 3 COMPLETENESS (WORKING+TEST) (%) : 94.6
REMARK 3 NUMBER OF REFLECTIONS : 13549
REMARK 3
REMARK 3 FIT TO DATA USED IN REFINEMENT.
REMARK 3 CROSS-VALIDATION METHOD : THREEMUSHOUT
REMARK 3 FREE R VALUE TEST SET SELECTION : RANDOM
REMARK 3 R VALUE : 0.214
REMARK 3 FREE R VALUE : 0.245
REMARK 3 FREE R VALUE TEST SET SIZE (%) : 10.1
REMARK 3 FREE R VALUE TEST SET COUNT : 1352
REMARK 3 ESTIMATED ERROR OF FREE R VALUE : 0.007
REMARK 3
REMARK 3 FIT IN THE HIGHEST RESOLUTION BIN.
REMARK 3 TOTAL NUMBER OF BINS USED : 8
REMARK 3 BIN RESOLUTION RANGE HIGH (Å) : 1.50
REMARK 3 BIN RESOLUTION RANGE LOW (Å) : 10.00
REMARK 3 BIN COMPLETENESS (WORKING+TEST) (%) : 96.1
REMARK 3 NUMBER OF REFLECTIONS : 20006
REMARK 3 BIN R VALUE (WORKING SET) : 0.222
REMARK 3 BIN FREE R VALUE : 0.270
REMARK 3 BIN FREE R VALUE TEST SET SIZE (%) : 9.8
REMARK 3 BIN FREE R VALUE TEST SET COUNT : 219
REMARK 3 ESTIMATED ERROR OF BIN FREE R VALUE : 0.018
REMARK 3
REMARK 3 NUMBER OF NON-HYDROGEN ATOMS USED IN REFINEMENT : 0
REMARK 3 PROTEIN ATOMS : 0
REMARK 3 NUCLEIC ACID ATOMS : 0
REMARK 3 HETEROGENE ATOMS : 0
REMARK 3 SOLVENT ATOMS : 0
REMARK 3
REMARK 3 B VALUES.
REMARK 3 FROM WILSON PLOT : B1(A*1) : 21.6
REMARK 3 MEAN B VALUE (OVERALL, A*1) : 39.7
REMARK 3 OVERALL ANISOTROPIC B VALUE :
REMARK 3 B11 (A*1) : 3.51
REMARK 3 B22 (A*1) : 3.51
REMARK 3 B33 (A*1) : -7.20
REMARK 3 B12 (A*1) : 7.1
REMARK 3 B23 (A*1) : 0.30
REMARK 3 B32 (A*1) : 0.00
REMARK 3
REMARK 3 BULK SOLVENT MODELING.
REMARK 3 METHOD USED : PLATINUM MODEL
REMARK 3 RCSL : 0.354084

Figure 7A

Figure 7B

Figure 7C

ATOM	54	OD1	GLU	A	6	33.016	3.931	-1.657	1.00	52.52	A
ATOM	55	OD2	GLU	A	6	33.016	4.682	-17.116	1.00	52.25	A
ATOM	56	C	GLU	A	6	23.998	5.605	-11.600	1.00	49.32	A
ATOM	57	O	GLU	A	6	23.473	5.212	-10.859	1.00	49.24	A
ATOM	58	S	GLU	A	6	23.473	5.212	-10.859	1.00	49.24	A
ATOM	59	CA	ASP	A	7	23.173	4.970	-11.703	1.00	47.23	A
ATOM	60	CB	ASP	A	7	23.173	4.625	-11.703	1.00	47.92	A
ATOM	61	CD	ASP	A	7	27.450	1.588	-12.768	1.00	48.33	A
ATOM	62	OD1	ASP	A	7	26.523	2.741	-12.739	1.00	48.43	A
ATOM	63	DB2	ASP	A	7	28.154	3.680	-12.690	1.00	48.34	A
ATOM	64	O	ASP	A	7	26.283	4.882	-12.773	1.00	45.72	A
ATOM	65	S	ASP	A	7	26.283	4.882	-12.773	1.00	45.72	A
ATOM	66	M	LYS	A	8	26.551	7.209	-10.201	1.00	44.57	A
ATOM	67	CA	LYS	A	8	26.703	8.195	-9.129	1.00	43.32	A
ATOM	68	CB	LYS	A	8	26.958	8.598	-9.708	1.00	43.49	A
ATOM	69	S	LYS	A	8	25.899	10.076	-10.695	1.00	44.78	A
ATOM	70	CD	LYS	A	8	26.342	11.123	-11.705	1.00	45.38	A
ATOM	71	CE	LYS	A	8	26.888	11.820	-11.705	1.00	45.54	A
ATOM	72	O	LYS	A	8	25.153	12.228	-12.069	1.00	45.55	A
ATOM	73	C	LYS	A	8	25.423	8.172	-9.331	1.00	41.20	A
ATOM	74	O	LYS	A	8	25.419	8.346	-7.058	1.00	40.81	A
ATOM	75	N	ILE	A	9	24.309	7.935	-9.022	1.00	39.40	A
ATOM	76	CA	ILE	A	9	23.015	7.852	-8.333	1.00	39.75	A
ATOM	77	CB	ILE	A	9	22.800	7.852	-8.333	1.00	39.14	A
ATOM	78	S	ILE	A	9	20.500	7.251	-8.759	1.00	37.06	A
ATOM	79	CG1	ILE	A	9	21.431	9.303	-8.812	1.00	36.95	A
ATOM	80	CH1	ILE	A	9	20.803	9.449	-11.066	1.00	36.85	A
ATOM	81	C	ILE	A	9	22.927	6.638	-7.418	1.00	36.07	A
ATOM	82	O	ILE	A	9	22.450	6.765	-7.292	1.00	34.70	A
ATOM	83	N	GLU	A	10	23.515	5.478	-5.707	1.00	24.25	A
ATOM	84	CA	GLU	A	10	23.515	5.478	-5.707	1.00	23.94	A
ATOM	85	CB	GLU	A	10	23.884	3.103	-5.747	1.00	22.37	A
ATOM	86	CS	GLU	A	10	23.290	1.705	-6.391	1.00	23.10	A
ATOM	87	CD	GLU	A	10	24.287	4.427	-7.747	1.00	23.36	A
ATOM	88	OE1	GLU	A	10	24.327	6.442	-8.999	1.00	34.07	A
ATOM	89	OE2	GLU	A	10	24.544	6.630	-7.064	1.00	32.45	A
ATOM	90	C	GLU	A	10	24.244	6.569	-7.778	1.00	35.23	A
ATOM	91	O	GLU	A	10	24.244	6.569	-7.778	1.00	35.14	A
ATOM	92	N	GLU	A	11	25.259	5.380	-6.100	1.00	31.92	A
ATOM	93	CA	GLU	A	11	26.165	5.731	-5.018	1.00	31.36	A
ATOM	94	CB	GLU	A	11	27.405	6.445	-5.563	1.00	33.18	A
ATOM	95	CS	GLU	A	11	28.139	6.333	-4.423	1.00	25.22	A
ATOM	96	CD	GLU	A	11	29.120	5.643	-5.822	1.00	36.85	A
ATOM	97	OE1	GLU	A	11	29.188	5.643	-5.822	1.00	36.00	A
ATOM	98	OE2	GLU	A	11	30.322	5.574	-3.579	1.00	38.85	A
ATOM	99	C	GLU	A	11	25.456	6.321	-5.998	1.00	30.15	A
ATOM	100	O	GLU	A	11	25.555	6.377	-2.795	1.00	38.89	A
ATOM	101	N	ILE	A	12	24.737	7.640	-4.471	1.00	29.09	A
ATOM	102	CA	ILE	A	12	24.041	8.533	-5.559	1.00	28.34	A
ATOM	103	CB	ILE	A	12	25.325	8.533	-5.559	1.00	28.75	A
ATOM	104	S	ILE	A	12	25.066	18.183	-5.300	1.00	28.70	A
ATOM	105	CSD1	ILE	A	12	24.327	13.743	-4.701	1.00	28.64	A
ATOM	106	CD1	ILE	A	12	23.922	11.603	-5.829	1.00	29.39	A
ATOM	107	C	ILE	A	12	23.984	7.252	-7.561	1.00	27.83	A
ATOM	108	O	ILE	A	12	23.802	7.948	-7.561	1.00	26.45	A
ATOM	109	N	GLU	A	13	25.215	6.790	-3.423	1.00	27.40	A
ATOM	110	CA	GLU	A	13	25.112	5.985	-7.812	1.00	28.32	A
ATOM	111	CB	GLU	A	13	26.579	5.067	-3.805	1.00	28.34	A

Figure 7.1

ATOM	112	CD	GLU A 13	19.760	5.927	-4.819	1.00	29.72	
ATOM	113	CD	GLU A 13	19.818	5.118	-5.904	1.00	31.57	
ATOM	114	CG	GLU A 13	19.671	4.159	-4.753	1.00	33.62	
ATOM	115	CA	GLU A 13	19.796	4.955	-5.620	1.00	34.84	
ATOM	116	CB	GLU A 13	19.575	5.110	-5.878	1.00	34.36	
ATOM	117	CO	GLU A 13	21.421	4.812	-5.587	1.00	25.75	
ATOM	118	NA	SER A 14	21.179	4.638	-5.958	1.00	26.17	
ATOM	119	CA	SER A 14	21.389	5.792	-5.995	1.00	26.21	
ATOM	120	CB	SER A 14	21.184	5.124	-5.125	1.00	26.72	
ATOM	121	CG	SER A 14	21.389	5.792	-5.995	1.00	26.21	
ATOM	122	OD	SER A 14	21.244	4.626	-5.222	1.00	25.81	
ATOM	123	O	SER A 14	21.075	4.149	-4.139	1.00	25.13	
ATOM	124	NA	LYS A 15	24.753	5.840	0.009	1.00	24.70	
ATOM	125	CA	LYS A 15	25.095	6.713	1.151	1.00	25.42	
ATOM	126	CB	LYS A 15	25.805	7.971	0.672	1.00	26.20	
ATOM	127	CG	LYS A 15	27.256	7.762	0.285	1.00	29.07	
ATOM	128	CD	LYS A 15	27.971	8.000	0.000	1.00	30.37	
ATOM	129	CE	LYS A 15	23.338	8.924	-6.482	1.00	27.96	
ATOM	130	NE	LYS A 15	23.567	7.745	-5.523	1.00	34.63	
ATOM	131	CG	LYS A 15	23.824	7.102	1.638	1.00	24.45	
ATOM	132	O	LYS A 15	23.862	7.279	3.172	1.00	24.50	
ATOM	133	NA	GLN A 16	22.708	7.258	1.247	1.00	24.12	
ATOM	134	CA	GLN A 16	23.450	5.588	-0.804	1.00	23.82	
ATOM	135	CB	GLN A 16	23.750	6.781	-0.804	1.00	23.82	
ATOM	136	CG	GLN A 16	19.529	8.343	1.331	1.00	25.64	
ATOM	137	CD	GLN A 16	16.143	5.330	0.004	1.00	32.36	
ATOM	138	OE1	GLN A 16	18.015	8.498	-0.871	1.00	34.89	
ATOM	139	NE2	GLN A 16	18.156	10.556	-3.135	1.00	32.74	
ATOM	140	CG	GLN A 16	21.307	6.447	3.838	1.00	23.67	
ATOM	141	CD	GLN A 16	21.546	5.681	3.982	1.00	22.00	
ATOM	142	CA	GLN A 16	21.160	5.012	3.615	1.00	21.83	
ATOM	143	CA	LYS A 17	20.798	4.057	-1.179	1.00	22.59	
ATOM	144	CB	LYS A 17	20.393	2.756	2.357	1.00	22.66	
ATOM	145	CG	LYS A 17	20.340	1.532	3.055	1.00	26.69	
ATOM	146	CE	LYS A 17	18.837	1.579	1.552	1.00	29.27	
ATOM	147	CE	LYS A 17	18.177	0.637	4.051	1.00	31.75	
ATOM	148	CD	LYS A 17	18.877	0.648	0.000	1.00	34.25	
ATOM	149	C	LYS A 17	21.718	5.815	4.495	1.00	28.00	
ATOM	150	O	LYS A 17	22.261	3.747	5.515	1.00	21.02	
ATOM	151	N	LYS A 18	23.001	4.306	4.233	1.00	21.81	
ATOM	152	CA	LYS A 18	18.190	3.909	4.102	1.574	1.00	21.74
ATOM	153	CG	LYS A 18	25.348	4.544	4.964	1.00	24.34	
ATOM	154	CG	LYS A 18	26.029	5.322	4.406	1.00	27.30	
ATOM	155	CD	LYS A 18	27.070	5.287	3.016	1.00	27.03	
ATOM	156	CE	LYS A 18	27.972	5.258	4.058	1.00	30.45	
ATOM	157	NZ	LYS A 18	29.293	6.010	4.742	1.00	33.37	
ATOM	158	C	LYS A 18	23.552	5.376	6.378	1.00	20.62	
ATOM	159	O	LYS A 18	23.565	5.138	-5.777	1.00	19.85	
ATOM	160	N	LYS A 19	23.302	6.532	5.867	1.00	19.99	
ATOM	161	CA	LYS A 19	22.685	7.636	6.762	1.00	19.96	
ATOM	162	CB	LYS A 19	22.990	8.000	6.762	1.00	19.96	
ATOM	163	CG	LYS A 19	21.354	8.944	6.682	1.00	20.30	
ATOM	164	CG	ILE A 19	23.756	9.499	5.464	1.00	21.49	
ATOM	165	CD1	ILE A 19	23.569	10.495	4.296	1.00	21.18	
ATOM	166	C	ILE A 19	21.400	7.221	-5.75	1.00	20.44	
ATOM	167	O	ILE A 19	21.322	7.453	8.735	1.00	20.23	
ATOM	168	N	GLU A 20	20.429	6.655	5.555	1.00	20.24	
ATOM	169	CA	GLU A 20	19.230	6.149	5.503	1.00	20.43	

Figure 7E

ATOM	176	CB	GLU A	20	16.221	5.606	6.484	1.00	22.94	A
ATOM	177	CG	GLU A	20	16.766	6.671	5.499	1.00	25.61	A
ATOM	178	CD	GLU A	20	16.961	4.871	4.378	1.00	29.04	A
ATOM	179	CE	GLU A	20	16.242	6.981	3.599	1.00	30.40	A
ATOM	180	CB	GLU A	20	15.523	5.109	6.576	1.00	20.88	A
ATOM	181	CG	GLU A	20	16.917	5.127	9.645	1.00	26.23	A
ATOM	182	CD	GLU A	20	20.478	4.126	8.161	1.00	20.57	A
ATOM	183	CA	GLU A	20	20.500	3.127	5.328	1.00	22.87	A
ATOM	184	CD	GLU A	20	21.594	7.169	11.901	1.00	24.15	A
ATOM	185	CG	GLU A	20	20.875	1.155	7.872	1.00	25.28	A
ATOM	186	OD1	GLU A	20	19.575	0.986	0.091	1.00	28.26	A
ATOM	187	OD2	GLU A	20	21.509	0.549	6.878	1.00	26.73	A
ATOM	188	CD	ASN A	21	16.221	5.606	6.484	1.00	22.94	A
ATOM	189	CG	ASN A	21	21.595	3.446	11.744	1.00	26.00	A
ATOM	190	CD	ASN A	21	20.505	3.553	10.274	1.00	20.89	A
ATOM	191	CA	ASN A	21	23.007	5.548	11.348	1.00	20.36	A
ATOM	192	CD	GLU A	22	24.059	6.516	10.825	1.00	22.89	A
ATOM	193	CG	GLU A	22	24.914	7.169	11.901	1.00	25.86	A
ATOM	194	CD	GLU A	22	25.513	6.170	12.981	1.00	27.97	A
ATOM	195	OD1	GLU A	22	26.125	5.156	13.441	1.00	30.05	A
ATOM	196	OD2	GLU A	22	25.376	6.424	14.213	1.00	29.95	A
ATOM	197	CB	GLU A	22	21.988	6.264	13.445	1.00	28.76	A
ATOM	198	CG	GLU A	22	21.062	6.951	11.511	1.00	18.92	A
ATOM	199	CA	ILE A	23	19.955	7.670	12.254	1.00	18.60	A
ATOM	200	CB	ILE A	23	19.012	8.388	11.244	1.00	18.79	A
ATOM	201	CG	ILE A	23	17.671	8.764	11.889	1.00	20.11	A
ATOM	202	CD	ILE A	23	19.735	9.598	11.244	1.00	20.45	A
ATOM	203	CA	ILE A	23	19.100	9.549	11.022	1.00	22.51	A
ATOM	204	CB	ILE A	23	19.143	6.687	11.118	1.00	19.09	A
ATOM	205	CG	ILE A	23	18.807	7.005	12.260	1.00	18.74	A
ATOM	206	CD	ILE A	23	18.903	5.479	12.617	1.00	18.44	A
ATOM	207	CA	ILE A	23	18.183	4.517	13.420	1.00	18.96	A
ATOM	208	CB	ILE A	24	17.628	3.257	15.573	1.00	19.39	A
ATOM	209	CG	ILE A	24	19.947	1.136	14.665	1.00	18.86	A
ATOM	210	CD	ILE A	24	19.343	5.167	14.665	1.00	20.02	A
ATOM	211	CA	ILE A	24	19.745	4.028	14.568	1.00	18.57	A
ATOM	212	CB	ILE A	24	21.111	3.867	15.709	1.00	19.19	A
ATOM	213	CG	ILE A	24	21.852	3.342	15.287	1.00	20.85	A
ATOM	214	CD	ILE A	24	21.671	1.889	14.627	1.00	23.87	A
ATOM	215	CA	ILE A	24	21.408	1.536	14.256	1.00	25.32	A
ATOM	216	CB	ILE A	24	20.943	9.745	17.006	1.00	19.34	A
ATOM	217	CG	ILE A	24	22.821	8.537	15.796	1.00	19.86	A
ATOM	218	CD	ILE A	24	23.144	9.587	14.721	1.00	21.82	A
ATOM	219	CA	ILE A	24	19.876	7.101	17.957	1.00	18.02	A
ATOM	220	CB	ILE A	24	19.875	7.580	19.055	1.00	17.73	A
ATOM	221	CG	ILE A	24	17.069	7.069	17.191	1.00	17.60	A
ATOM	222	CD	ILE A	24	18.751	7.107	17.191	1.00	17.60	A
ATOM	223	CA	LYS A	27	17.450	7.127	17.853	1.00	17.90	A

Figure 7F

ATOM	224	CB	LYS A	27	16.221	5.606	6.484	1.00	22.94	A
ATOM	225	CG	LYS A	27	16.229	5.526	6.021	1.00	25.61	A
ATOM	226	CD	LYS A	27	16.951	5.127	9.645	1.00	29.04	A
ATOM	227	CE	LYS A	27	16.242	6.981	3.599	1.00	30.40	A
ATOM	228	CB	LYS A	27	15.523	5.109	6.576	1.00	20.88	A
ATOM	229	CG	LYS A	27	16.917	5.127	9.645	1.00	26.23	A
ATOM	230	CD	LYS A	27	16.242	6.981	3.599	1.00	30.40	A
ATOM	231	CE	LYS A	27	16.242	6.981	3.599	1.00	30.40	A
ATOM	232	CB	LYS A	27	16.221	5.606	6.484	1.00	22.94	A
ATOM	233	CG	LYS A	27	16.229	5.526	6.021	1.00	25.61	A
ATOM	234	CD	LYS A	27	16.951	5.127	9.645	1.00	29.04	A
ATOM	235	CE	LYS A	27	16.242	6.981	3.599	1.00	30.40	A
ATOM	236	CB	LYS A	27	15.523	5.109	6.576	1.00	20.88	A
ATOM	237	CG	LYS A	27	16.917	5.127	9.645	1.00	26.23	A
ATOM	238	CD	LYS A	27	16.242	6.981	3.599	1.00	30.40	A
ATOM	239	CE	LYS A	27	16.242	6.981	3.599	1.00	30.40	A
ATOM	240	CB	GLN A	41	14.706	9.498	26.773	1.00	14.31	A
ATOM	241	CG	GLN A	41	13.380	9.811	27.323	1.00	15.35	A
ATOM	242	CD	GLN A	41	15.096	0.571	25.110	1.00	15.04	A
ATOM	243	CA	GLN A	41	15.325	8.526	29.041	1.00	12.55	A
ATOM	244	CB	GLN A	41	14.997	9.016	30.131	1.00	13.43	A
ATOM	245	CG	GLN A	41	15.354	7.210	28.857	1.00	13.04	A
ATOM	246	CD	GLN A	41	14.946	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	247	CA	GLN A	41	14.946	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	248	CB	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	249	CG	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	250	CD	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	251	CA	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	252	CB	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	253	CG	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	254	CD	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	255	CA	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	256	CB	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	257	CG	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	258	CD	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	259	CA	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	260	CB	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	261	CG	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	262	CD	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	263	CA	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	264	CB	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	265	CG	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	266	CD	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	267	CA	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	268	CB	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	269	CG	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	270	CD	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	271	CA	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	272	CB	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	273	CG	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	274	CD	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	275	CA	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	276	CB	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	277	CG	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	278	CD	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	279	CA	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	280	CB	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	281	CG	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	282	CD	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	283	CA	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	284	CB	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	285	CG	GLN A	41	14.752	6.289	29.908	1.00	13.11	A
ATOM	286	CD	GLN A	41	14.					

ATOM 403 SG DCS D 3 19.501 -2.991 25.840 1.00 30.98
 ATOM 417 N DLU D 4 15.613 -4.756 25.474 1.00 31.68
 ATOM 414 CR DLU D 4 14.770 -9.505 28.834 1.00 32.07
 ATOM 407 CR DLU D 4 13.987 -10.290 28.834 1.00 32.07
 ATOM 406 CG DLU D 4 13.060 -4.844 27.397 1.00 35.53
 ATOM 407 CG DLU D 4 13.663 -3.568 26.500 1.00 36.26
 ATOM 408 OEL DLU D 4 14.422 -2.859 17.182 1.00 37.11
 ATOM 409 OEL DLU D 4 13.367 -3.264 26.323 1.00 37.45
 ATOM 410 C DLU D 4 14.775 -6.284 30.120 1.00 32.38
 ATOM 411 C DLU D 4 14.882 -6.833 30.133 1.00 32.19
 ATOM 412 N DLU D 5 13.022 -5.337 31.196 1.00 30.98
 ATOM 413 CR DLU D 5 13.098 -5.566 32.611 1.00 30.63
 ATOM 414 CR DLU D 5 14.984 -4.396 33.465 1.00 30.93
 ATOM 415 C DLU D 5 16.362 -6.340 33.408 1.00 30.19
 ATOM 416 O DLU D 5 15.387 -7.144 24.027 1.00 30.50
 ATOM 417 O DLU D 5 15.425 -6.636 22.121 1.00 29.95
 ATOM 418 GA DLU D 5 15.579 -6.693 22.121 1.00 29.95
 ATOM 419 CR DLU D 6 18.480 -8.408 22.359 1.00 31.45
 ATOM 420 CR DLU D 6 18.169 -8.847 30.569 1.00 34.88
 ATOM 421 CR DLU D 6 19.387 -8.765 30.070 1.00 37.42
 ATOM 422 ND DLU D 6 19.715 -7.430 29.567 1.00 40.28
 ATOM 423 CR DLU D 6 20.151 -7.134 28.370 1.00 40.89
 ATOM 424 CR DLU D 6 20.418 -7.134 28.370 1.00 40.89
 ATOM 425 CG DLU D 6 19.449 -5.391 30.515 1.00 30.55
 ATOM 426 C DLU D 6 19.333 -6.582 33.833 1.00 37.29
 ATOM 427 O DLU D 6 19.994 -7.422 34.422 1.00 37.43
 ATOM 428 N DLU D 7 19.190 -5.379 34.342 1.00 24.48
 ATOM 429 CR DLU D 7 19.731 -5.018 30.624 1.00 22.04
 ATOM 430 CR DLU D 7 19.870 -3.288 36.264 1.00 32.68
 ATOM 431 CR DLU D 7 19.717 -3.288 36.264 1.00 32.68
 ATOM 432 CG DLU D 7 17.178 -5.587 36.524 1.00 24.08
 ATOM 433 ND1 DLU D 7 16.653 -3.445 37.187 1.00 25.78
 ATOM 434 CR DLU D 7 15.595 -4.134 37.608 1.00 26.45
 ATOM 435 NE2 DLU D 7 15.894 -5.412 37.562 1.00 25.11
 ATOM 436 C DLU D 7 21.156 -4.636 37.129 1.00 21.84
 ATOM 437 O DLU D 7 21.412 -3.743 36.536 1.00 20.32
 ATOM 438 H DLU D 7 19.862 -4.636 37.129 1.00 20.32
 ATOM 439 CA DLU D 8 22.484 -5.123 36.778 1.00 19.20
 ATOM 440 CB DLU D 8 24.284 -5.393 36.755 1.00 20.87
 ATOM 441 CG DLU D 8 24.175 -7.425 36.459 1.00 26.97
 ATOM 442 CD DLU D 8 24.743 -8.307 37.631 1.00 29.07
 ATOM 443 NE DLU D 8 24.581 -9.502 37.325 1.00 31.54
 ATOM 444 CS DLU D 8 25.258 -10.189 36.352 1.00 31.94
 ATOM 445 NH1 DLU D 8 24.959 -10.185 36.352 1.00 31.98
 ATOM 446 NH2 DLU D 8 24.959 -10.182 36.352 1.00 31.98
 ATOM 447 C DLU D 8 22.985 -3.712 35.873 1.00 17.95
 ATOM 448 O DLU D 8 24.855 -3.361 35.124 1.00 17.42
 ATOM 449 N DLU D 9 23.407 -2.931 36.793 1.00 16.93
 ATOM 450 CA DLU D 9 23.900 -1.578 36.952 1.00 15.49
 ATOM 451 CB DLU D 9 23.358 -2.954 38.261 1.00 16.35
 ATOM 452 CG DLU D 9 23.358 -2.954 38.261 1.00 16.35
 ATOM 453 CD DLU D 9 20.996 -1.816 36.786 1.00 14.82
 ATOM 454 OEL DLU D 9 21.407 -5.392 36.584 1.00 19.63
 ATOM 455 CR DLU D 9 18.933 -1.499 39.310 1.00 20.12
 ATOM 456 C DLU D 9 23.601 -0.717 35.767 1.00 15.97
 ATOM 457 C DLU D 9 24.142 -0.593 35.635 1.00 15.24
 ATOM 458 N DLU D 10 22.747 -1.186 34.844 1.00 15.56
 ATOM 459 CA DLU D 10 23.462 -0.435 33.611 1.00 15.31

Figure 7J

ATOM 460 CB DLU D 10 20.560 -0.187 33.420 1.00 16.05
 ATOM 461 CG DLU D 10 20.364 2.300 34.384 1.00 15.28
 ATOM 462 CD DLU D 10 20.364 2.300 34.384 1.00 15.28
 ATOM 463 CEN DLU D 10 19.734 -1.075 33.343 1.00 15.74
 ATOM 464 CEN DLU D 10 19.501 0.512 35.343 1.00 15.74
 ATOM 465 CEN DLU D 10 19.501 0.512 35.343 1.00 15.74
 ATOM 466 NE1 DLU D 10 19.122 1.876 36.373 1.00 17.32
 ATOM 467 NE1 DLU D 10 19.450 4.107 35.466 1.00 15.81
 ATOM 468 CEN DLU D 10 19.174 4.444 35.808 1.00 14.93
 ATOM 469 CEN DLU D 10 19.174 4.444 35.808 1.00 14.93
 ATOM 470 CEN DLU D 10 23.165 -1.140 31.376 1.00 17.32
 ATOM 471 CEN DLU D 10 22.790 -0.682 31.244 1.00 16.59
 ATOM 472 N DLU D 11 23.744 -2.227 32.572 1.00 17.22
 ATOM 473 CA DLU D 11 24.253 -2.940 31.407 1.00 18.88
 ATOM 474 CB DLU D 11 25.034 -4.168 31.867 1.00 20.11
 ATOM 475 C DLU D 11 25.126 -2.074 30.505 1.00 18.95
 ATOM 476 C DLU D 11 25.078 -2.224 30.505 1.00 18.95
 ATOM 477 M DLU D 11 25.804 -2.442 31.364 1.00 17.72
 ATOM 478 CR DLU D 12 26.755 -0.275 30.517 1.00 17.72
 ATOM 479 CR DLU D 12 27.580 0.645 31.559 1.00 18.43
 ATOM 480 CR DLU D 12 26.725 1.588 32.059 1.00 16.68
 ATOM 481 CGE DLU D 12 26.185 3.990 31.674 1.00 16.49
 ATOM 482 CGE DLU D 12 26.185 3.990 31.674 1.00 16.49
 ATOM 483 CGE DLU D 12 26.185 3.990 31.674 1.00 16.49
 ATOM 484 CGE DLU D 12 26.185 3.990 31.674 1.00 16.49
 ATOM 485 CGE DLU D 12 26.185 3.990 31.674 1.00 16.49
 ATOM 486 CGE DLU D 12 26.185 3.990 31.674 1.00 16.49
 ATOM 487 CGE DLU D 12 26.185 3.990 31.674 1.00 16.49
 ATOM 488 CGE DLU D 12 26.185 3.990 31.674 1.00 16.49
 ATOM 489 CGE DLU D 12 26.185 3.990 31.674 1.00 16.49
 ATOM 490 CGE DLU D 12 26.185 3.990 31.674 1.00 16.49
 ATOM 491 CGE DLU D 12 26.185 3.990 31.674 1.00 16.49
 ATOM 492 CGE DLU D 12 26.185 3.990 31.674 1.00 16.49
 ATOM 493 CGE DLU D 12 26.185 3.990 31.674 1.00 16.49
 ATOM 494 CGE DLU D 12 26.185 3.990 31.674 1.00 16.49
 ATOM 495 CGE DLU D 12 26.185 3.990 31.674 1.00 16.49
 ATOM 496 CGE DLU D 12 26.185 3.990 31.674 1.00 16.49
 ATOM 497 CGE DLU D 12 26.185 3.990 31.674 1.00 16.49
 ATOM 498 CGE DLU D 12 26.185 3.990 31.674 1.00 16.49
 ATOM 499 CGE DLU D 12 26.185 3.990 31.674 1.00 16.49
 ATOM 500 CA DLU D 14 22.192 -1.046 27.198 1.00 22.79
 ATOM 501 CG DLU D 14 23.273 -1.329 26.124 1.00 22.54
 ATOM 502 O DCS D 14 22.962 -1.318 34.916 1.00 23.67
 ATOM 503 CB DCS D 14 21.075 -2.219 24.874 1.00 23.47
 ATOM 504 CG DLU D 14 21.123 -1.318 34.916 1.00 23.67
 ATOM 505 CG DLU D 15 24.811 -1.566 36.137 1.00 23.31
 ATOM 506 CG DLU D 15 25.627 -1.657 35.654 1.00 23.31
 ATOM 507 CB DLU D 15 26.865 -2.302 26.404 1.00 24.05
 ATOM 508 CG DLU D 15 25.987 -0.672 24.731 1.00 24.16
 ATOM 509 CG DLU D 15 26.511 -0.844 23.612 1.00 25.93
 ATOM 510 N DLU D 16 23.723 6.261 24.182 1.00 22.66
 ATOM 511 O DLU D 16 23.723 6.261 24.182 1.00 22.66
 ATOM 512 CB DLU D 16 26.071 1.849 25.324 1.00 22.02
 ATOM 513 CB DLU D 16 26.006 2.305 25.324 1.00 22.02
 ATOM 514 C DLU D 16 25.355 1.870 22.256 1.00 22.36
 ATOM 515 C DLU D 16 23.843 1.460 23.413 1.00 23.47
 ATOM 516 CG1 CH I 1 20.914 10.075 1.894 1.00 45.94
 ATOM 517 CH2 WAT W 1 23.911 6.184 -21.684 1.00 53.30

Figure 7K

ATOM 518 OH2 WAT W 2 30.822 2.444 -19.357 1.00 52.17
 ATOM 519 OH1 WAT W 3 30.359 13.971 -17.693 1.00 37.37
 ATOM 520 OH2 WAT W 4 27.699 12.875 -18.588 1.00 46.63
 ATOM 521 OH2 WAT W 5 27.699 12.875 -18.588 1.00 46.63
 ATOM 522 OH2 WAT W 6 24.012 1.401 -16.07 1.00 58.65
 ATOM 523 OH2 WAT W 7 16.572 3.059 -8.424 1.00 39.15
 ATOM 524 OH2 WAT W 8 32.311 1.217 -16.07 1.00 58.65
 ATOM 525 OH2 WAT W 9 16.572 3.059 -8.424 1.00 39.15
 ATOM 526 OH2 WAT W 10 20.319 -1.662 -11.067 1.00 28.89
 ATOM 527 OH2 WAT W 11 26.434 1.459 -10.192 1.00 43.04
 ATOM 528 OH2 WAT W 12 27.878 0.322 -12.145 1.00 55.95
 ATOM 529 OH2 WAT W 13 33.427 0.255 -10.741 1.00 52.47
 ATOM 530 OH2 WAT W 14 29.885 8.549 -10.741 1.00 52.47
 ATOM 531 OH2 WAT W 15 22.145 1.145 -4.021 1.00 39.15
 ATOM 532 OH2 WAT W 16 22.814 -0.534 -3.336 1.00 39.15
 ATOM 533 OH2 WAT W 17 19.596 1.598 -5.392 1.00 33.28
 ATOM 534 OH2 WAT W 18 23.362 -3.040 -8.381 1.00 28.37
 ATOM 535 OH2 WAT W 19 23.356 0.960 -19.357 1.00 35.95
 ATOM 536 OH2 WAT W 20 24.369 -1.421 -13.823 1.00 29.32
 ATOM 537 OH2 WAT W 21 29.134 -0.585 -16.293 1.00 29.18
 ATOM 538 OH2 WAT W 22 17.264 1.256 -10.545 1.00 37.47
 ATOM 539 OH2 WAT W 23 17.774 -0.049 -14.587 1.00 45.47
 ATOM 540 OH2 WAT W 24 30.628 5.236 1.00 52.56
 ATOM 541 OH2 WAT W 25 27.776 4.560 1.00 42.94
 ATOM 542 OH2 WAT W 26 26.019 6.237 1.00 53.18
 ATOM 543 OH2 WAT W 28 18.650 4.426 -0.423 1.00 34.71
 ATOM 544 OH2 WAT W 29 18.319 1.842 -11.422 1.00 34.71
 ATOM 545 OH2 WAT W 30 17.622 1.233 1.00 35.49
 ATOM 546 OH2 WAT W 31 13.683 5.459 2.119 1.00 52.76
 ATOM 547 OH2 WAT W 32 19.954 4.534 1.380 1.00 47.44
 ATOM 548 OH2 WAT W 33 17.360 2.099 7.579 1.00 46.32
 ATOM 549 OH2 WAT W 34 17.636 1.737 1.00 51.34
 ATOM 550 OH2 WAT W 35 16.221 5.835 9.769 1.00 36.19
 ATOM 551 OH2 WAT W 36 26.038 8.026 8.745 1.00 55.22
 ATOM 552 OH2 WAT W 37 17.636 2.988 6.624 1.00 47.15
 ATOM 553 OH2 WAT W 38 14.889 5.914 31.525 1.00 35.86
 ATOM 554 OH2 WAT W 39 19.841 0.030 14.723 1.00 45.95
 ATOM 555 OH2 WAT W 40 17.772 1.335 12.176 1.00 50.60
 ATOM 556 OH2 WAT W 41 13.367 3.805 6.322 1.00 51.80
 ATOM 557 OH2 WAT W 42 15.587 3.539 15.805 1.00 36.05
 ATOM 558 OH2 WAT W 43 14.398 4.098 8.818 1.00 56.74
 ATOM 559 OH2 WAT W 44 14.272 5.985 26.041 1.00 32.62
 ATOM 560 OH2 WAT W 45 14.272 2.720 2.720 1.00 40.19
 ATOM 561 OH2 WAT W 46 21.969 2.228 18.885 1.00 22.32
 ATOM 562 OH2 WAT W 47 21.588 1.778 21.594 1.00 38.43
 ATOM 563 OH2 WAT W 48 11.908 3.300 22.073 1.00 50.50
 ATOM 564 OH2 WAT W 49 13.679 0.626 18.643 1.00 46.84
 ATOM 565 OH2 WAT W 50 16.365 2.186 20.186 1.00 46.84
 ATOM 566 OH2 WAT W 51 16.365 2.186 20.186 1.00 46.84
 ATOM 567 OH2 WAT W 52 24.603 2.632 19.581 1.00 35.55
 ATOM 568 OH2 WAT W 53 16.367 0.791 23.131 1.00 50.27
 ATOM 569 OH2 WAT W 54 24.646 5.366 17.812 1.00 50.24
 ATOM 570 OH2 WAT W 55 20.954 0.091 17.131 1.00 49.14
 ATOM 571 OH2 WAT W 56 13.747 -0.562 21.394 1.00 36.92
 ATOM 572 OH2 WAT W 57 18.223 8.474 19.289 1.00 46.61
 ATOM 573 OH2 WAT W 58 18.223 8.474 19.289 1.00 46.61
 ATOM 574 OH2 WAT W 59 18.720 9.379 26.376 1.00 37.32
 ATOM 575 OH2 WAT W 60 10.497 10.303 21.845 1.00 34.96

Figure 7L

ATOM 576 CH2 WAT W 51 12.866 5.651 36.254 1.00 26.86
 ATOM 577 OH1 WAT W 51 10.758 7.678 25.495 1.00 42.32
 ATOM 578 OH1 WAT W 51 11.762 6.553 26.773 1.00 29.65
 ATOM 579 OH1 WAT W 54 10.296 6.472 27.988 1.00 37.31
 ATOM 580 OH1 WAT W 55 13.316 2.142 26.849 1.00 43.22
 ATOM 581 OH1 WAT W 56 29.841 -1.893 28.654 1.00 38.11
 ATOM 582 OH1 WAT W 57 18.463 4.444 28.444 1.00 38.11
 ATOM 583 OH1 WAT W 58 20.204 -2.048 28.444 1.00 28.68
 ATOM 584 OH2 WAT W 58 7.101 5.981 24.481 1.00 46.02
 ATOM 585 OH2 WAT W 59 7.101 5.981 24.481 1.00 46.02
 ATOM 586 OH2 WAT W 60 7.221 10.744 27.574 1.00 33.30
 ATOM 587 OH2 WAT W 61 16.382 -1.374 34.997 1.00 34.36
 ATOM 588 OH2 WAT W 62 17.474 -0.717 36.167 1.00 26.82
 ATOM 589 OH2 WAT W 63 17.474 -0.717 36.167 1.00 26.82
 ATOM 590 OH2 WAT W 64 15.099 2.829 31.866 1.00 30.09
 ATOM 591 OH2 WAT W 65 14.031 -3.417 36.363 1.00 46.54
 ATOM 592 OH2 WAT W 66 11.973 4.454 39.584 1.00 20.31
 ATOM 593 OH2 WAT W 67 11.973 4.454 39.584 1.00 32.93
 ATOM 594 OH2 WAT W 68 18.317 4.417 39.387 1.00 44.00
 ATOM 595 OH2 WAT W 69 10.583 -2.804 30.948 1.00 52.39
 ATOM 596 OH2 WAT W 70 11.064 0.030 32.620 1.00 46.78
 ATOM 597 OH2 WAT W 71 12.905 0.923 32.620 1.00 51.74
 ATOM 598 OH2 WAT W 72 14.153 -1.379 34.210 1.00 40.06
 ATOM 599 OH2 WAT W 84 11.101 -2.312 39.659 1.00 61.24
 ATOM 600 OH2 WAT W 85 26.679 -3.321 31.818 1.00 26.25
 ATOM 601 OH2 WAT W 86 24.470 -4.753 28.192 1.00 36.86
 ATOM 602 OH2 WAT W 87 11.111 -5.721 29.481 1.00 46.93
 ATOM 603 OH2 WAT W 88 11.111 -5.721 29.481 1.00 46.93
 ATOM 604 OH2 WAT W 89 26.274 5.127 40.337 1.00 32.29
 ATOM 605 OH2 WAT W 90 16.072 4.538 29.942 1.00 31.10
 ATOM 606 OH2 WAT W 91 16.573 4.216 33.496 1.00 33.22
 ATOM 607 OH2 WAT W 92 16.536 4.216 33.496 1.00 33.22
 ATOM 608 OH2 WAT W 93 9.113 5.209 40.332 1.00 51.71
 ATOM 609 OH2 WAT W 94 9.898 8.712 42.573 1.00 24.98
 ATOM 610 OH2 WAT W 95 17.636 4.198 39.198 1.00 35.93
 ATOM 611 OH2 WAT W 96 16.078 1.397 36.730 1.00 17.13
 ATOM 612 OH2 WAT W 97 11.159 10.478 36.184 1.00 15.62
 ATOM 613 OH2 WAT W 98 8.444 12.582 37.395 1.00 17.23
 ATOM 614 OH2 WAT W 99 8.725 9.521 40.361 1.00 25.18
 ATOM 615 OH2 WAT W 100 6.565 11.911 35.885 1.00 28.55
 ATOM 616 OH2 WAT W 101 8.967 9.316 40.777 1.00 27.77
 ATOM 617 OH2 WAT W 102 10.155 9.819 42.302 1.00 32.50
 ATOM 618 OH2 WAT W 103 8.073 1.260 38.836 1.00 34.85
 ATOM 619 OH2 WAT W 104 14.183 7.249 45.734 1.00 23.53
 ATOM 620 OH2 WAT W 105 11.426 7.965 45.547 1.00 34.68
 ATOM 621 OH2 WAT W 106 16.907 3.218 41.970 1.00 39.50
 ATOM 622 OH2 WAT W 107 16.479 14.336 46.761 1.00 23.72
 ATOM 623 OH2 WAT W 108 8.32 13.921 45.222 1.00 23.11
 ATOM 624 OH2 WAT W 109 7.789 12.933 42.312 1.00 28.34
 ATOM 625 OH2 WAT W 110 8.599 9.679 44.603 1.00 40.15
 ATOM 626 OH2 WAT W 111 26.992 -1.858 32.629 1.00 23.69
 ATOM 627 OH2 WAT W 112 28.775 -5.310 32.521 1.00 38.13
 ATOM 628 OH2 WAT W 113 31.135 0.587 33.068 1.00 34.37
 ATOM 629 OH2 WAT W 114 30.921 -0.919 36.512 1.00 44.24
 ATOM 630 OH2 WAT W 115 30.921 -0.919 36.512 1.00 44.24
 ATOM 631 OH2 WAT W 116 31.465 0.265 34.521 1.00 32.72
 ATOM 632 OH2 WAT W 117 35.611 1.15

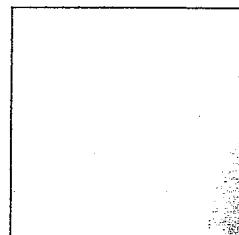
ATOM 634 OHC WAT W 119 33.766 4.315 -14.106 1.00 57.44 W
 ATOM 635 OHC WAT W 120 26.831 7.497 7.075 1.00 40.36 W
 ATOM 636 OHC WAT W 121 25.562 8.205 4.247 1.00 32.06 W
 ATOM 637 OHC WAT W 122 23.561 7.512 1.521 1.00 39.00 W
 ATOM 638 OHC WAT W 123 20.080 -0.273 10.516 1.00 39.31 W
 ATOM 639 OHC WAT W 124 28.185 3.391 13.044 1.00 45.28 W
 ATOM 640 OHC WAT W 125 29.400 7.334 10.996 1.00 52.21 W
 ATOM 641 OHC WAT W 126 12.966 3.595 24.673 1.00 59.42 W
 ATOM 642 OHC WAT W 127 8.932 7.361 36.474 1.00 45.89 W
 ATOM 643 OHC WAT W 128 17.156 1.545 11.119 1.00 39.35 W
 ATOM 644 OHC WAT W 129 9.421 10.564 47.230 1.00 35.27 W
 ATOM 645 OHC WAT W 130 6.643 9.376 45.596 1.00 44.00 W
 ATOM 646 OHC WAT W 131 21.501 13.657 45.856 1.00 45.49 W
 ATOM 647 OHC WAT W 132 19.368 14.112 46.567 1.00 41.15 W
 ATOM 648 OHC WAT W 133 20.913 12.058 48.239 1.00 36.86 W
 ATOM 649 OHC WAT W 134 13.556 4.367 44.139 1.00 45.55 W
 ATOM 650 OHC WAT W 135 13.560 0.905 44.139 1.00 45.55 W
 ATOM 651 OHC WAT W 136 27.367 -0.359 11.092 1.00 42.02 W
 ATOM 652 OHC WAT W 137 25.734 4.374 15.641 1.00 35.36 W
 ATOM 653 OHC WAT W 138 8.107 7.830 38.831 1.00 37.47 W
 ATOM 654 OHC WAT W 139 10.614 4.503 44.378 1.00 61.10 W
 ATOM 655 OHC WAT W 140 14.180 -9.352 32.610 1.00 37.66 W
 ATOM 656 OHC WAT W 141 26.549 -4.377 27.859 1.00 48.05 W
 ATOM 657 OHC WAT W 142 24.242 -1.525 27.859 1.00 48.05 W
 ATOM 658 OHC WAT W 143 25.457 1.452 27.799 1.00 38.11 W
 ATOM 659 OHC WAT W 144 18.986 16.258 45.522 1.00 36.93 W
 ATOM 660 OHC WAT W 145 15.655 2.938 40.193 1.00 40.77 W
 ATOM 661 OHC WAT W 146 15.688 -1.613 19.777 1.00 47.04 W
 ATOM 662 OHC WAT W 147 26.880 -5.627 28.327 1.00 44.89 W
 ATOM 663 OHC WAT W 148 25.682 -5.605 33.767 1.00 44.34 W
 ATOM 664 OHC WAT W 149 28.220 11.179 23.700 1.00 53.97 W
 ATOM 665 OHC WAT W 150 27.905 11.172 23.774 1.00 44.54 W
 ATOM 666 OHC WAT W 151 15.403 -11.541 32.926 1.00 47.89 W
 END

【図 8】

Figure 8A



Figure 8B

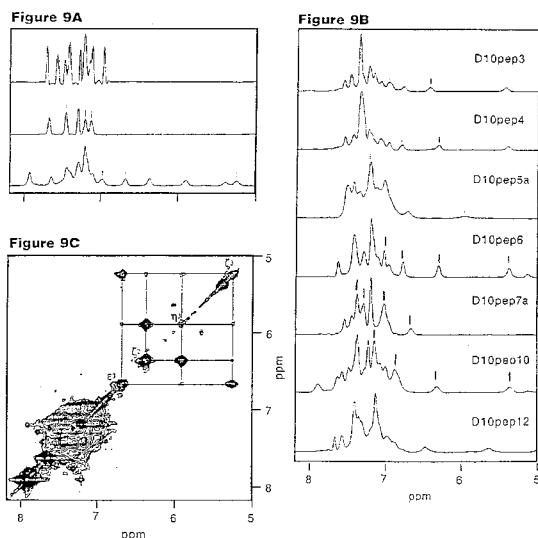


D-ペプチドなしのシンシチウムアッセイ [100pM]ペプチドありのシンシチウムアッセイ

Figure 7N

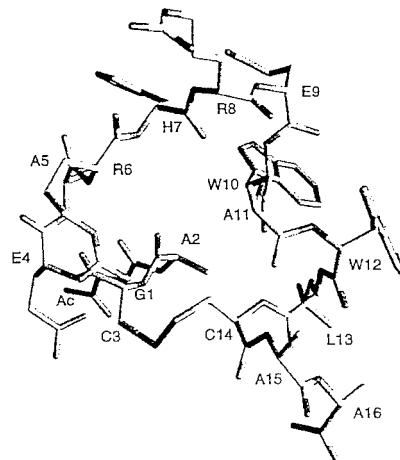
【図 9】

IQN17/D-ペプチド複合体の芳香族残基のNMR特性



【図 10】

Figure 10: IQN17 との複合体における D10pep1 の立体配座



【 図 1 1 】

Figure 11A

Figure 11B

AT00	112	GS	GLU	A	13	11.673	27.794	31.895	1.03	46.65	A	AT00	172	CD	GLU	A	21	5.446	36.019	29.859	1.00	53.51	A
AT00	113	CD	GLU	A	13	11.419	27.372	32.388	1.00	49.90	A	AT00	173	GS	GLU	A	21	5.532	33.135	30.617	1.00	51.42	A
AT00	114	GE1	GLU	A	13	12.051	26.968	33.366	1.00	49.46	A	AT00	174	GS	GLU	A	21	4.703	32.869	28.757	1.00	51.16	A
AT00	115	GE2	GLU	A	13	10.599	26.665	31.720	1.00	50.18	A	AT00	175	CD	GLU	A	21	5.345	36.546	31.521	1.00	49.99	A
AT00	116	C	GLU	A	13	11.357	32.163	63.749	1.00	47.83	A	AT00	176	GS	GLU	A	21	4.148	40.486	31.480	1.00	40.96	A
AT00	117	O	GLU	A	13	10.079	32.731	53.638	1.00	48.75	A	AT00	177	MG	ASN	A	21	5.637	40.694	33.119	1.00	38.83	A
AT00	118	CB	GLU	A	13	12.073	32.737	34.788	1.00	48.75	A	AT00	178	CA	ASN	A	21	4.880	41.494	34.371	1.00	40.69	A
AT00	119	CA	GLU	A	13	11.862	33.187	34.788	1.00	46.89	A	AT00	179	CB	ASN	A	21	5.216	41.107	35.857	1.00	39.42	A
AT00	120	CG	GLU	A	13	10.904	32.985	37.014	1.00	46.35	A	AT00	180	CG	ASN	A	21	4.618	39.766	35.855	1.00	41.35	A
AT00	121	OS	SER	A	14	12.634	33.773	38.160	1.00	49.35	A	AT00	181	OD1	ASN	A	21	3.908	39.154	35.105	1.00	38.98	A
AT00	122	C	SER	A	14	11.885	34.627	35.455	1.00	50.52	A	AT00	182	O	ASN	A	21	4.902	38.325	37.117	1.00	45.82	A
AT00	123	O	SER	A	14	10.869	35.313	35.431	1.00	54.15	A	AT00	183	C	ASN	A	21	5.549	38.546	34.056	1.00	40.75	A
AT00	124	N	LYS	A	15	13.056	25.067	34.971	1.00	49.27	A	AT00	184	O	ASN	A	21	4.261	35.801	32.872	1.00	42.61	A
AT00	125	CA	LYS	A	15	13.248	36.416	34.474	1.00	50.07	A	AT00	185	N	GLU	A	22	6.432	43.244	35.603	1.00	41.94	A
AT00	126	CB	LYS	A	15	14.707	36.589	34.042	1.00	54.30	A	AT00	186	CA	GLU	A	22	6.893	44.589	33.343	1.00	44.44	A
AT00	127	CG	LYS	A	15	15.717	37.017	33.417	1.00	50.75	A	AT00	187	CB	GLU	A	22	8.403	44.563	33.137	1.00	43.01	A
AT00	128	CD	LYS	A	15	14.843	39.039	34.042	1.00	52.93	A	AT00	188	CS	GLU	A	22	9.126	45.861	32.421	1.00	49.75	A
AT00	129	CE	LYS	A	15	14.842	38.860	35.276	1.00	55.66	A	AT00	189	CD	GLU	A	22	9.769	45.871	34.803	1.00	52.80	A
AT00	130	NW	LYS	A	15	15.722	39.983	36.569	1.00	68.24	A	AT00	190	OES	GLU	A	22	10.611	44.986	35.056	1.00	53.66	A
AT00	131	C	LYS	A	15	12.313	36.758	35.305	1.00	50.93	A	AT00	191	O	GLU	A	22	9.447	46.764	35.608	1.00	57.41	A
AT00	132	O	LYS	A	15	12.022	37.926	33.961	1.00	49.62	A	AT00	192	C	GLU	A	22	6.181	46.764	35.608	1.00	57.41	A
AT00	133	N	GLN	A	16	11.848	35.740	32.587	1.00	50.00	A	AT00	193	O	GLU	A	22	5.011	46.261	31.254	1.00	42.52	A
AT00	134	CA	GLN	A	16	10.965	25.937	51.444	1.00	49.96	A	AT00	194	N	ILE	A	23	5.964	44.774	31.116	1.00	37.55	A
AT00	135	CB	GLN	A	16	10.992	34.684	30.570	1.00	49.95	A	AT00	195	CA	ILE	A	23	5.293	44.530	39.863	1.00	35.10	A
AT00	136	CG	GLN	A	16	10.513	34.812	29.120	1.00	49.95	A	AT00	196	CB	ILE	A	23	5.418	43.409	38.800	1.00	36.15	A
AT00	137	CD	GLN	A	16	10.267	33.303	28.169	1.00	54.27	A	AT00	197	CG	ILE	A	23	4.520	43.714	27.592	1.00	35.94	A
AT00	138	CE	GLN	A	16	9.799	32.521	35.667	1.00	56.26	A	AT00	198	CE	ILE	A	23	6.876	43.286	38.340	1.00	39.18	A
AT00	139	NH2	GLN	A	16	10.985	33.796	27.250	1.00	54.59	A	AT00	199	CD1	ILE	A	23	7.152	42.193	27.324	1.00	40.80	A
AT00	140	C	GLN	A	16	9.551	35.256	31.899	1.00	50.62	A	AT00	200	CD2	ILE	A	23	3.815	45.796	35.093	1.00	46.16	A
AT00	141	O	GLN	A	16	8.788	36.951	31.195	1.00	48.50	A	AT00	201	O	ILE	A	23	3.248	45.796	35.093	1.00	20.55	A
AT00	142	N	LYS	A	17	9.198	35.733	33.067	1.00	49.38	A	AT00	202	CD	ILE	A	23	3.041	45.891	30.821	1.00	30.41	A
AT00	143	CA	LYS	A	17	7.883	35.973	33.623	1.00	49.73	A	AT00	203	CS	ALA	A	24	1.760	44.147	31.179	1.00	30.11	A
AT00	144	CB	LYS	A	17	7.582	34.988	34.750	1.00	52.97	A	AT00	204	CB	ALA	A	24	1.276	42.994	32.043	1.00	27.29	A
AT00	145	CG	LYS	A	17	6.328	35.226	35.448	1.00	52.95	A	AT00	205	CG	ALA	A	24	1.531	45.477	31.893	1.00	31.41	A
AT00	146	CD	LYS	A	17	6.064	35.226	36.567	1.00	50.53	A	AT00	206	O	ALA	A	24	0.562	46.183	31.608	1.00	31.49	A
AT00	147	CE	LYS	A	17	4.543	34.552	35.281	1.00	58.98	A	AT00	207	CE	ALA	A	24	3.429	45.825	32.816	1.00	30.54	A
AT00	148	NW	LYS	A	17	4.592	32.621	38.506	1.00	62.05	A	AT00	208	CA	ARG	A	25	3.297	47.076	32.547	1.00	30.44	A
AT00	149	C	LYS	A	17	7.927	37.390	34.163	1.00	48.25	A	AT00	209	CB	ARG	A	25	3.187	45.087	32.095	1.00	30.44	A
AT00	150	O	LYS	A	17	6.977	38.140	34.008	1.00	47.73	A	AT00	210	CD	ARG	A	25	3.021	45.354	32.094	1.00	34.49	A
AT00	151	N	LYS	A	18	9.043	37.750	34.791	1.00	45.58	A	AT00	211	CG	ARG	A	25	3.471	46.326	37.218	1.00	35.65	A
AT00	152	CA	LYS	A	18	9.190	39.100	35.309	1.00	45.26	A	AT00	212	NE	ARG	A	25	4.873	45.907	37.177	1.00	40.74	A
AT00	153	CB	LYS	A	18	10.523	39.270	36.047	1.00	46.34	A	AT00	213	CC	ARG	A	25	5.108	44.687	37.496	1.00	43.06	A
AT00	154	CG	LYS	A	18	10.482	38.493	37.201	1.00	50.01	A	AT00	214	NH1	ARG	A	25	4.453	43.749	37.888	1.00	39.85	A
AT00	155	CD	LYS	A	18	11.831	37.567	30.168	1.00	52.93	A	AT00	215	NH2	ARG	A	25	6.606	44.394	37.299	1.00	40.30	A
AT00	156	CE	LYS	A	18	8.869	38.358	35.056	1.00	55.07	A	AT00	216	C	ARG	A	25	2.590	48.370	32.651	1.00	28.86	A
AT00	157	NW	LYS	A	18	12.933	38.968	40.398	1.00	59.26	A	AT00	217	O	ARG	A	25	1.907	49.296	32.728	1.00	29.25	A
AT00	158	C	LYS	A	18	9.107	40.120	34.171	1.00	41.55	A	AT00	218	N	ILE	A	26	3.567	48.142	39.785	1.00	26.96	A
AT00	159	O	LYS	A	18	6.585	41.200	34.349	1.00	42.76	A	AT00	219	CA	ILE	A	26	3.593	48.142	39.785	1.00	26.97	A
AT00	160	N	ILE	A	19	9.633	39.740	33.008	1.00	40.25	A	AT00	220	CD1	ILE	A	26	5.239	49.760	38.799	1.00	25.38	A
AT00	161	CA	ILE	A	19	9.605	40.593	31.831	1.00	39.53	A	AT00	221	CG2	ILE	A	26	6.444	48.935	30.829	1.00	28.70	A
AT00	162	CB	ILE	A	19	10.435	40.015	30.711	1.00	39.08	A	AT00	222	CG1	ILE	A	26	7.646	48.357	30.133	1.00	27.77	A
AT00	163	CG	ILE	A	19	10.483	40.199	38.106	1.00	40.50	A	AT00	223	CD3	ILE	A	26	2.719	49.571	29.568	1.00	30.92	A
AT00	164	CD	ILE	A	19	1.968	40.214	30.074	1.00	42.53	A	AT00	224	C	ILE	A	26	2.435	45.507	29.490	1.00	30.33	A
AT00	165	CE	ILE	A	19	9.333	39.556	30.039	1.00	43.25	A	AT00	225	O	ILE	A	26	2.039	48.540	29.749	1.00	30.16	A
AT00	166	C	ILE	A	19	8.172	40.725	31.325	1.00	39.27	A	AT00	226	N	ILE	A	27	0.887	48.721	28.657	1.00	30.46	A
AT00	167	O	ILE	A	19	7.751	41.797	30.899	1.00	37.81	A	AT00	227	CA	ILE	A	27	0.449	48.388	26.045	1.00	33.53	A
AT00	168	N	GLU	A	20	7.421	39.837	31.372	1.00	39.00	A	AT00	228	CB	ILE	A	27	1.520	48.111	27.444	1.00	39.64	A
AT00	169	CA	GLU	A	20	6.036	39.692	30.930	1.00	40.27	A	AT00	229	CD	ILE	A	27	1.167	45.294	26.431	1.00	39.41	A
AT00	170	CB	GLU	A	20	5.437	38.388	30.834	1.00	41.43	A	AT00	231	CG	ILE	A	27	0.086	45.204	26.001	1.00	46.84	A
AT00	171	CG	GLU	A	20	5.899	37.474	29.696	1.00	48.10	A	AT00	232	CE	ILE	A	27						A

Figure 11C

ATOM	232	NE	LYS A	27	-0.384	43.774	26.698	1.00	53.94	A
ATOM	232	C	LYS A	27	-0.267	49.402	29.344	1.00	28.67	A
ATOM	234	CB	LYS A	27	-0.929	50.252	26.767	1.00	26.05	A
ATOM	235	N	LYS A	28	-0.511	49.020	30.593	1.00	27.68	A
ATOM	236	CA	LYS A	28	-1.587	49.600	31.371	1.00	27.30	A
ATOM	237	CB	LYS A	28	-1.757	48.845	32.691	1.00	24.82	A
ATOM	238	CD	LYS A	28	-2.961	49.384	33.573	1.00	27.48	A
ATOM	239	CD	LYS A	28	-4.263	49.504	34.101	1.00	28.59	A
ATOM	240	CE	LYS A	28	-5.162	49.686	33.606	1.00	30.02	A
ATOM	241	CD	LYS A	28	-5.440	49.386	34.386	1.00	31.31	A
ATOM	242	C	LYS A	28	-1.284	51.076	31.641	1.00	29.57	A
ATOM	243	O	LYS A	28	-2.164	51.951	31.566	1.00	28.21	A
ATOM	244	N	LEU A	29	-0.017	51.359	31.923	1.00	29.36	A
ATOM	245	CA	LEU A	29	0.385	52.723	33.179	1.00	33.70	A
ATOM	246	CB	LEU A	29	1.822	52.745	32.692	1.00	35.26	A
ATOM	247	CG	LEU A	29	2.023	53.727	33.384	1.00	38.54	A
ATOM	248	CD	LEU A	29	3.363	53.485	33.696	1.00	36.56	A
ATOM	249	CD2	LEU A	29	3.825	53.324	33.325	1.00	36.01	A
ATOM	250	N	LEU A	29	0.143	53.561	30.905	1.00	34.59	A
ATOM	251	O	LEU A	29	-0.281	54.691	30.927	1.00	37.16	A
ATOM	252	N	LEU A	30	0.721	53.026	29.792	1.00	34.03	A
ATOM	253	CA	GLN A	30	0.616	53.724	28.528	1.00	35.56	A
ATOM	254	CB	GLN A	30	1.230	52.874	27.414	1.00	36.39	A
ATOM	255	CD	GLN A	30	1.470	53.508	26.650	1.00	40.29	A
ATOM	256	CD1	GLN A	30	2.219	54.889	26.163	1.00	39.59	A
ATOM	257	CD2	GLN A	30	2.415	52.984	26.166	1.00	45.44	A
ATOM	258	N	GLN A	30	-0.882	53.986	28.263	1.00	34.76	A
ATOM	259	O	GLN A	30	-1.269	55.056	27.794	1.00	33.55	A
ATOM	260	N	GLN A	31	-1.713	52.986	28.572	1.00	30.55	A
ATOM	261	CA	GLN A	31	-5.152	53.142	28.401	1.00	31.04	A
ATOM	262	CB	GLN A	31	-3.865	51.839	28.782	1.00	33.01	A
ATOM	263	CG	GLN A	31	-5.397	51.924	28.839	1.00	37.09	A
ATOM	264	CD	GLN A	31	-6.045	50.582	31.159	1.00	45.53	A
ATOM	265	OEI	GLN A	31	-5.715	49.940	30.157	1.00	41.52	A
ATOM	266	HE3	GLN A	31	-5.971	49.876	30.150	1.00	46.00	A
ATOM	267	HE3	GLN A	31	-3.633	34.363	29.273	1.00	31.34	A
ATOM	268	C	GLN A	31	-4.419	55.125	28.832	1.00	26.45	A
ATOM	269	N	LEU A	32	-3.141	54.376	30.509	1.00	30.93	A
ATOM	270	CA	LEU A	32	-3.523	55.459	31.293	1.00	30.83	A
ATOM	271	CB	LEU A	32	-2.988	54.237	32.811	1.00	29.49	A
ATOM	272	CG	LEU A	32	-3.572	54.156	33.732	1.00	33.65	A
ATOM	273	CD1	LEU A	32	-2.810	54.074	35.745	1.00	32.25	A
ATOM	274	CD2	LEU A	32	-5.149	54.376	35.745	1.00	32.25	A
ATOM	275	O	LEU A	32	-0.021	56.797	30.860	1.00	32.25	A
ATOM	276	N	THR A	33	-3.707	57.810	31.821	1.00	35.77	A
ATOM	277	N	THR A	33	-1.872	56.798	30.198	1.00	31.70	A
ATOM	278	CA	THR A	33	-1.398	58.019	29.640	1.00	33.33	A
ATOM	279	O	THR A	33	0.158	57.787	29.156	1.00	35.07	A
ATOM	280	OEI	THR A	33	0.949	57.272	30.238	1.00	39.00	A
ATOM	281	CGI	THR A	33	0.776	59.087	28.687	1.00	34.58	A
ATOM	282	C	THR A	33	-2.129	58.780	28.478	1.00	34.63	A
ATOM	283	PHB	THR A	33	-3.371	59.767	29.088	1.00	33.97	A
ATOM	284	N	VAL A	34	-2.682	57.650	27.670	1.00	35.32	A
ATOM	285	CA	VAL A	34	-3.507	58.046	26.521	1.00	36.90	A
ATOM	286	CB	VAL A	34	-3.810	56.632	25.622	1.00	36.47	A
ATOM	287	CGI	VAL A	34	-4.825	57.200	24.550	1.00	34.36	A
ATOM	288	CGI	VAL A	34	-2.514	56.354	24.966	1.00	38.97	A
ATOM	289	C	VAL A	34	-4.809	58.655	27.036	1.00	37.01	A
ATOM	290	N	VAL A	34	-3.250	59.695	26.540	1.00	35.59	A
ATOM	291	O	VAL A	34	-5.403	57.992	28.022	1.00	36.34	A

Figure 11E

ATOM	192	CA	TRP A	35	-6.645	56.429	28.648	1.00	38.95	A
ATOM	193	CB	TRP A	35	-7.032	57.429	29.741	1.00	40.03	A
ATOM	194	CG	TRP A	35	-8.202	57.716	30.478	1.00	40.50	A
ATOM	195	CD2	TRP A	35	-8.452	57.720	30.478	1.00	36.29	A
ATOM	196	CD	TRP A	35	-9.820	58.545	31.373	1.00	47.39	A
ATOM	197	CE	TRP A	35	-7.556	59.277	31.429	1.00	46.15	A
ATOM	198	CDE	TRP A	35	-9.543	57.260	30.165	1.00	45.42	A
ATOM	199	NE1	TRP A	35	-10.466	57.752	31.061	1.00	47.75	A
ATOM	200	CD2	TRP A	35	-10.127	59.258	33.067	1.00	48.11	A
ATOM	201	CD	TRP A	35	-8.043	58.993	31.061	1.00	48.14	A
ATOM	202	CE2	TRP A	35	-9.439	58.824	31.061	1.00	47.03	A
ATOM	203	CD1	TRP A	35	-7.408	56.614	29.359	1.00	40.04	A
ATOM	204	CD	TRP A	35	-7.155	60.759	26.213	1.00	39.15	A
ATOM	205	M	GLY A	36	-5.352	59.934	36.055	1.00	38.98	A
ATOM	206	CA	GLY A	36	-5.039	61.211	30.688	1.00	38.44	A
ATOM	207	C	GLY A	36	-5.039	62.327	29.634	1.00	38.41	A
ATOM	208	O	GLY A	36	-5.626	63.390	29.845	1.00	40.58	A
ATOM	209	N	ILE A	37	-4.356	62.094	28.517	1.00	39.01	A
ATOM	210	CA	ILE A	37	-4.279	63.079	27.455	1.00	46.60	A
ATOM	211	CB	ILE A	37	-4.279	62.569	27.455	1.00	46.60	A
ATOM	212	CG	ILE A	37	-3.839	62.477	26.767	1.00	41.25	A
ATOM	213	CD	ILE A	37	-3.777	62.477	26.767	1.00	41.25	A
ATOM	214	CD1	ILE A	37	-1.036	61.777	25.778	1.00	38.31	A
ATOM	215	C	ILE A	37	-5.565	63.366	26.886	1.00	42.00	A
ATOM	216	O	ILE A	37	-6.019	64.516	26.654	1.00	42.52	A
ATOM	217	N	LYS A	38	-6.438	62.317	26.660	1.00	42.56	A
ATOM	218	CA	LYS A	38	-7.766	62.505	26.112	1.00	45.16	A
ATOM	219	CB	LYS A	38	-8.345	61.182	25.894	1.00	45.17	A
ATOM	220	CG	LYS A	38	-8.345	61.182	25.894	1.00	45.17	A
ATOM	221	CD	LYS A	38	-8.345	61.182	25.894	1.00	45.17	A
ATOM	222	CD1	LYS A	38	-11.812	62.480	24.581	1.00	46.01	A
ATOM	223	M	LYS A	38	-11.165	63.304	23.714	1.00	55.27	A
ATOM	224	C	LYS A	38	-8.594	63.405	27.025	1.00	46.36	A
ATOM	225	O	LYS A	38	-9.237	64.343	26.561	1.00	48.52	A
ATOM	226	N	GLN A	39	-9.555	63.120	28.322	1.00	47.82	A
ATOM	227	CA	GLN A	39	-9.303	63.877	29.334	1.00	47.87	A
ATOM	228	CB	GLN A	39	-9.749	64.041	29.500	1.00	49.08	A
ATOM	229	CG	GLN A	39	-9.749	64.041	29.500	1.00	49.08	A
ATOM	230	CD	GLN A	39	-9.257	67.752	24.467	1.00	51.60	A
ATOM	231	CD1	GLN A	39	-9.257	67.752	24.467	1.00	51.60	A
ATOM	232	O	GLN A	39	-6.431	63.742	30.727	1.00	59.01	A
ATOM	233	N	GLN A	39	-10.889	61.405	30.513	1.00	61.01	A
ATOM	234	CA	GLN A	39	-11.742	62.800	31.312	1.00	62.56	A
ATOM	235	CB	GLN A	39	-11.181	60.677	29.437	1.00	62.00	A
ATOM	236	C	GLN A	39	-8.840	61.324	29.412	1.00	48.78	A
ATOM	237	O	GLN A	39	-9.649	66.143	29.431	1.00	48.08	A
ATOM	238	N	LEU A	40	-7.530	65.522	29.472	1.00	49.67	A
ATOM	239	CA	LEU A	40	-5.271	65.317	29.834	1.00	52.13	A
ATOM	240	CB	LEU A	40	-5.271	65.317	29.834	1.00	52.13	A
ATOM	241	CG	LEU A	40	-5.149	65.349	23.367	1.00	54.04	A
ATOM	242									

ATOM	472	OEE	GLN	B	10	27.878	32.761	24.486	1.00	67.36	B
ATOM	473	OEE	GLU	B	10	28.504	33.179	26.485	1.00	66.26	B
ATOM	474	OEE	GLU	B	10	23.513	31.011	25.787	1.00	65.16	B
ATOM	475	OEE	GLU	B	10	23.261	34.351	26.141	1.00	65.31	B
ATOM	476	N	GLU	B	10	22.262	32.785	24.524	1.00	66.64	B
ATOM	477	CA	GLU	B	11	22.617	33.637	23.529	1.00	67.59	B
ATOM	478	CB	GLU	B	11	22.348	32.832	22.252	1.00	68.73	B
ATOM	479	CO	GLU	B	11	21.735	33.636	21.117	1.00	72.98	B
ATOM	480	CG	GLU	B	11	21.556	34.868	20.767	1.00	78.80	B
ATOM	481	OEE	GLU	B	11	20.745	35.117	20.226	1.00	78.21	B
ATOM	482	OEE	GLU	B	11	22.978	35.975	20.722	1.00	74.99	B
ATOM	483	C	GLU	B	11	21.307	34.197	24.398	1.00	67.17	B
ATOM	484	O	GLU	B	11	20.998	35.382	23.918	1.00	68.06	B
ATOM	485	N	ILE	B	12	20.541	33.348	24.784	1.00	64.61	B
ATOM	486	CA	ILE	B	12	19.288	33.790	25.389	1.00	61.65	B
ATOM	487	CB	ILE	B	12	18.458	32.600	24.926	1.00	62.84	B
ATOM	488	CG	ILE	B	12	17.416	33.094	26.940	1.00	62.63	B
ATOM	489	CGI	ILE	B	12	17.795	31.882	26.750	1.00	61.30	B
ATOM	490	CDI	ILE	B	12	16.155	32.989	25.626	1.00	61.29	B
ATOM	491	C	ILE	B	12	18.553	34.776	26.522	1.00	58.17	B
ATOM	492	O	ILE	B	12	19.010	35.881	26.523	1.00	55.05	B
ATOM	493	N	GLU	B	13	20.388	34.384	27.479	1.00	55.87	B
ATOM	494	CA	GLU	B	13	20.720	35.268	28.600	1.00	54.71	B
ATOM	495	CB	GLU	B	13	21.917	34.669	29.477	1.00	50.19	B
ATOM	496	CG	GLU	B	13	11.447	33.331	30.109	1.00	49.30	B
ATOM	497	CG	GLU	B	13	22.597	32.931	29.933	1.00	50.19	B
ATOM	498	OEE	GLU	B	13	19.741	34.765	29.501	1.00	50.79	B
ATOM	499	OEE	GLU	B	13	22.304	32.194	22.027	1.00	47.90	B
ATOM	500	C	GLU	B	13	22.166	36.612	28.047	1.00	55.57	B
ATOM	501	O	GLU	B	13	20.792	37.667	36.523	1.00	56.33	B
ATOM	502	N	SER	B	14	21.950	36.559	26.597	1.00	56.02	B
ATOM	503	CA	SER	B	14	22.468	37.763	26.350	1.00	55.71	B
ATOM	504	CB	SER	B	14	23.488	37.389	25.278	1.00	54.62	B
ATOM	505	OB	SER	B	14	23.968	38.550	24.529	1.00	56.74	B
ATOM	506	CG	SER	B	14	22.368	38.683	26.156	1.00	56.02	B
ATOM	507	CGI	SER	B	14	22.456	38.554	26.589	1.00	54.91	B
ATOM	508	M	LYS	B	15	26.310	37.979	25.263	1.00	55.94	B
ATOM	509	CA	LYS	B	15	19.208	38.704	24.550	1.00	56.72	B
ATOM	510	CB	LYS	B	15	18.454	37.779	23.693	1.00	55.67	B
ATOM	511	CG	LYS	B	15	17.494	38.484	22.772	1.00	58.33	B
ATOM	512	CD	LYS	B	15	17.006	37.527	21.705	1.00	59.89	B
ATOM	513	CG	LYS	B	15	16.440	38.282	20.518	1.00	56.44	B
ATOM	514	NC	LYS	B	15	16.026	37.841	20.412	1.00	56.67	B
ATOM	515	CD	LYS	B	15	18.283	37.207	25.150	1.00	56.51	B
ATOM	516	CG	LYS	B	15	17.155	40.296	25.562	1.00	54.65	B
ATOM	517	M	GLN	B	16	16.145	38.403	26.792	1.00	56.76	B
ATOM	518	CA	GLN	B	16	17.293	38.748	27.911	1.00	57.28	B
ATOM	519	CB	GLN	B	16	17.304	37.604	28.923	1.00	56.94	B
ATOM	520	CG	GLN	B	16	16.009	37.394	29.652	1.00	55.90	B
ATOM	521	CD	GLN	B	16	15.908	36.017	30.300	1.00	56.24	B
ATOM	522	OEE	GLN	B	16	16.413	35.759	31.263	1.00	57.78	B
ATOM	523	NE2	GLN	B	16	15.474	36.669	31.263	1.00	57.78	B
ATOM	524	CG	GLN	B	16	17.323	40.040	38.598	1.00	58.82	B
ATOM	525	CGN	GLN	B	16	17.643	40.929	38.905	1.00	58.68	B
ATOM	526	N	LYS	B	17	19.146	40.163	38.521	1.00	53.44	B
ATOM	527	CA	LYS	B	17	19.711	41.379	C9.189	1.00	59.84	B
ATOM	528	CB	LYS	B	17	21.228	41.275	39.386	1.00	60.30	B
ATOM	529	CG	LYS	B	17	21.740	42.342	30.356	1.00	64.52	B
ATOM	530	CD	LYS	B	17	23.350	42.325	30.576	1.00	65.30	B
ATOM	531	CG	LYS	B	17	24.008	42.784	29.344	1.00	67.22	B

Figure 111

ATOM	511	ND	LYS	B	17	25.465	42.962	29.625	1.00	67.05	B
ATOM	512	O	LYS	B	17	13.389	42.522	28.230	1.00	59.16	B
ATOM	513	O	LYS	B	17	13.088	43.634	28.656	1.00	55.77	B
ATOM	514	O	LYS	B	17	19.433	42.233	26.923	1.00	58.38	B
ATOM	515	CA	LYS	B	18	13.128	43.248	28.393	1.00	58.35	B
ATOM	516	CB	LYS	B	18	19.247	42.675	24.407	1.00	59.35	B
ATOM	517	CO	LYS	B	18	20.617	42.150	23.520	1.00	57.47	B
ATOM	518	CD	LYS	B	18	22.168	43.111	24.099	1.00	58.76	B
ATOM	519	CDI	LYS	B	18	23.034	43.761	25.461	1.00	63.51	B
ATOM	520	ND1	LYS	B	18	15.117	43.961	27.783	1.00	52.88	B
ATOM	521	O	LYS	B	18	17.706	43.761	26.163	1.00	58.27	B
ATOM	522	CDI	LYS	B	18	17.475	44.969	26.255	1.00	58.82	B
ATOM	523	O	LYS	B	18	16.757	42.825	26.258	1.00	56.85	B
ATOM	524	CA	ILE	B	19	15.356	43.189	26.488	1.00	53.76	B
ATOM	525	CB	ILE	B	19	14.455	44.921	26.489	1.00	53.22	B
ATOM	526	CG	ILE	B	19	13.037	43.583	26.386	1.00	52.56	B
ATOM	527	CDI	ILE	B	19	14.116	43.323	26.081	1.00	54.15	B
ATOM	528	CDI	ILE	B	19	16.543	40.059	24.970	1.00	54.45	B
ATOM	529	CDI	ILE	B	19	15.117	43.961	27.783	1.00	52.88	B
ATOM	530	N	GLN	B	20	15.781	43.565	28.869	1.00	51.04	B
ATOM	531	CA	GLN	B	20	15.601	44.267	30.123	1.00	50.05	B
ATOM	532	CB	GLN	B	20	16.403	45.632	31.293	1.00	49.95	B
ATOM	533	CG	GLN	B	20	15.969	44.290	29.583	1.00	54.15	B
ATOM	534	CD	GLN	B	20	16.161	44.620	32.326	1.00	53.95	B
ATOM	535	CDI	GLN	B	20	18.010	43.568	32.641	1.00	53.21	B
ATOM	536	CDI	GLN	B	20	16.127	42.235	33.735	1.00	56.20	B
ATOM	537	CDI	GLN	B	20	15.522	43.235	32.735	1.00	56.20	B
ATOM	538	O	GLN	B	20	16.053	45.706	32.965	1.00	55.21	B
ATOM	539	CDI	GLN	B	20	17.093	43.235	32.735	1.00	56.20	B
ATOM	540	CDI	GLN	B	20	17.757	43.235	32.735	1.00	56.20	B
ATOM	541	O	GLN	B	20	17.757	43.235	32.735	1.00	56.20	B
ATOM	542	CDI	GLN	B	20	17.757	43.235	32.735	1.00	56.20	B
ATOM	543	O	GLN	B	20	17.757	43.235	32.735	1.00	56.20	B
ATOM	544	CDI	GLN	B	20	17.757	43.235	32.735	1.00	56.20	B
ATOM	545	O	GLN	B	20	17.757	43.235	32.735	1.00	56.20	B
ATOM	546	CDI	GLN	B	20	17.757	43.235	32.735	1.00	56.20	B
ATOM	547	O	GLN	B	20	17.757	43.235	32.735	1.00	56.20	B
ATOM	548	CDI	GLN	B	20	17.757	43.235	32.735	1.00	56.20	B
ATOM	549	O	GLN	B	20	17.757	43.235	32.735	1.00	56.20	B
ATOM	550	CDI	GLN	B	20	17.757	43.235	32.735	1.00	56.20	B
ATOM	551	O	GLN	B	20	17.757	43.235	32.735	1.00	56.20	B
ATOM	552	CDI	GLN	B	20	17.757	43.235	32.735	1.00	56.20	B
ATOM	553	O	GLN	B	20	17.757	43.235	32.735	1.00	56.20	B
ATOM	554	CDI	GLN	B	20	17.757	43.235	32.735	1.00	56.20	B
ATOM	555	O	GLN	B	20	17.757					

ATOM	712	CB	GLN	B	39	4.625	69.583	34.167	1.00	33.05
ATOM	713	CB	GLN	B	39	5.435	70.614	34.985	1.00	43.49
ATOM	714	CB	GLN	B	39	4.822	71.026	35.008	1.00	48.65
ATOM	715	CD1	GLN	B	39	4.869	71.774	35.021	1.00	51.46
ATOM	716	CD2	GLN	B	39	4.220	71.583	36.014	1.00	47.35
ATOM	717	CD3	GLN	B	39	2.342	71.557	36.843	1.00	51.04
ATOM	718	O	GLN	B	39	2.125	71.574	34.206	1.00	31.04
ATOM	719	N	LEU	B	40	1.857	69.904	33.783	1.00	51.03
ATOM	720	CA	LEU	B	40	1.065	70.671	31.807	1.00	33.43
ATOM	721	CB	LEU	B	40	0.872	69.866	31.517	1.00	32.63
ATOM	722	CG	LEU	B	40	-0.126	70.405	35.482	1.00	34.65
ATOM	723	CD1	LEU	B	40	0.171	71.843	35.092	1.00	35.24
ATOM	724	CD2	LEU	B	40	0.150	71.558	38.281	1.00	35.90
ATOM	725	O	LEU	B	40	-0.279	70.843	34.465	1.00	36.85
ATOM	726	O	LEU	B	40	-0.874	72.110	33.154	1.00	36.85
ATOM	727	N	GLN	B	41	-0.768	69.964	33.215	1.00	36.41
ATOM	728	CA	GLN	B	41	-2.046	70.063	33.594	1.00	37.74
ATOM	729	CB	GLN	B	41	-3.365	68.718	34.517	1.00	42.31
ATOM	730	CG	GLN	B	41	-3.833	68.459	34.732	1.00	47.08
ATOM	731	CD	GLN	B	41	-4.070	67.139	35.422	1.00	54.05
ATOM	732	CD1	GLN	B	41	-3.517	66.102	35.015	1.00	55.42
ATOM	733	CD2	GLN	B	41	-3.517	66.102	35.015	1.00	55.42
ATOM	734	CB	GLN	B	41	-2.038	71.148	34.974	1.00	54.95
ATOM	735	O	GLN	B	41	-2.988	72.925	35.089	1.00	39.23
ATOM	736	N	ALA	B	42	-0.972	71.194	35.767	1.00	39.05
ATOM	737	CA	ALA	B	42	-0.845	72.188	36.824	1.00	38.56
ATOM	738	CB	ALA	B	42	0.345	71.852	37.787	1.00	34.14
ATOM	739	O	ALA	B	42	-0.647	73.566	36.322	1.00	40.18
ATOM	740	O	ALA	B	42	-1.119	74.560	36.763	1.00	41.44
ATOM	741	N	LEU	B	43	0.107	73.634	35.118	1.00	41.82
ATOM	742	CA	LEU	B	43	0.440	74.474	34.741	1.00	41.82
ATOM	743	CB	ARG	B	43	1.242	74.753	33.350	1.00	47.26
ATOM	744	CD	ARG	B	43	1.703	75.987	32.592	1.00	51.08
ATOM	745	CD	ARG	B	43	3.582	75.677	31.401	1.00	54.95
ATOM	746	NE	ARG	B	43	3.778	74.947	31.813	1.00	57.04
ATOM	747	CD1	ARG	B	43	4.819	75.499	32.423	1.00	56.95
ATOM	748	CD2	ARG	B	43	4.816	76.799	32.703	1.00	55.89
ATOM	749	NE1	ARG	B	43	5.079	74.753	33.782	1.00	57.00
ATOM	750	O	ARG	B	43	-0.587	75.522	34.448	1.00	42.00
ATOM	751	O	ARG	B	43	-1.308	76.167	34.349	1.00	41.41
ATOM	752	N	ILE	B	44	-1.756	74.736	33.510	1.00	43.63
ATOM	753	CA	ILE	B	44	-3.059	75.142	32.810	1.00	43.24
ATOM	754	CB	ILE	B	44	-3.534	74.048	31.866	1.00	44.33
ATOM	755	CD1	ILE	B	44	-5.083	74.403	31.582	1.00	45.04
ATOM	756	CD2	ILE	B	44	-2.778	73.964	30.600	1.00	47.45
ATOM	757	CE1	ILE	B	44	-3.156	72.745	29.758	1.00	49.42
ATOM	758	CE2	ILE	B	44	-4.008	75.303	33.855	1.00	42.21
ATOM	759	O	ILE	B	44	-2.522	76.416	34.332	1.00	45.00
ATOM	760	N	ILE	B	45	-4.573	74.522	34.448	1.00	42.20
ATOM	761	CA	ILE	B	45	-5.564	74.042	35.450	1.00	43.16
ATOM	762	CB	ILE	B	45	-6.042	72.592	35.913	1.00	46.08
ATOM	763	CG	ILE	B	45	-6.459	72.020	34.167	1.00	47.45
ATOM	764	CD	ILE	B	45	-7.011	70.559	34.357	1.00	47.51
ATOM	765	CD1	ILE	B	45	-7.504	70.899	33.852	1.00	48.61
ATOM	766	CD2	ILE	B	45	-7.504	70.899	33.852	1.00	48.61
ATOM	767	O	ILE	B	45	-5.016	74.465	36.810	1.00	42.49
ATOM	768	N	ILE	B	45	-5.016	74.465	36.810	1.00	42.49
ATOM	769	CA	ILE	B	45	-3.945	73.987	37.243	1.00	45.06
ATOM	770	CB	ILE	B	45	-15.143	11.286	36.219	1.00	62.49
ATOM	771	O	ILE	C	0	14.856	12.476	37.574	1.00	62.44
ATOM	772	O	ILE	C	0	13.790	12.858	37.851	1.00	59.06

Figure 11M

ATOM	771	N	ARG	C	1	15.890	13.193	28.220	1.00	82.91
ATOM	772	CA	ARG	C	1	15.156	13.970	30.491	1.00	83.74
ATOM	773	CG	ARG	C	1	15.761	15.095	33.456	1.00	83.47
ATOM	774	CD	ARG	C	1	14.420	15.207	33.456	1.00	83.47
ATOM	775	CD	ARG	C	1	13.249	14.748	31.726	1.00	81.06
ATOM	776	CG	ARG	C	1	13.049	13.434	31.597	1.00	79.16
ATOM	777	NH1	ARG	C	1	13.901	12.678	30.889	1.00	79.80
ATOM	778	NH2	ARG	C	1	12.010	13.875	32.161	1.00	79.18
ATOM	781	CD	ARG	C	1	16.282	15.541	28.552	1.00	85.03
ATOM	782	O	ARG	C	1	15.975	16.641	29.011	1.00	85.10
ATOM	783	N	MET	C	2	17.169	15.394	27.582	1.00	85.40
ATOM	784	CA	MET	C	2	17.078	15.588	27.582	1.00	85.40
ATOM	785	CD	MET	C	2	19.061	15.195	26.290	1.00	88.24
ATOM	786	CG	MET	C	2	12.917	17.410	25.653	1.00	89.72
ATOM	787	SD	MET	C	2	21.192	16.917	24.823	1.00	94.98
ATOM	788	CE	MET	C	2	22.111	16.349	26.176	1.00	91.53
ATOM	789	C	MET	C	2	16.771	17.154	26.033	1.00	87.44
ATOM	790	CD	MET	C	2	16.639	18.368	25.872	1.00	89.05
ATOM	791	N	LYS	C	3	16.001	16.278	25.393	1.00	85.66
ATOM	792	CA	LYS	C	3	14.973	16.722	24.046	1.00	83.09
ATOM	793	CB	LYS	C	3	14.586	16.454	24.046	1.00	83.09
ATOM	794	CD	LYS	C	3	12.122	16.275	28.356	1.00	80.56
ATOM	795	CD	LYS	C	3	11.087	15.973	27.280	1.00	81.02
ATOM	796	CD	LYN	C	4	11.348	16.140	26.082	1.00	79.52
ATOM	797	N	LYN	C	4	9.907	15.512	27.703	1.00	81.57
ATOM	798	O	LYN	C	4	13.667	19.698	27.299	1.00	77.97
ATOM	799	O	LYN	C	4	13.166	20.781	37.032	1.00	78.45
ATOM	800	N	ILE	C	5	14.369	20.530	27.700	1.00	80.07
ATOM	801	CA	ILE	C	5	15.785	21.722	24.425	1.00	79.70
ATOM	802	CB	ILE	C	5	17.206	20.320	28.381	1.00	73.07
ATOM	803	CD	ILE	C	5	18.175	21.388	29.264	1.00	71.17
ATOM	804	CD	ILE	C	5	12.122	16.275	28.356	1.00	80.56
ATOM	805	CD	ILE	C	5	17.174	19.523	29.795	1.00	72.84
ATOM	806	CD	ILE	C	5	17.518	19.113	30.285	1.00	71.35
ATOM	807	C	ILE	C	5	15.818	19.518	28.465	1.00	80.56
ATOM	808	C	ILE	C	5	19.702	19.963	23.125	1.00	68.18
ATOM	809	C	ILE	C	5	19.702	20.118	21.388	1.00	67.87
ATOM	810	CD	ILE	C	5	11.195	20.742	24.846	1.00	77.40
ATOM	811	CD	ASP	C	7	11.408	19.488	21.818	1.00	78.45
ATOM	812	OD1	ASP	C	7	11.519	19.609	21.580	1.00	79.36
ATOM	813	OD2	ASP	C	7	11.452	18.380	24.404	1.00	79.10

Figure 11N

ATOM	852	N	LYS	C	15	8.632	12.571	23.092	1.00	60.79
ATOM	853	CA	LYS	C	15	8.153	13.873	23.771	1.00	54.30
ATOM	854	CB	LYS	C	15	7.949	13.612	25.273	1.00	55.74
ATOM	855	CG	LYS	C	15	6.637	12.903	25.642	1.00	60.25
ATOM	856	CD	LYS	C	15	6.534	12.698	27.154	1.00	60.82
ATOM	857	CD	LYS	C	15	5.186	12.151	27.564	1.00	70.69</

ATOM	952	O	ASN	C	21	5.649	43.597	19.309	1.00	59.75	c	ATOM	1022	N	LEU	C	29	4.375	53.138	19.671	1.00	52.27	c
ATOM	953	N	GLU	C	22	6.255	42.645	21.206	1.00	56.32	c	ATOM	1023	C	LEU	C	29	3.029	53.649	20.214	1.00	51.04	c
ATOM	954	CA	GLU	C	22	5.411	43.489	22.030	1.00	51.54	c	ATOM	1024	C	LEU	C	29	1.281	49.205	20.855	1.00	50.11	c
ATOM	955	CB	GLU	C	22	5.014	42.756	23.313	1.00	55.42	c	ATOM	1025	CG	LEU	C	29	0.485	49.159	20.955	1.00	51.56	c
ATOM	956	CG	GLU	C	22	3.786	43.357	23.967	1.00	61.60	c	ATOM	1026	CD1	LEU	C	29	0.053	53.869	19.955	1.00	51.99	c
ATOM	957	CD	GLU	C	22	2.506	43.082	23.188	1.00	61.82	c	ATOM	1027	CD2	LEU	C	29	0.389	51.100	21.291	1.00	50.39	c
ATOM	958	OE1	GLU	C	22	2.558	43.024	23.142	1.00	61.48	c	ATOM	1028	C	LEU	C	29	3.347	54.739	21.245	1.00	50.83	c
ATOM	959	OE2	GLU	C	22	2.055	42.894	23.244	1.00	60.89	c	ATOM	1029	O	LEU	C	29	3.739	55.805	21.269	1.00	53.58	c
ATOM	960	SD	GLU	C	22	6.158	42.822	23.244	1.00	60.89	c	ATOM	1030	O	LEU	C	30	4.327	54.457	23.089	1.00	50.52	c
ATOM	961	SG	GLU	C	22	5.573	45.873	23.282	1.00	49.72	c	ATOM	1031	CG	LEU	C	30	4.755	55.397	23.101	1.00	48.88	c
ATOM	962	N	ILE	C	23	7.448	44.691	22.665	1.00	47.05	c	ATOM	1032	CG	LEU	C	30	3.029	53.797	23.199	1.00	46.03	c
ATOM	963	CA	ILE	C	23	8.259	45.876	22.946	1.00	46.40	c	ATOM	1024	CH1	LEU	C	30	6.485	54.517	25.455	1.00	46.31	c
ATOM	964	CB	ILE	C	23	9.752	45.504	23.290	1.00	47.53	c	ATOM	1025	CD1	LEU	C	30	5.447	56.172	25.450	1.00	45.24	c
ATOM	965	CG1	ILE	C	23	10.707	46.653	22.810	1.00	44.85	c	ATOM	1026	CD2	LEU	C	30	7.398	54.575	25.889	1.00	48.28	c
ATOM	966	GG1	ILE	C	23	9.894	45.178	14.783	1.00	45.28	c	ATOM	1027	O	LEU	C	30	5.320	57.736	22.642	1.00	48.40	c
ATOM	967	CD1	ILE	C	23	9.120	44.004	25.125	1.00	45.00	c	ATOM	1028	N	GLN	C	31	6.298	56.289	23.247	1.00	49.93	c
ATOM	968	CD2	ILE	C	23	9.120	44.004	25.125	1.00	45.00	c	ATOM	1029	CD1	GLN	C	31	6.983	57.334	20.670	1.00	51.00	c
ATOM	969	O	ILE	C	23	8.117	47.899	21.822	1.00	48.57	c	ATOM	1030	CD2	GLN	C	31	7.852	56.609	19.590	1.00	50.56	c
ATOM	970	N	ALA	C	24	8.073	46.137	20.556	1.00	47.50	c	ATOM	1031	CG	GLN	C	31	6.022	56.289	20.556	1.00	51.26	c
ATOM	971	CA	ALA	C	24	8.002	46.828	19.271	1.00	46.10	c	ATOM	1032	CD1	GLN	C	31	9.768	54.241	19.333	1.00	46.58	c
ATOM	972	CB	ALA	C	24	9.112	45.809	18.126	1.00	44.53	c	ATOM	1033	OS1	GLN	C	31	10.233	55.378	18.391	1.00	48.00	c
ATOM	973	C	ALA	C	24	8.702	47.644	19.157	1.00	45.09	c	ATOM	1034	NE2	GLN	C	31	10.249	59.318	18.715	1.00	46.37	c
ATOM	974	O	ALA	C	24	6.745	46.810	18.752	1.00	45.05	c	ATOM	1035	O	GLN	C	31	5.947	58.225	20.005	1.00	49.56	c
ATOM	975	N	ALA	C	25	8.066	47.034	19.006	1.00	46.84	c	ATOM	1036	O	LEU	C	32	6.192	59.415	19.814	1.00	45.68	c
ATOM	976	CA	ARG	C	25	4.301	47.719	19.345	1.00	45.79	c	ATOM	1037	N	LEU	C	32	4.793	57.657	19.674	1.00	47.54	c
ATOM	977	CG	ARG	C	25	3.045	45.660	19.584	1.00	43.16	c	ATOM	1038	CD1	LEU	C	32	3.723	58.401	19.034	1.00	48.95	c
ATOM	978	CD	ARG	C	25	1.677	44.986	19.438	1.00	50.13	c	ATOM	1039	CG	LEU	C	32	5.745	57.502	19.034	1.00	50.72	c
ATOM	979	NE	ARG	C	25	1.216	44.299	19.564	1.00	54.12	c	ATOM	1040	CD2	LEU	C	32	1.602	57.502	19.034	1.00	51.93	c
ATOM	980	CE	ARG	C	25	3.665	44.888	20.725	1.00	58.36	c	ATOM	1041	CH1	LEU	C	32	2.209	58.283	16.154	1.00	50.80	c
ATOM	981	CG	ARG	C	25	3.075	44.148	21.155	1.00	59.26	c	ATOM	1042	CD2	LEU	C	32	0.554	56.840	17.313	1.00	51.55	c
ATOM	982	NH1	ARG	C	25	3.475	44.148	21.155	1.00	59.26	c	ATOM	1043	C	LEU	C	32	3.070	59.295	20.077	1.00	49.32	c
ATOM	983	NH2	ARG	C	25	3.268	44.148	21.155	1.00	59.26	c	ATOM	1044	O	LEU	C	32	3.040	60.519	19.929	1.00	50.31	c
ATOM	984	O	ARG	C	25	3.557	44.148	21.155	1.00	59.26	c	ATOM	1045	THR	C	33	2.545	58.659	21.135	1.00	48.74	c	
ATOM	985	N	ILE	C	26	3.541	50.038	19.708	1.00	56.08	c	ATOM	1046	SD	THR	C	33	1.878	59.324	22.244	1.00	43.86	c
ATOM	986	CA	ILE	C	26	4.594	46.807	21.601	1.00	47.54	c	ATOM	1047	SG	THR	C	33	1.502	58.659	21.135	1.00	46.04	c
ATOM	987	CB	ILE	C	26	4.591	49.608	22.672	1.00	44.40	c	ATOM	1048	CD1	THR	C	33	0.707	57.332	22.377	1.00	46.20	c
ATOM	988	CG	ILE	C	26	5.044	48.959	24.001	1.00	43.91	c	ATOM	1049	CG2	THR	C	33	1.121	59.039	24.636	1.00	42.89	c
ATOM	989	CD1	ILE	C	26	5.259	50.026	25.071	1.00	45.47	c	ATOM	1050	CH	THR	C	33	2.683	60.494	22.771	1.00	46.44	c
ATOM	990	CD2	ILE	C	26	6.136	47.930	24.450	1.00	45.25	c	ATOM	1051	C	THR	C	33	2.132	61.537	23.125	1.00	39.26	c
ATOM	991	CDI	ILE	C	26	4.445	47.138	25.662	1.00	42.18	c	ATOM	1052	N	VAL	C	34	3.992	60.303	22.843	1.00	38.83	c
ATOM	992	CD2	ILE	C	26	4.445	47.138	25.662	1.00	42.18	c	ATOM	1053	CA	VAL	C	34	4.866	61.345	23.302	1.00	36.90	c
ATOM	993	CDI	ILE	C	26	5.193	51.905	22.554	1.00	42.04	c	ATOM	1054	CB	VAL	C	34	6.329	60.825	23.377	1.00	33.71	c
ATOM	994	N	ILE	C	26	6.721	50.422	22.919	1.00	46.75	c	ATOM	1055	O	VAL	C	34	7.270	61.345	23.904	1.00	29.40	c
ATOM	995	CA	ILE	C	26	7.754	51.384	21.639	1.00	41.51	c	ATOM	1056	CG1	VAL	C	34	6.345	59.566	24.154	1.00	37.81	c
ATOM	996	CG	ILE	C	26	8.916	50.674	20.951	1.00	54.23	c	ATOM	1057	CD1	VAL	C	34	4.795	62.437	24.154	1.00	36.65	c
ATOM	997	CD	ILE	C	26	10.184	51.465	20.863	1.00	57.21	c	ATOM	1058	O	VAL	C	34	4.489	63.593	22.556	1.00	35.38	c
ATOM	998	CD1	ILE	C	26	11.313	50.479	20.644	1.00	60.95	c	ATOM	1059	TRP	C	35	5.049	62.038	22.010	1.00	42.18	c	
ATOM	999	CD2	ILE	C	26	12.660	51.064	21.014	1.00	62.83	c	ATOM	1060	CA	TRP	C	35	5.002	62.937	19.868	1.00	40.00	c
ATOM	1000	CD	ILE	C	26	11.785	50.000	21.821	1.00	64.49	c	ATOM	1061	CB	TRP	C	35	4.991	62.134	18.563	1.00	40.06	c
ATOM	1001	O	ILE	C	26	7.334	53.710	21.165	1.00	54.12	c	ATOM	1062	CG	TRP	C	35	4.848	63.024	17.399	1.00	36.56	c
ATOM	1002	O	ILE	C	26	8.677	52.239	19.538	1.00	53.88	c	ATOM	1063	CD	TRP	C	35	3.659	63.153	18.561	1.00	36.91	c
ATOM	1003	N	ILE	C	26	6.433	52.250	18.599	1.00	55.29	c	ATOM	1064	CE2	TRP	C	35	3.948	63.242	15.870	1.00	42.00	c
ATOM	1004	CA	ILE	C	26	6.163	52.582	17.249	1.00	57.59	c	ATOM	1065	CE3	TRP	C	35	4.657	52.525	16.301	1.00	41.31	c
ATOM	1005	CB	ILE	C	26	7.391	51.841	16.772	1.00	59.19	c	ATOM	1066	CDR	TRP	C	35	5.748	53.944	16.974	1.00	35.30	c
ATOM	1006	CG	ILE	C	26	7.043	50.839	15.629	1.00	62.19	c	ATOM	1067	HE1	TRP	C	35	5.228	54.673	15.945	1.00	39.48	c
ATOM	1007	CD	ILE	C	26	8.825	50.035	15.188	1.00	61.71	c	ATOM	1068	HE2	TRP	C	35	3.017	64.643	14.704	1.00	38.75	c
ATOM	1008	CE	ILE	C	26	8.825	50.035	15.188	1.00	61.71	c	ATOM	1069	CDR	TRP	C	35	1.528	62.934	15.542	1.00	39.54	c
ATOM	1009	N	ILE	C	26	9.028	51.411	22.100	1.00	65.69	c	ATOM	1070	CH2	TRP	C	35	1.827	63.984	14.651	1.00	41.30	c
ATOM	1010	O	ILE	C	26	5.187	51.911	21.100	1.00	55.14	c	ATOM	1071	CDR	TRP	C	35	3.764	63.833	15.901	1.00	39.80	c
ATOM	1011	O	ILE	C	26	3.052	51.147	19.030	1.00	57.47	c	ATOM	1072	CE	TRP	C	35	3.764	63.833	15.901	1.00	39.80	c

Figure 11Q

Figure 11R

ATOM	1072	O	TRP	C	35	3.868	65.052	13.769	1.00	38.39	
ATOM	1073	G	MLW	G	36	3.601	63.210	20.059	1.00	36.88	
ATOM	1074	CA	GLN	O	36	1.356	63.957	20.102	1.00	38.94	
ATOM	1075	C	GLN	O	36	1.315	64.973	21.724	1.00	38.45	
ATOM	1076	O	GLN	O	36	0.931	66.114	22.124	1.00	38.45	
ATOM	1077	IDE	IDE	O	37	1.100	64.555	23.435	1.00	40.86	
ATOM	1078	IDE	IDE	O	37	1.773	64.756	23.604	1.00	36.68	
ATOM	1079	CG	IDE	O	37	1.352	64.755	24.857	1.00	36.82	
ATOM	1080	CG	IDE	O	37	1.488	65.766	26.005	1.00	27.32	
ATOM	1081	CGI	IDE	O	37	1.812	63.548	25.270	1.00	37.14	
ATOM	1082	CGI	IDE	O	37	2.066	62.794	25.501	1.00	35.85	
ATOM	1083	C	IDE	O	37	2.587	66.655	23.284	1.00	36.37	
ATOM	1084	O	IDE	O	37	2.187	67.788	23.521	1.00	37.00	
ATOM	1085	C	LYS	O	38	3.775	66.389	24.224	1.00	40.58	
ATOM	1086	C	LYS	O	38	1.747	67.572	22.381	1.00	42.51	
ATOM	1087	CG	LYS	O	38	5.877	66.886	21.635	1.00	46.36	
ATOM	1088	CG	LYS	O	38	7.109	67.829	21.391	1.00	52.00	
ATOM	1089	CD	LYS	O	38	8.125	67.152	20.433	1.00	56.10	
ATOM	1090	CG	LYS	O	38	9.365	68.008	20.098	1.00	56.81	
ATOM	1091	NZ	LYS	C	38	10.340	68.155	21.222	1.00	59.57	
ATOM	1092	C	LYS	C	38	3.995	69.445	21.483	1.00	42.06	
ATOM	1093	O	LYS	C	38	4.251	69.625	20.422	1.00	42.06	
ATOM	1094	C	GLN	C	39	5.577	69.504	20.394	1.00	39.13	
ATOM	1095	C	GLN	C	39	2.322	68.862	19.928	1.00	40.05	
ATOM	1096	CD	GLN	C	39	1.459	68.100	18.778	1.00	41.77	
ATOM	1097	CG	GLN	C	39	2.385	67.148	17.928	1.00	42.44	
ATOM	1098	CD	GLN	C	39	3.681	67.786	17.465	1.00	42.00	
ATOM	1099	OEI	GLN	C	39	3.678	68.822	16.813	1.00	44.81	
ATOM	1100	NED	GLN	C	39	4.802	67.163	16.173	1.00	46.04	
ATOM	1101	C	GLN	C	39	1.241	59.536	20.767	1.00	36.46	
ATOM	1102	O	GLN	C	39	1.344	59.045	20.145	1.00	36.46	
ATOM	1103	IDE	IDE	O	40	6.852	69.385	21.398	1.00	34.58	
ATOM	1104	CA	LEU	O	40	0.896	69.525	22.268	1.00	36.22	
ATOM	1105	C	LEU	O	40	-1.465	69.595	23.059	1.00	34.67	
ATOM	1106	CG	LEU	O	40	-2.365	69.192	24.161	1.00	34.61	
ATOM	1107	CD1	LEU	O	40	-1.392	70.126	14.213	1.00	34.28	
ATOM	1108	CD2	LEU	O	40	-3.057	68.084	34.572	1.00	30.45	
ATOM	1109	C	LEU	O	40	-0.029	70.630	33.722	1.00	36.46	
ATOM	1110	O	LEU	O	40	-0.494	71.162	33.419	1.00	36.17	
ATOM	1111	C	GLN	C	41	-0.202	70.020	33.419	1.00	36.56	
ATOM	1112	CA	GLN	C	41	-1.764	71.106	34.751	1.00	38.77	
ATOM	1113	CG	GLN	C	41	2.883	70.310	25.413	1.00	38.66	
ATOM	1114	CG	GLN	C	41	3.406	70.994	26.582	1.00	46.41	
ATOM	1115	CG	GLN	C	41	4.245	69.979	27.525	1.00	50.25	
ATOM	1116	OEI	GLN	C	41	4.988	69.028	27.091	1.00	53.94	
ATOM	1117	NEI	GLN	C	41	4.063	70.180	28.831	1.00	52.04	
ATOM	1118	C	GLN	C	41	2.291	72.336	23.998	1.00	37.58	
ATOM	1119	O	GLN	C	41	2.195	73.424	24.484	1.00	37.58	
ATOM	1120	ALA	O	C	42	2.722	73.555	25.000	1.00	36.75	
ATOM	1121	CA	O	C	42	3.365	72.249	22.014	1.00	36.93	
ATOM	1122	CG	ALA	C	42	4.084	72.717	20.779	1.00	32.48	
ATOM	1123	CG	ALA	C	42	2.247	74.209	31.600	1.00	35.85	
ATOM	1124	O	ALA	C	42	2.407	75.427	31.602	1.00	34.18	
ATOM	1125	N	ARG	C	43	1.103	73.629	21.249	1.00	32.51	
ATOM	1126	CA	ARG	C	43	-0.078	74.365	20.829	1.00	34.55	
ATOM	1127	CG	ARG	C	43	-1.152	73.337	20.840	1.00	36.40	
ATOM	1128	CG	ARG	C	43	-1.467	73.851	20.060	1.00	36.54	
ATOM	1129	CD	ARG	C	43	-3.030	74.567	19.559	1.00	37.93	
ATOM	1130	NE	ARG	C	43	-1.452	72.945	23.236	1.00	40.52	
ATOM	1131	CG	ARG	C	43	-3.482	71.986	18.901	1.00	42.74	
ATOM	1132	NHL	ARG	C	43	-5.227	70.717	19.651	1.00	41.40	
ATOM	1133	NHE	ARG	C	43	-6.576	72.288	18.422	1.00	44.00	
ATOM	1134	OHL	ARG	C	43	-1.043	76.425	15.588	1.00	36.78	
ATOM	1135	OHE	ARG	C	43	-0.434	74.971	13.151	1.00	41.66	
ATOM	1136	CAE	ARG	C	43	-0.903	75.799	25.256	1.00	43.94	
ATOM	1137	CAE	ARG	C	43	-1.403	74.891	25.380	1.00	45.88	
ATOM	1138	IDE	ARG	C	43	-1.802	75.203	26.015	1.00	45.11	
ATOM	1139	GSE	ARG	C	43	-1.441	74.876	26.006	1.00	45.16	
ATOM	1140	SGI	ARG	C	43	-1.926	72.877	25.766	1.00	50.31	
ATOM	1141	CDI	ARG	C	43	-0.104	76.802	24.867	1.00	41.15	
ATOM	1142	IDE	ARG	C	43	-0.104	77.561	25.047	1.00	40.03	
ATOM	1143	O	IDE	ARG	43	-0.233	77.561	25.047	1.00	40.03	
ATOM	1144	LU	ARG	C	43	1.345	76.250	25.005	1.00	40.33	
ATOM	1145	CA	LEU	C	44	2.403	77.184	25.579	1.00	39.81	
ATOM	1146	CB	LEU	C	44	3.357	76.332	26.422	1.00	40.22	
ATOM	1147	CD	LEU	C	44	2.889	75.608	27.694	1.00	40.60	
ATOM	1148	CDN	LEU	C	44	1.793	74.714	27.338	1.00	42.51	
ATOM	1149	DEL	LEU	C	44	4.545	75.450	27.000	1.00	39.55	
ATOM	1150	DLI	LEU	C	44	3.215	77.952	24.540	1.00	38.95	
ATOM	1151	DLI	LEU	C	45	3.071	77.689	23.327	1.00	39.85	
ATOM	1152	NEI	LEU	C	45	5.907	64.337	32.524	1.00	31.24	
ATOM	1153	OHI	LEU	C	45	11.587	64.337	32.524	1.00	31.24	
ATOM	1154	OHI	TRP	W	2	8.280	62.369	27.138	1.00	38.82	W
ATOM	1155	OHI	TRP	W	2	11.878	62.369	27.138	1.00	38.82	W
ATOM	1156	OHI	TRP	W	3	6.492	62.209	33.895	1.00	53.43	W
ATOM	1157	OHI	TRP	W	3	1.991	62.209	33.895	1.00	53.43	W
ATOM	1158	OHI	TRP	W	17	20.204	18.978	18.485	1.00	49.56	
ATOM	1159	OHI	TRP	W	17	18.852	15.442	15.405	1.00	34.86	W
ATOM	1160	OHI	TRP	W	9	5.907	64.337	32.524	1.00	31.24	
ATOM	1161	OHI	TRP	W	10	11.587	18.953	30.945	1.00	47.94	W
ATOM	1162	OHI	TRP	W	11	9.321	65.458	23.794	1.00	46.60	W
ATOM	1163	OHI	TRP	W	12	-2.842	65.953	28.078	1.00	59.15	W
ATOM	1164	OHI	TRP	W	13	-1.409	77.305	18.859	1.00	37.51	W
ATOM	1165	OHI	TRP	W	14	-5.597	65.908	37.000	1.00	49.56	W
ATOM	1166	OHI	TRP	W	15	-12.444	53.518	44.460	1.00	49.56	W
ATOM	1167	OHI	TRP	W	16	-22.827	70.555	24.520	1.00	61.81	W
ATOM	1168	OHI	TRP	W	18	14.897	23.935	34.046	1.00	40.13	W
ATOM	1169	OHI	TRP	W	19	3.154	40.721	28.964	1.00	39.69	W
ATOM	1170	OHI	TRP	W	20	1.429	31.851	24.440	1.00	44.83	W
ATOM	1171	OHI	TRP	W	20	4.290	31.851	24.440	1.00	44.83	W
ATOM	1172	OHI	TRP	W	21	26.430	23.104	22.357	1.00	60.67	W
ATOM	1173	OHI	TRP	W	22	13.085	59.549	33.822	1.00	46.34	W
ATOM	1174	OHI	TRP	W	23	-1.165	52.692	33.857	1.00	60.67	W
ATOM	1175	OHI	TRP	W	25	-17.134	48.497	40.793	1.00	60.67	W
ATOM	1176	OHI	TRP	W	25	-24.381	39.194	28.964	1.00	60.29	W
ATOM	1177	OHI	TRP	W	26	-22.833	20.843	19.882	1.00	59.57	W
ATOM	1178	OHI	TRP	W	26	-10.034	74.838	23.557	1.00	53.18	W
ATOM	1179	OHI	TRP	W	26	1.246	80.454	23.974	1.00	36.18	W
ATOM	1180	OHI	TRP	W	30	3.034	76.181	17.566	1.00	50.44	W
ATOM	1181	OHI	TRP	W	30	1.424	49.376	18.865	1.00	47.02	W
ATOM	1182	OHI	TRP	W	32	6.737	49.376	18.865	1.00	49.38	W
ATOM	1183	OHI	TRP	W	32	-17.134	34.256	21.421	1.00	49.55	W
ATOM	1184	OHI	TRP	W	34	-23.356	23.221	21.421	1.00	49.55	W
ATOM	1185	OHI	TRP	W	34	-24.492	26.609	31.851	1.00	46.20	W
ATOM	1186	OHI	TRP	W	36	17.270	23.240	41.621	1.00	45.61	W
ATOM	1187	OHI	TRP	W	36	17.175	27.169	41.299	1.00	47.26	W
ATOM	1188	OHI	TRP	W	38	7.133	10.354	42.769	1.00	44.65	W
ATOM	1189	OHI	TRP	W	39	-23.981	39.473	38.207	1.00	70.43	W
ATOM	1190	OHI	TRP	W	39	-26.645	30.299	35.036	1.00	46.46	W

Figure 1E

ATOM 1183 OH2 TIP W 41 21.798 33.621 37.475 1.00 98.33 W
 ATOM 1183 OH2 TIP W 42 12.296 24.508 37.500 1.00 73.10 W
 ATOM 1184 OH2 TIP W 43 10.810 28.524 40.599 1.00 65.23 W
 ATOM 1185 OH2 TIP W 44 8.726 30.065 36.214 1.00 62.46 W
 ATOM 1196 OH2 TIP W 45 20.748 34.061 34.804 1.00 62.12 W
 ATOM 1197 OH2 TIP W 46 7.462 29.159 29.770 1.00 88.22 W
 ATOM 1198 OH2 TIP W 47 7.466 31.381 33.124 1.00 56.10 W
 ATOM 1199 OH2 TIP W 48 6.466 26.610 36.241 1.00 52.76 W
 ATOM 1200 OH2 TIP W 49 3.713 28.218 30.737 1.00 65.76 W
 ATOM 1201 OH2 TIP W 50 1.568 29.183 32.367 1.00 93.54 W
 ATOM 1202 OH2 TIP W 51 10.064 25.767 38.375 1.00 68.12 W
 ATOM 1203 OH2 TIP W 52 14.649 36.973 38.238 1.00 73.09 W
 ATOM 1204 OH2 TIP W 53 16.799 36.405 39.779 1.00 48.65 W
 ATOM 1205 OH2 TIP W 54 15.456 39.955 39.598 1.00 48.97 W
 ATOM 1206 OH2 TIP W 55 8.442 41.891 37.753 1.00 57.63 W
 ATOM 1207 OH2 TIP W 56 9.926 44.044 39.986 1.00 80.20 W
 ATOM 1208 OH2 TIP W 57 3.713 35.430 32.034 1.00 68.94 W
 ATOM 1209 OH2 TIP W 58 4.041 38.009 30.737 1.00 98.02 W
 ATOM 1210 OH2 TIP W 59 13.514 45.394 36.374 1.00 45.92 W
 ATOM 1211 OH2 TIP W 60 12.274 44.358 32.693 1.00 69.72 W
 ATOM 1212 OH2 TIP W 61 12.770 41.459 30.381 1.00 86.62 W
 ATOM 1213 OH2 TIP W 62 -0.747 39.619 34.003 1.00 85.57 W
 ATOM 1214 OH2 TIP W 63 2.370 41.051 36.997 1.00 63.28 W
 ATOM 1215 OH2 TIP W 64 7.646 47.811 26.559 1.00 86.47 W
 ATOM 1216 OH2 TIP W 65 -1.942 50.095 25.813 1.00 34.47 W
 ATOM 1217 OH2 TIP W 66 -0.430 48.307 24.177 1.00 48.49 W
 ATOM 1218 OH2 TIP W 67 -1.850 49.976 32.352 1.00 45.88 W
 ATOM 1219 OH2 TIP W 68 -4.779 47.449 30.587 1.00 53.38 W
 ATOM 1220 OH2 TIP W 69 -8.800 47.477 33.155 1.00 55.34 W
 ATOM 1221 OH2 TIP W 70 -7.762 51.371 35.605 1.00 72.45 W
 ATOM 1222 OH2 TIP W 71 5.493 30.307 35.411 1.00 63.93 W
 ATOM 1223 OH2 TIP W 72 -2.293 50.557 33.176 1.00 58.12 W
 ATOM 1224 OH2 TIP W 73 -3.821 59.955 22.859 1.00 42.99 W
 ATOM 1225 OH2 TIP W 74 -2.324 52.365 23.812 1.00 60.12 W
 ATOM 1226 OH2 TIP W 75 -4.111 53.201 23.534 1.00 59.86 W
 ATOM 1227 OH2 TIP W 76 -5.369 51.351 24.806 1.00 66.59 W
 ATOM 1228 OH2 TIP W 77 -9.158 63.927 27.711 1.00 59.38 W
 ATOM 1229 OH2 TIP W 78 -6.629 40.379 22.151 1.00 48.43 W
 ATOM 1230 OH2 TIP W 79 -7.811 55.209 31.623 1.00 63.25 W
 ATOM 1231 OH2 TIP W 80 -8.968 55.744 34.681 1.00 48.03 W
 ATOM 1232 OH2 TIP W 81 -14.358 62.793 31.479 1.00 77.34 W
 ATOM 1233 OH2 TIP W 82 -14.884 67.194 30.111 1.0010.00 W
 ATOM 1234 OH2 TIP W 83 -13.962 62.905 27.650 1.00 55.65 W
 ATOM 1235 OH2 TIP W 84 -16.167 64.016 27.598 1.00 62.99 W
 ATOM 1236 OH2 TIP W 85 -14.155 73.419 31.225 1.00 58.55 W
 ATOM 1237 OH2 TIP W 86 -12.150 75.052 20.683 1.00 54.74 W
 ATOM 1238 OH2 TIP W 87 -15.348 66.552 23.273 1.00 66.65 W
 ATOM 1239 OH2 TIP W 88 -23.657 18.781 16.111 1.00 46.11 W
 ATOM 1240 OH2 TIP W 89 21.774 13.448 17.381 1.00 55.52 W
 ATOM 1241 OH2 TIP W 90 28.955 20.805 18.399 1.00 47.29 W
 ATOM 1242 OH2 TIP W 91 15.024 22.422 19.111 1.00 55.02 W
 ATOM 1243 OH2 TIP W 92 32.040 21.815 12.035 1.00 80.85 W
 ATOM 1244 OH2 TIP W 93 31.544 26.386 31.283 1.00 80.53 W
 ATOM 1245 OH2 TIP W 94 30.484 31.094 24.099 1.00 51.19 W
 ATOM 1246 OH2 TIP W 95 29.951 10.812 18.458 1.00 94.45 W
 ATOM 1247 OH2 TIP W 96 25.233 15.682 28.565 1.00 53.47 W
 ATOM 1248 OH2 TIP W 97 25.740 37.432 31.266 1.00 96.40 W
 ATOM 1249 OH2 TIP W 98 18.343 27.853 17.004 1.00 87.39 W
 ATOM 1250 OH2 TIP W 99 26.162 40.001 24.987 1.00 61.29 W
 ATOM 1251 OH2 TIP W 100 18.896 37.649 32.149 1.00 75.85 W

ATOM 1252 OH2 TIP W 101 20.897 31.302 18.264 1.00 88.40 W
 ATOM 1253 OH2 TIP W 102 19.191 42.582 21.455 1.00 55.18 W
 ATOM 1254 OH2 TIP W 103 23.358 41.188 26.907 1.00 78.30 W
 ATOM 1255 OH2 TIP W 104 18.424 41.188 26.907 1.00 78.30 W
 ATOM 1256 OH2 TIP W 105 20.897 46.547 26.042 1.00 59.94 W
 ATOM 1257 OH2 TIP W 106 21.797 41.049 34.456 1.00 78.60 W
 ATOM 1258 OH2 TIP W 107 21.457 46.210 33.535 1.00 75.53 W
 ATOM 1259 OH2 TIP W 108 14.307 43.959 21.380 1.00 54.65 W
 ATOM 1260 OH2 TIP W 109 15.629 42.456 19.119 1.00 58.03 W
 ATOM 1261 OH2 TIP W 110 18.833 44.310 33.666 1.00 80.58 W
 ATOM 1262 OH2 TIP W 111 18.747 50.787 29.389 1.00 60.97 W
 ATOM 1263 OH2 TIP W 112 21.151 52.787 28.681 1.00 60.70 W
 ATOM 1264 OH2 TIP W 113 17.151 54.311 30.553 1.00 72.58 W
 ATOM 1265 OH2 TIP W 114 18.539 56.215 28.845 1.00 79.75 W
 ATOM 1266 OH2 TIP W 115 14.666 59.680 28.964 1.00 50.64 W
 ATOM 1267 OH2 TIP W 116 17.408 62.649 28.523 1.00 74.43 W
 ATOM 1268 OH2 TIP W 117 12.106 61.533 23.810 1.00 59.64 W
 ATOM 1269 OH2 TIP W 118 10.138 60.131 37.626 1.00 89.60 W
 ATOM 1270 OH2 TIP W 119 14.125 60.999 36.821 1.00 78.03 W
 ATOM 1271 OH2 TIP W 120 9.987 65.584 27.400 1.00 63.28 W
 ATOM 1272 OH2 TIP W 121 6.699 65.305 30.950 1.00 59.96 W
 ATOM 1273 OH2 TIP W 122 11.223 65.582 30.559 1.00 45.24 W
 ATOM 1274 OH2 TIP W 123 7.712 69.520 32.053 1.00 89.81 W
 ATOM 1275 OH2 TIP W 124 3.300 66.328 28.053 1.00 83.63 W
 ATOM 1276 OH2 TIP W 125 18.739 12.093 36.575 1.00 68.16 W
 ATOM 1277 OH2 TIP W 126 8.341 17.901 23.874 1.00 69.12 W
 ATOM 1278 OH2 TIP W 127 6.665 20.667 30.766 1.00 79.31 W
 ATOM 1279 OH2 TIP W 128 13.178 21.216 32.239 1.00 55.97 W
 ATOM 1280 OH2 TIP W 129 7.700 21.187 21.255 1.00 65.56 W
 ATOM 1281 OH2 TIP W 130 17.638 26.024 19.828 1.00 45.17 W
 ATOM 1282 OH2 TIP W 131 5.685 27.441 24.740 1.00 60.12 W
 ATOM 1283 OH2 TIP W 132 12.658 29.117 25.187 1.00 59.43 W
 ATOM 1284 OH2 TIP W 133 3.402 30.287 27.387 1.00 64.52 W
 ATOM 1285 OH2 TIP W 134 10.743 41.812 16.813 1.00 84.35 W
 ATOM 1286 OH2 TIP W 135 13.070 38.706 12.664 1.00 61.24 W
 ATOM 1287 OH2 TIP W 136 9.362 44.518 14.929 1.00 51.92 W
 ATOM 1288 OH2 TIP W 137 13.159 53.137 17.554 1.00 56.22 W
 ATOM 1289 OH2 TIP W 138 14.402 57.442 15.838 1.00 66.27 W
 ATOM 1290 OH2 TIP W 139 11.407 57.422 23.207 1.00 56.76 W
 ATOM 1291 OH2 TIP W 140 16.451 75.713 24.795 1.00 58.85 W
 ATOM 1292 OH2 TIP W 141 11.223 65.048 22.170 1.00 84.46 W
 ATOM 1293 OH2 TIP W 142 8.196 70.691 22.387 1.00 66.14 W
 ATOM 1294 OH2 TIP W 143 3.381 51.168 17.777 1.00 51.91 W
 ATOM 1295 OH2 TIP W 144 12.735 48.059 19.325 1.00 73.18 W
 ATOM 1296 OH2 TIP W 145 2.524 42.027 17.393 1.00 80.66 W
 ATOM 1297 OH2 TIP W 146 1.024 39.152 18.549 1.00 74.07 W
 ATOM 1298 OH2 TIP W 147 0.486 41.584 19.958 1.00 97.41 W
 ATOM 1299 OH2 TIP W 148 0.960 40.945 24.077 1.00 70.9 W
 ATOM 1300 OH2 TIP W 149 14.042 57.442 23.207 1.00 56.76 W
 ATOM 1301 OH2 TIP W 150 17.041 33.288 18.134 1.00 55.41 W
 ATOM 1302 OH2 TIP W 151 12.012 51.850 23.650 1.00 34.32 W
 ATOM 1303 OH2 TIP W 152 0.421 41.869 28.444 1.00 53.88 W
 ATOM 1304 CL-1 CL 1 1 13.184 36.734 27.569 1.00 62.34 I
 END

Figure J1V

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 60/101,058
(32)優先日 平成10年9月18日(1998.9.18)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/132,295
(32)優先日 平成11年5月3日(1999.5.3)
(33)優先権主張国 米国(US)

前置審査

(72)発明者 チャン, デイビッド, シー.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02146 ブルックリン, ケント ストリート 205,
アパートメント 38
(72)発明者 マラシュケビッチ, ウラジミール
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02144 サマビル, ハンコック ストリート 17
(72)発明者 カー, ピーター, エイ.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02139 ケンブリッジ, ブットナム アベニュー 46
3, アパートメント 1
(72)発明者 キム, ピーター, エス.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02420 レキシントン, バスキン ロード 48

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 Cell, 1999年10月 1日, Vol.99, p.103-115
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1997年, Vol.94, p.13426-13430
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1997年, Vol.94, p.6065-6069

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C07K 5/00-9/00
C07K 14/16
C12N 15/09
C07K 19/00
BIOSIS/MEDLINE/WPIIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
UniProt