

(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 I
<b>C O 7 K 14/16 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/16 Z N A
<b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02
<b>A 6 1 P 31/18 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/18

請求項の数 10 (全 59 頁)

(21) 出願番号	特願2000-562395 (P2000-562395)	(73) 特許権者	596004598
(86) (22) 出願日	平成11年7月30日 (1999.7.30)		ホワイトヘッド イン스티テュート 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 セッツ州, ケンブリッジ, ナイン ケンブ リッジ センター (番地なし)
(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)	(74) 代理人	100095832
(86) 国際出願番号	PCT/US1999/017351		弁理士 細田 芳徳
(87) 国際公開番号	W02000/006599	(72) 発明者	エッカート, デブラ, エム.
(87) 国際公開日	平成12年2月10日 (2000.2.10)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2 1 3 8 ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー 1 6 2 2
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)		

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十分な 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十分な部分が、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：

RMKQIEDKIEEIESKQKKIENEIARIKK (配列番号：25)

である、および

(b) HIV gp41 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十分な HIV gp41 の N - ヘリックスコイルドコイルの部分、ここで、HIV gp41 の N - ヘリックスコイルドコイルの十分な部分が、配列：

LLQLTVWGIKQLQARIL (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 IQN17 であり、IQN17 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、HIVエンベローブ糖タンパク質由来の gp41 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 60/043,280 号および 1998 年 4 月 17 日に提出された、HIVエンベローブ糖タンパク質由来の gp41 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 09/062,241 号に関する。本出願は、1998 年 7 月 30 日に提出された、HIV 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 エム・アーゴット (Debra M. Ehr Gott) およびペーター エス・キムによる米国仮出願第 60/094,676 号；1998 年 9 月 14 日に提出された、HIV 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 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 60/100,265 号および 1998 年 9 月 18 日に提出された、HIV 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 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 60/101,058 号；ならびに 1999 年 5 月 3 日に提出された、デブラ エム・アーゴット、デービッド シー・チャン、ブラジミール 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 60/132,295 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 P01 GM56552 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 (H I V - 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 H I V - 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。H I V 侵入に対して、構造に基づく創薬を行ないいうることも有用であろう。

### 【 0 0 0 4 】

## 発明の要旨

本明細書に記載のように、H I V エンベロープタンパク質 g p 4 1 サブユニット (例えば、H I V - 1 エンベロープタンパク質 g p 4 1 - 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 (c a v i t y) 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 H I V 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、H I V (例えば、H I V - 1、H I V - 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。

### 【 0 0 0 5 】

本明細書に記載された結果は、g p 4 1 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 H I V 感染性 (細胞への H I V 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 C 3 4 の H I V - 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。g p 4 1 機能に対するくぼみ接近 (g p 4 1 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、g p 4 1 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 H I V - 1 侵入を阻害することの重要性も、明らかである。また、g p 4 1 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、H I V - 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 H I V 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。

### 【 0 0 0 6 】

鏡像ファージディスプレイ技術 [ティール・エヌ・シューマッハー (T . N . 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 9 9 6 ) ]、コンビナトリアルケミストリー [エー・ボーシャート (A . B o r c h a r d t) , エス・ディー・リバーレス (S . D . L i b e r l e s) , エス・アール・ビッグー (S . R . B i g g e r) , ジー・アール・クラブトゥリー (G . R . C r a b t r e e) , エス・エル・シュレイバー (S . L . S c h r e i b e r) , C h e m . B i o l . , 4 : 9 6 1 ( 1 9 9 7 ) ; ジェイ・シー・シャバラ (J . C . C h a b a l a) , C u r r . O p i n . B i o t e c h n o l . , 6 : 6 3 2 ( 1 9 9 5 ) ]、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、H I V - 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 N 3 6 / C 3 4 安定性と C 3 4 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、C 3 4 と N 3 6 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、H I V - 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。

### 【 0 0 0 7 】

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、g p 4 1

を不活性化し、そうして細胞への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(Chan, D. C.)およびピー・エス・キム(P. S. Kim)、Cell, 93: 681(1998)、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、参照される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・ピ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・(Letvin, N. L.), Science, 280, (5371): 1875-1880(1998), ハーシュ, ブイ・エム・(Hirsch, V. M.), Virus Research, 32(2): 183-203(1994); レイマン, ケー・エー・(Reimann, K. A.)ら, J. Virol., 70(10): 6922-6928(1996)〕。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(Lu, M.)ら, J. Biomol. Struct. Dyn., 15: 465(1997), チャン・ディー・シー・(Chan, D. C.)ら, Cell, 89, 263(1997)および1997年4月17日に提出されたデビッド・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・(Lu, M.)ら, Nature Struct. Biology, 1995〕またはDP-107(ワイルド(Wild)ら, PNAS 89: 10537-10541(1992)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 gp41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 gp41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 gp41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-pIQI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gp41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、米国仮出願第60/101,058号において、GCN4-pIQI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-pIQI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-pIQIの配列は: ac-RMKQIEDKIEEILSKQYHIENEIARIKKLIGER(配列番号: 1)である。HIV配列は: LLQLTVWGIKQLQARIL(配列番号: 20)である。IQN17の配列は: ac-RMKQIEDKIEEIESKQKKIENEIARIKKLLQLTVWGIKQLQARIL-am(配列番号: 2)である。HIV部分を配列番号: 2に下線を付す; ac-は、N末端アセチル基を示し、-am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: RMKQIEDKIEEIESKQKKIENEIARIKK(配列番号: 25)である。GCN4-pIQI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・ビー。(Harbury, P.B.)ら, Nature 371: 80-83 (1994); ハーバリーら, PNAS 92: 8408-8412 (1995)」は、HIV gp41 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、 $-36,000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ の222 nmのモル楕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  $\mu\text{M}$ 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 gp41 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)gp41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 gp41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ブ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gp41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ブ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ブラリー、ペプチドライブラリー、DNAライブラリー、RNAライブラリー、コンビナトリアルライブラリー、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産生された産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ブラリーの場合、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ンを同定し、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。疎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ブ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ブ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ブラリー、RNAライブラリー、DNAライブラリー、ペプチドライブラリー、コンビナトリアルライブラリー、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産生された産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。

#### 【0011】

I Q N 1 7 のバリエーション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<sub>Q</sub> 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'Neil)およびデグラード(DeGrado)、Science 250:646(1990)]。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(Fass,D)ら、Nature Struct. Biology, 3:465(1996)]、G C N 4 - p I I [ハーバリー(Harbury)ら、Nature, 317:80、1994]または A B C ヘテロ 3 量体(ナウチャル(Nautiyal)およびアルバー(Alber)、Protein Science 8:84(1999)]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。

#### 【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 バリエーション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 バリエーションまたは大きくば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。

## 【 0 0 1 3 】

本明細書に記載された結果は、以下に記載のように、C 3 4 のバリエーションである H I V g p 4 1 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。N 3 6 を安定に結合する C 3 4 バリエーションなどの C 3 4 のバリエーションが同定されると、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、C 3 4 バリエーションを評価して、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、N 3 6 3 量体における深部の保存ポケットに包まれる 3 つの C 3 4 残基 T r p<sup>628</sup>、T r p<sup>631</sup> および I l e<sup>635</sup> は、阻害活性に重要である。N 3 6 コイルドコイルへのより高い親和性を有する C 3 4 バリエーションは、H I V 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 ( s p l i t ) - 合成』技術〔チェン、シー・エル・( C h e n , C . L . ) ら、M e t h o d s E n z y m o l . 2 6 7 : 2 1 1 - 2 1 9 ( 1 9 9 6 ) ; ラム、ケイ・エス ( L a m , K . S . ) ら、N a t u r e , 3 5 4 : 8 2 - 8 4 ( 1 9 9 1 ) 〕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 C 3 4 バリエーションのライブラリーを合成する。この合成技術は、単一のバリエーション C 3 4 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 C 3 4 バリエーションを同定するために、N 3 6（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 C 3 4 バリエーション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（ヤングクイスト、アール・エス・( Y o u n g q u i s t , R . S . ) ら、J . A m e r . C h e m . S o c . 1 1 7 , 3 9 0 0 - 3 9 0 6 ( 1 9 9 5 ) 〕。選択された C 3 4 バリエーション、とりわけ N 3 6 に対する最も高い結合親和性を有するものを、g p 4 1 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 C 3 4 バリエーションの切形型も、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、それぞ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、C 3 4 バリエーションについて上記のように解析され、得られたヒット（N 3 6 に対して適切な結合親和性を有するメンバー）が、g p 4 1 阻害活性についてさらに解析される。別の例として、N 3 6 ペプチドまたは前記に述べられた、I Q N 1 7、G C N 4 - N - ヘリックスペプチドなどの可溶性バリエーション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。

## 【 0 0 1 4 】

さらに、I Q N 1 7 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、I Q N 1 7 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。

## 【 0 0 1 5 】

H I V - 1 エンベロープ糖タンパク質 g p 4 1 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、g p 4 1 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 g p 4 1 - 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、H I V - 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ーション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ライブラリーにおいて、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-XXCXXXXXXEWXWLCXX-am（配列番号：28）；  
 ac-KKXXCXXXXXXEWXWLCXX-am（配列番号：29）；  
 ac-KKKKXXCXXXXXXEWXWLCXX-am（配列番号：30）；  
 ac-XXCXXXXXXEWXWLCXXX-am（配列番号：31）；  
 ac-KKXXCXXXXXXEWXWLCXXX-am（配列番号：32）；および  
 ac-KKKKXXCXXXXXXEWXWLCXXX-am（配列番号：33）。

を有する D - ペプチドも本発明の主題である。

#### 【0016】

アミノ酸残基は 1 文字表記（c o n v e n t i o n）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（m o i e t y）を表す。

#### 【0017】

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キ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）およびバリエーション（v a r i a n t s）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ーション、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かず、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 - ペプチドの具体的態様は：



- (a) CDLKAKEWFWLC (配列番号 : 3) ;
- (b) CEARHREAWWLC (配列番号 : 4) ;
- (c) CELLGWEAWWLC (配列番号 : 5) ;
- (d) CLLRAPEWGWLC (配列番号 : 6) ;
- (e) CSRSQPEWEWLC (配列番号 : 7) ;
- (f) CGLGQEEWFWLC (配列番号 : 8) ;
- (g) CMRGWEWSWLC (配列番号 : 9) ;
- (h) CPPLNKEAWWLC (配列番号 : 10) ;
- (i) CVLKAKEWFWLC (配列番号 : 11) ;
- (j) KKGACGLGQEEWFWLC (配列番号 : 15) ;
- (k) KKGACELLGWEAWWLC (配列番号 : 16) ;
- (l) KKKKGACELLGWEAWWLC (配列番号 : 17) ;
- (m) KKGACMRGWEWSWLC (配列番号 : 18) ;
- (n) KKGACPLNKEAWWLC (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) CXXXXXEWXWL (配列番号 : 12) を含んでなる D-ペプチド
- (r) ac-GACEARHREAWLCAA-am (配列番号 : 34) ;
- (s) ac-KKGACEARHREAWLCAA-am (配列番号 : 38) ;
- (t) ac-KKKKGACEARHREAWLCAA-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-GACDLKAKEWFWLCAA-am (配列番号 : 35) ;
- (y) ac-KKGACDLKAKEWFWLCAA-am (配列番号 : 39) ;
- (z) ac-KKKKGACDLKAKEWFWLCAA-am (配列番号 : 46) ;
- (a') ac-GACELLGWEAWLCC-am (配列番号 : 47) ;
- (b') ac-KKGACELLGWEAWLCAA-am (配列番号 : 16) ;
- (c') ac-KKKKGACELLGWEAWLCAA-am (配列番号 : 17) ;
- (d') ac-GACRSQPEWEWLCAA-am (配列番号 : 36) ;

10

20

30

- (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-XXCXXXXXEWXWLCXX-am (配列番号: 57) ;
- (t') ac-KKXXCXXXXXEWXWLCXX-am (配列番号: 58) ;
- (u') ac-KKKKXXCXXXXXEWXWLCXX-am (配列番号: 59) ;
- (v') ac-XXCXXXXXEWXWLCXXX-am (配列番号: 60) ;
- (w') ac-KKXXCXXXXXEWXWLCXXX-am (配列番号: 61) ;
- (x') ac-KKKKXXCXXXXXEWXWLCXXX-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)

10

20

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り  
 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  
 クスク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、D10pep5 または D10p  
 ep1、IQN17、および候補インヒビター（候補薬物）を、D10pep5 または D  
 10pep1 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 gp41 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。D10pep5 または D10pep1  
 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（synct  
 ia）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

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、D A B C Y L ; 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、E D A N S ; 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、D 1 0 p e p 5 または D 1 0 p e p 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 gp41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 gp41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 gp41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 gp41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

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。

【 0 0 2 3 】

また、本発明の主題は、I Q N 1 7 と D 1 0 p e p 1 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、I Q N 1 7 のX線結晶構造の座標のリストである。これらの座標は、D 1 0 p e p 1 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わ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 . K u b i n y i ( K u b i n y i ) , C u r r . O p . D r u g D i s c o v . D e v e l o p . , 1 : 1 6 ( 1 9 9 8 ) ; P . L . W o o d , i b i d , 1 : 3 4 ( 1 9 9 8 ) ; J . R . M o r p h y , i b i d , 1 : 5 9 ( 1 9 9 8 ) ) 。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、H I V 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H I V g p 4 1 疎水性ポケットの可溶性四量体ペプチドモデル（例えば、I Q N 1 7 またはそのバリエーション）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、D 1 0 p e p 1 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I Q N 1 7 またはそのバリエーション）の結晶、またはH I V g p 4 1 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H I V g p 4 1 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H I V g p 4 1 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、エンブティ（e m p t y ）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、I Q N 1 7 などのエンブ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H I V g p 4 1 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、I Q N 1 7 もしくはそのバリエーションまたは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H I V g p 4 1 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、I Q N 1 7 のための本明細書に示されたP D B （図 1 1 A ~ 1 1 V ）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（P D B ）を形成し得る。

【 0 0 2 4 】

同様に、該方法は、D - ペプチド（例えば、D 1 0 p e p 1 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H I V g p 4 1 のN - ペプチド領域の結晶を用いて行うことができる。

【 0 0 2 5 】

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、N M R により）さらに評価することができ、細胞へのH I V 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. Hughson、J. J. Skehel、D. C. Wiley、Nature、371:37(1994))、モロニー Maus 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. Caffrey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(1999))。

## 【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

10

20

30

40

50

っ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. USA*, 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. Rimskey, 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くぼみが存在する。C - ヘリックスの3つの残基 (Trp<sup>628</sup>、Trp<sup>631</sup> および Ile<sup>635</sup>) 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 (Leu<sup>568</sup> および Trp<sup>571</sup>) 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、現在まで、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); Kilby, 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. Biol. 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ペプチドのバリエーション(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(Met<sup>629</sup>、Arg<sup>633</sup>)の変異は、222nmにおける平均残基楕円率(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(Trp<sup>628</sup> Ala、Trp<sup>631</sup> AlaまたはIle<sup>635</sup> Ala)は、平均楕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Trp<sup>631</sup> Alaのバリエーションで認められた。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(Met<sup>629</sup> AlaおよびArg<sup>633</sup> 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 $IC_{50}$ 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Trp<sup>628</sup> またはTrp<sup>631</sup> 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Ile<sup>635</sup> 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、Trp<sup>631</sup> 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。Trp<sup>631</sup> 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バリエーションに対する $T_m$  および $[\theta]_{222}^{25}$  ( $10^3 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ ) (ならびに、ウイルス侵入および細胞融合の $IC_{50}$ 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: Trp<sup>631</sup> Gly、35、17.1(38±6.1、25±3.8); Trp<sup>631</sup> Ala、37、-24.9(40±4.3、15±0.8); Trp<sup>631</sup> Abu、43、-23.2(16±4.8、6.9±0.4); Trp<sup>631</sup> Val、43、-23.9(13±2.8、4.5±0.09); Trp<sup>631</sup> Leu、50、-26.7(5.3±1.0、3.2±0.1); Trp<sup>631</sup> 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); Trp<sup>631</sup> Nal、62、-32.0(1.4±0.3、0.79±0.08)。Trp<sup>631</sup>

Nalペプチドの濃度は、282nmでの $\epsilon = 6900$ 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)。これらのバリエーションの効力の大きさは、野生型 ~ Nal > Phe > 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  $IC_{50}$  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  $(-G) / (-G_{\text{野生型複合体}} - G_{\text{変異型複合体}})$  に比例する (W. J. Becktel、J. A. Schellman、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 バリエーションの効力は 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イ技術 (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. Klummann 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. Chabala、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. McDannal、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 (



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. R i m s k y、D. C. S h u g a r s、T. J. M a t t h e w s、J. V i r o l .、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、(H I V - 2を含む)様々なH I V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ーション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、g p 4 1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g p 4 1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、C 3 4の阻害能はg p 4 1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。g p 4 1のヘアピン構造は(90 を超える融解温度を有して)極めて安定であるために(Lu, M. 他、Nat. Struct. Biol. 2:1075(1995))、特に、変化を受けていないg p 4 1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C 3 4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ブレ - ヘアピン中間体に結合することによって、g p 4 1のヘアピンが形成される前に作用していることが考えられる。C - ペプチドがこのブレ - ヘアピン中間体に結合することによって、g p 4 1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、H I V - 1エンベロープタンパク質のg p 4 1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、A I D Sを引き起こし得る他の病原体(例えば、H I V - 2)またはA I D S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、S I V)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、H I V - 1(および/またはH I V - 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、H I V - 1 g p 4 1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、C 3 4 / N 3 6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、H I V g p 4 1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、H I Vの細胞内侵入、従って、H I V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】

C 3 4とN 3 6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H I V g p 4 1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、C 3 4ペプチドとN 3 6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、そうして、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 のそれぞれが一对のドナー - 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 および候補薬物は、例えば、固体表面（例えば、ビーズまたはプラスチックウエル）に固定化された N 3 6 と合わされ、そう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こ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、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、ウエルまたは平坦 / 平面の表面などの固体表面に結合させることができる 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（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ストレプトアビジン（例えば、ストレプトアビジン - H R P、ストレプトアビジン - A P、またはヨウ素化ストレプトアビジン）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こ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。

【 0 0 4 0 】

10

20

30

40

50

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）、1 0 0 % 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 , 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 1 7 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 l . 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、ブロック基（例えば、アセチル基）がその N 末端に存在し、C O N H<sub>2</sub>（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 C<sub>50</sub> 濃度を示した。この場合、I C<sub>50</sub> 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 個のリジンを含む D 1 0 p e p 5 は約 6 μ M の I C<sub>50</sub> を有している。

30

40

#### 【 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

50

において、この方法は、H I V g p 4 1 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 H I V g p 4 1 のくぼみを含むのに十分な部分の H I V g p 4 1 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 H I V g p 4 1 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、H I V 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することができる。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 H I V 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、（I Q N 1 7 の場合と同じ 3 つの表面変異を有する）G C N 4 - p I<sub>Q</sub> I、または疎水性ポケットにおける点変異を有する I Q N 1 7 の一形態である I Q N 1 7（G 3 9 W）（これは、グリシン 3 9 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、I Q N 1 7 には結合するが、（I Q N 1 7 の場合と同じ 3 つの表面変異を有する）G C N 4 - p I<sub>Q</sub> I または I Q N 1 7（G 3 9 W）には結合しない候補薬物が、H I V 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。

#### 【 0 0 4 4 】

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、H I V 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 H I V g p 4 1 のくぼみを結合するかどうか、H I V g p 4 1 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、H I V g p 4 1 のくぼみを結合する薬物である。例えば、G C N 4 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 H I V g p 4 1 の N - ペプチドの C 末端とを含む融合タンパク質（I Q N 1 7）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 H I V 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その能力について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。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、H I V 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。結合の検出は、例えば、本発明の C 3 4 / N 3 6 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、ピオチン）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、ピオチン）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

10

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、H I V 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、ライブ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ブラリーなどの分子または化合物のライブ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という。従って、第2のキラル中心を含有するアミノ酸残基(I l eおよびT h r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、ストレプトアビジン)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G l y - L y s - G l y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ブラリーは、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ブラリーであり得る。1つの実施形態において、そのようなライブラリーは、M13ファージのg I I I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ブラリーである。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-G C N 4 - p I<sub>Q</sub> I、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H I V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、H I V 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H I V - 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)ではなく、D-IQN17に結合するファージ)のうち、8個はE W X W L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H I V - 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った。

【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、SELEX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

30

【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、HIV gp41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ボアッセイをさらに使用して行われる。

40

【0049】

本発明の1つの実施形態は、HIV gp41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、HIV gp41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HIV gp41ポケットを含むのに十分な部分のHIV gp41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HIV gp41

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十分に競合する十分な親和性で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<sub>Q</sub> 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十分な部分の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：20を含むことができ、あるいはくぼみを含むの十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 .、290：1031（1999））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<sub>Q</sub> I、G C N 4 - p I I、モロニー Maus 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 17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 17である。

#### 【0050】

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：3～12、15、17～19、23、24）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

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 gp41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 gp41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 gp41のポケットが提示されるのに適切な条件のもとで、HIV gp41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 gp41のポケットを結合するかどうか測定される。この場合、HIV gp41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 gp41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 gp41のN - ヘリックスコイルドコイルのポケットを含むのに十分な部分のHIV gp41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変体、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 gp41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 gp41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 gp41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 gp41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 gp41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 gp41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 gp41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；結果として、HIV gp41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 gp41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



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、H I V g p 4 1 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、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、H I V g p 4 1 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、H I V 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H I V の細胞内侵入を阻害する場合、その薬物は、H I V g p 4 1 のN - ヘリックスコイルドコイルポケットを結合して、H I V の細胞内侵入を阻害する薬物である。H I V 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）インビトロで、あるいは（例えば、適切な動物モデルまたはヒトにおいて）インビ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、G C N 4 - p I<sub>Q</sub> I）などの可溶性三量体コイルドコイルと、H I V g p 4 1 のポケットを含むのに十分な部分のH I V g p 4 1 のN - ペプチドとを含むペプチドであり得る。

10

**【 0 0 5 5 】**

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、H I V g p 4 1 のN - ヘリックスコイルドコイルを結合して、H I V 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。

20

**【 0 0 5 6 】**

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、H I V g p 4 1 の2つ以上のN - ヘリックスコイルドコイルに結合して、H I V 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、H I V g p 1 2 0、C D 4、C C R 5、C X C R 4、またはH I V g p 4 1 の非ポケット領域に結合することに加えて、H I V g p 4 1 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。

30

**【 0 0 5 7 】**

H I V g p 4 1 を阻害する薬物はまた、I Q N 1 7 と、I Q N 1 7 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I Q N 1 7 とD 1 0 p e p 1 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、H I V g p 4 1 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I Q N 1 7 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。

**【 0 0 5 8 】**

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、H I V 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させるために、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、g p 4 1 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H I V 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、D 1 0 p e p 5、D 1 0 p e p 1）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。

40

50

## 【 0 0 5 9 】

上記薬剤は、経口投与、鼻腔投与、腹腔内投与、筋肉内投与、膣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的成分（例えば安定化剤、吸収もしくは取込み促進剤、着色料および/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、gp41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 1 7 8 ( C . T . W i l d , D . C . S h u g a r s , T . K . G r e e n w e l l , C . B . M c D a n a l , T . J . M a t t h e w s , 同上 9 1 : 9 7 7 0 ( 1 9 9 4 ) )、HIV-1 gp41 ( H X B 2 株 ) の残基 1 1 7 - 1 5 2 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 T 6 4 9 ) ( L . T . R i m s k y , D . C . S h u g a r s , T . J . M a t t h e w s , J . V i r o l . , 7 2 : 9 8 6 ( 1 9 9 8 ) ) 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、膣、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（例えば膣または直腸の温度、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膣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続性放出（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、（例えば膣、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的に、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 gp41 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。

## 【 0 0 6 0 】

もう一つの態様では、gp41 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H I V侵入を妨害する薬剤（例えば、C D 4段階でg p 1 2 0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、g p 4 1 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。

#### 【 0 0 6 1 】

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H I V由来またはH I V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、H I V g p 4 1のNペプチドのC末端のうちH I V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。H I V g p 4 1のNペプチドは、H I V - 1、H I V - 2、別のH I V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（S I V）、ネコ免疫不全症ウイルスまたはヒスナウイルスなど）のものであってよい。例えばH I V - 2配列L L R L T V W G T K N L Q A R V T（配列番号：26）、S I V配列L L R L T V W G T K N L Q T R V T（配列番号：27）、またはH I V - 1、H I V - 2およびS I V中の不変残基からなる配列（L L X L T V W G X K X L Q X R X X（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H I V g p 4 1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、H I V g p 4 1のNペプチドのうちH I V g p 4 1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、G C N 4 - p I<sub>Q</sub> I、G C N 4 - p I I、モロニーマウス白血病ウイルスまたはA B C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。H I V g p 4 1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H I V - 1のL L Q L T V W G I K Q L Q A R I L（配列番号：20）、H I V - 2のL L R L T V W G T K N L Q A R V T（配列番号：26）、S I VのL L R L T V W G T K N L Q T R V T（配列番号：27）またはこれらの不変残基、すなわちL L X L T V W G X K X L Q X R X X（配列番号：42）を含んでなることができる。

#### 【 0 0 6 2 】

本発明の一態様は、あるタンパク質（G C N 4 - p I<sub>Q</sub> I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、G C N 4 - p I<sub>Q</sub> Iの三量体型のコイルドコイル領域と、H I V - 1 p g 4 1のN - ペプチドの一部を含んでなることができ、そのg p 4 1のN - ペプチドの一部は、H I V - 1 g p 4 1のN - ヘリックスくぼみの一部または全部を含むか、H I V - 1 g p 4 1のN - ヘリックスくぼみを含まない。例えば、G C N 4 - p I<sub>Q</sub> I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。I Q N 2 4 n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G C N 4 - p I<sub>Q</sub> Iの29残基と、N 36のN - 末端に由来する24残基（S G I V Q Q Q N N L L R A I E A Q Q H L L Q L T）（配列番号：21）を含有し、大腸菌での組換え発現用に、余分のM e t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H I V g p 4 1のN - ペプチドの一部を含んでなることができる。I Q N 2 4 nの配列は、M 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 I S G I V Q Q Q N N L L R A I E A Q Q H L L Q L T（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D N A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。G C N 4 - p I<sub>Q</sub> IコイルドコイルのコイルドコイルパラメーターはH I V g p 4 1 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（I Q N

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<sub>Q</sub>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<sub>Q</sub>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。

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。

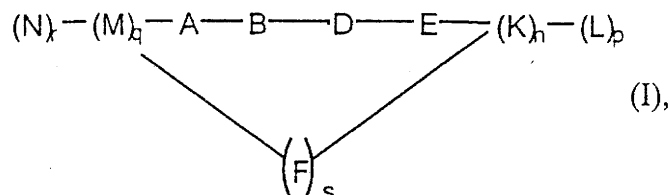
10

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。

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

一態様として、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：

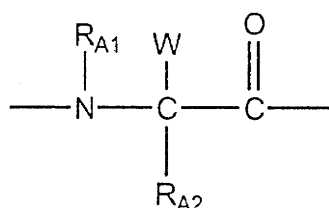


30

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。

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



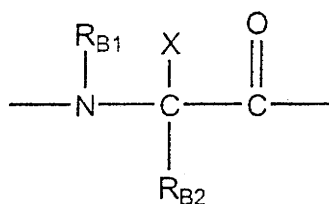
式中、 $R_{A1}$ と $R_{A2}$ の一方は、置換されたまたは非置換のアリール、ヘテロアリール、アリールメチル、ヘテロアリールメチル、ベンゾ縮合アリール、ベンゾ縮合ヘテロアリール、ベンゾ縮合アリールメチル、ベンゾ縮合ヘテロアリールメチル、シクロアルキルまたはビ

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（例えばフッ素、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：

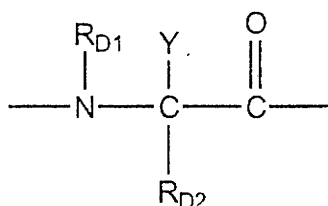


10

式中、 $\text{R}_{B1}$ と $\text{R}_{B2}$ 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：

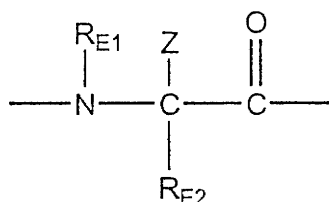


20

式中、 $\text{R}_{D1}$ と $\text{R}_{D2}$ 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ス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】

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：



30

式中、 $\text{R}_{E1}$ と $\text{R}_{E2}$ 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。

【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わせからなる。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。

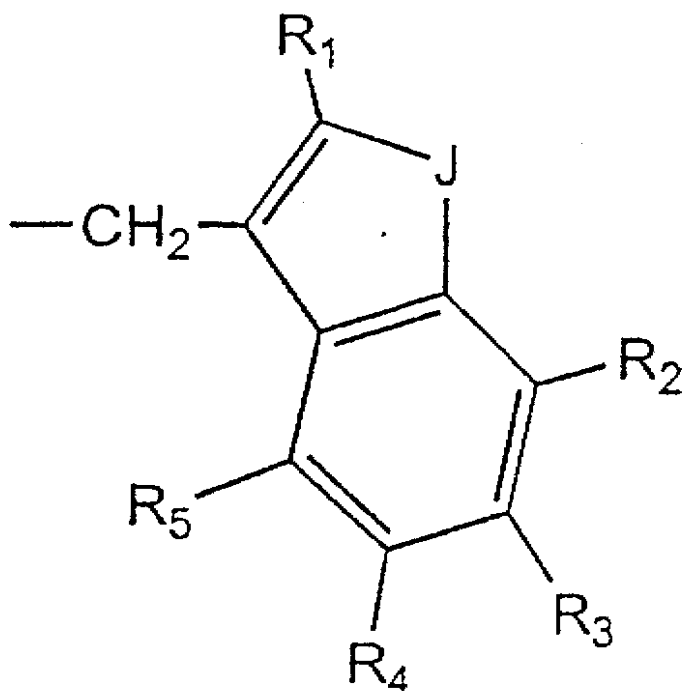
【0074】

好ましい一態様として、 $\text{R}_{A1}$ と $\text{R}_{A2}$ の一方および $\text{R}_{D1}$ と $\text{R}_{D2}$ の一方は独立してフェニル、

40

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：



〔式中、JはO、SまたはNRであり、RはHまたは直鎖状、分枝鎖状もしくは環状のC<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキル、好ましくはメチルである。R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> およびR<sub>5</sub> 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C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> 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C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> 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<sub>A1</sub>とR<sub>D1</sub>は共に水素であり、R<sub>A2</sub>とR<sub>D2</sub>はそれぞれ独立して上述した基の一つである。

【0075】

R<sub>B1</sub>とR<sub>B2</sub>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C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> 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C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> 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<sub>B1</sub>は水素であり、R<sub>B2</sub>は上述した基の一つである。

【0076】

R<sub>E1</sub>とR<sub>E2</sub>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C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> 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C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> 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<sub>E1</sub>は水素であり、R<sub>E2</sub>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 -、カルボキシル - 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 - 置換グリシル残基から

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 -  $C_1 - C_4$  - 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 $C_4 - C_{40}$  - アルキレン基、例えば式： $-(CH_2)_m-$ 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、 $(CH_2CH_2O)_q-$ 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 - 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収まり、gp41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）の大きさを取りうる。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D10pep1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いてもよい。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D10pep5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。

10

20

30

40

50

## 【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。

10

## 【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ので、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。

20

## 【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FMOC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、次に直線の水 - 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MALDI質量分析（Voyager Elite、パーセプティブ・バイオシステムズ社）で行なった。ペプチド濃度は6M GuHCl中で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)]。

30

## 【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(Aviv)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、pH7.0)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 $[\theta]_{222}$ の一次導関数の極大から見積もった。0における平均残基楕円率( $[\theta]_{222}$ 、 $10^3 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ )は次の通りだった：野生型、-31.7; Met<sup>629</sup> Ala、-32.0; Arg<sup>633</sup> Ala、-30.7; Ile<sup>635</sup> Ala、-25.9; Trp<sup>628</sup> Ala、-27.0; Trp<sup>631</sup> Ala、-24.9。Trp<sup>628</sup> AlaおよびTrp<sup>631</sup> Ala突然変異の場合、 $[\theta]_{222}$ 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 $[\theta]_{222}$ の絶対値が有意に減少すると報告されている(A. Chakraborty, T. Kortemme, S. Padmanabhan, R. L. Baldwin, Biochemistry, 32:5560 (1993))。

40

50

## 【 0 0 9 0 】

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 ) ) 。

10

## 【 0 0 9 1 】

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<sub>Q</sub> 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 <sup>8</sup> 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。

20

## 【 0 0 9 2 】

ここに記載する例では以下の実験手順を使用した。

## 【 0 0 9 3 】

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 m M N a H C O<sub>3</sub> 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 4 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 m M N a H C O<sub>3</sub> 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 m M N a H C O<sub>3</sub> 中の 3 0 m g / 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 m M 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 m g / 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 m M C a C l<sub>2</sub> 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

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LB/テ  
 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 $10^{-8} \sim 10^{-9}$ の桁の比率を持つものに対して、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。

#### 【0094】

5ラウンドのファージ選択後にD10 pep 7が同定された。7ラウンドのファージ選択  
 後に、D10 pep 1、D10 pep 3、D10 pep 4、D10 pep 5およびD10  
 pep 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D10 pep 10およびD10 pep 12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っ  
 て、それ以上は調べなかった。）

#### 【0095】

同定されたファージクローンのD-IQN17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-INC17、D-GCN4-p  
 IQI（3つの突然変異を持つもの）またはD-IQN17（G39W=グリシン36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96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K91 kan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-IQN17を含むウェルに特異的に結合した。

#### 【0096】

##### ペプチド精製

IQN17と各D10ペプチドは、FMOC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。IQN17はGCN4-pIQIに由  
 来する29残基をN-末端に含有し、N36のC-末端に由来する17残基をC-末端に  
 含有する。GCN4-pIQIとN36領域には1残基の重複があるので、45残基長の  
 ペプチドになる。溶解度を改善するために、元のGCN4-pIQI配列と比較して3つ  
 のアミノ酸置換を、IQN17のGCN4-pIQI領域に施した（Eckert, D.  
 M., J. Mol. Biol., 284: 859-865, 1998）。それらの置換  
 はL13E、Y17KおよびH18Kである。したがってIQN7の配列は、  
 ac-RMKQIEDKIEEIESKQKKIENEIARIKKKLLQLTVWGI  
 KQLQARLL-am

（ac-はN-末端アセチル基を表し、-amはC-末端アミドを表す）

であり、下線部はHIV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IQN17を合成した（IleやThr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NH<sub>2</sub>-LC-ビオチンII（ピラス社、カタログ  
 番号21336）を使ってビオチン化した。ビオチンとIQN17配列の間にはGKG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。

#### 【0097】

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IleとThr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-GACEARHREAWWLCAA-CONH<sub>2</sub> (配列番号: 34) ;  
 D10pep3: Ac-KKGACGLGQEEFWLCAA-CONH<sub>2</sub> (配列番号: 64) ;  
 D10pep4: Ac-GACDLKAKEFWLCAA-CONH<sub>2</sub> (配列番号: 35) ;  
 D10pep5: Ac-KKGACELLGWEAWWLCAA-CONH<sub>2</sub> (配列番号: 65) ;  
 D10pep6: Ac-GACSRSQPEWEWLCAA-CONH<sub>2</sub> (配列番号: 36) ;  
 D10pep7: Ac-GACLLRAPEWGWLCAA-CONH<sub>2</sub> (配列番号: 37) ;  
 D10pep10: Ac-KKGACMRGEWEWSWLCAA-CONH<sub>2</sub> (配列番号: 67) ; および 10  
 D10pep12: Ac-KKGACPLNKEAWWLCAA-CONH<sub>2</sub> (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 - 2 5 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 1 8 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 2 0 m M T r i s (p H 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 H P L C 精製した。予想されるペプチドの分子量を M A L D I - T O F 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 G u H C l 中 2 8 0 n m でのチロシン、トリプトファンおよびシステイン吸収を使って決定した (E d e l h o c h , 1 9 6 7)。ペプチド原液は D M S O 中に調製した。 20

## 【 0 0 9 9 】

D 1 0 p e p 3、D 1 0 p e p 5、D 1 0 p e p 7 a、D 1 0 p e p 1 0 および D 1 0 p e p 1 2 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、D 1 0 p e p 1 を、2 つの N 末端リジンを有するように合成し (D 1 0 p e p 1 a と示す)、リジンを有さない D 1 0 p e p 1 と比較した: D 1 0 p e p 1 a が、シンシチウム形成の阻害に関して D 1 0 p e p 1 (すなわち、リジンなし) よりも約 2 倍高い I C<sub>50</sub> を有することを見出した。さらに、D P 1 0 p e p 5 を、2 つのさらなる N 末端リジン (D 1 0 p e p 5 a 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。D 1 0 p e p 5 a のシンシチウム形成の阻害に関する I C<sub>50</sub> は、D 1 0 p e p 5 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 - L y s 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-KKGACEARHREAWWLCAA-CONH<sub>2</sub> (配列番号: 38) ;  
 D10pep4a: Ac-KKGACDLKAKEFWLCAA-CONH<sub>2</sub> (配列番号: 39) ;  
 D10pep5a: Ac-KKKKGACELLGWEAWWLCAA-CONH<sub>2</sub> (配列番号: 66) ; 40  
 D10pep6a: Ac-KKGACSRSQPEWEWLCAA-CONH<sub>2</sub> (配列番号: 40) ; および  
 D10pep7a: Ac-KKGACLLRAPEWGWLCAA-CONH<sub>2</sub> (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 1 2 アミノ酸「コア」(次いで、1 0 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:

CDLKAKEWFWLC	(配列番号：3)
CEARHREAWWLC	(配列番号：4)
CELLGWEAWWLC	(配列番号：5)
CLLRAPEWGWLC	(配列番号：6)
CSRSQPEWEWLC	(配列番号：7)
CGLGQEEWFWLC	(配列番号：8)
CMRGEWEWSWLC	(配列番号：9)
CPPLNKEAWWLC	(配列番号：10)

10

CVLKAKEWFWLC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、CXXXXXEWXWLC（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HXB2 gp160発現ベクターpCMVHXB2 gp160（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（Gaitheersburg, MD）でモニターした。IC<sub>50</sub>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。IC<sub>50</sub>を、ラングミュア式 $[y = k / (1 + ([\text{ペプチド}] / IC_{50}) + x)]$ （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）。IC<sub>50</sub>を、ラングミュア式 [

50

$y = k / (1 + [\text{ペプチド}] / IC_{50}) + x$  (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	$2.1 \pm 0.31$	$0.55 \pm 0.03$
くぼみ結合			
Trp <sup>628</sup> →Ala	53	$10 \pm 2.0$	$3.8 \pm 0.33$
Trp <sup>631</sup> →Ala	37	$61 \pm 16$	$15 \pm 0.82$
Ile <sup>635</sup> →Ala	55	$4.1 \pm 0.91$	$0.96 \pm 0.12$
対 照 残 基			
Met <sup>629</sup> →Ala	66	$2.0 \pm 0.27$	$0.74 \pm 0.03$
Arg <sup>633</sup> →Ala	65	$2.6 \pm 0.89$	$0.76 \pm 0.07$

【0106】

変異体 C34 ペプチド (10  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

【0108】

実施例5: IQN17/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 FMOC 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

せるために、 $1\ \mu\text{l}$ の当該ストックを $1\ \mu\text{l}$ の貯蔵緩衝液(10%PEG 4000、0.1 M 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P321( $a = b = 41.83$  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 $(\text{NH}_4)_2\text{OscCl}_6$ 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、0.1 M 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)  $\mu\text{l}$ のIQN17の10 mg/ml水溶液を $1\ \mu\text{l}$ の貯蔵緩衝液(1.0 M 酒石酸K、Na、0.1 M 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C222<sub>1</sub>( $a = 57.94$  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トリマーを含む。

20

#### 【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-III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、 $20^\circ$ 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SCALEPACKで積分し、計測した(Otwinowski, 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

40

#### 【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-III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SCALEITで計測し除去した(表2)。

#### 【0113】

位相決定および結晶学的精密化

50



最初に、I Q N 1 7 / D 1 0 p e p 1 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 G C N 4 - p I Q I および H I V g p 4 1 構造に由来する理論モデルの I Q N 1 7 構造 ( b u i l d ) ( E c k e r t , D . M ら、( 1 9 9 8 ) J . M o l . B i o l . 2 8 4 : 8 5 9 - 8 6 5 ; C h a n , D . C . ら、( 1 9 9 7 ) C e l l 8 9 , 2 6 3 - 2 7 3 ) 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、D 1 0 p e p 1 ペプチドのコンホ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 O s 原子の座標を決定するのに十分に良好だった。重原子は、結晶学的 3 倍軸 ( c r y a l l o g r a p h i c t h r e e - f o l d a x i s ) ( 0 . 2 2 2 , 0 . 6 6 7 , 0 . 0 4 7 ) に結合する。次いで、MAD 位相を、プログラム M L P H A R E ( 表 2 ) で産生し、プログラム D M 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 I Q N 1 7 および D 1 0 p e p 1 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 ( J o n e s , T . A . ら、( 1 9 9 1 ) A c t a C r y s t a l l o g r . D 4 7 , 1 1 0 - 1 1 9 ) で行った。I Q N 1 7 - D 1 0 p e p 1 複合体の構造を、プログラム C N S ( B r e u n g e r , A . T . ら、A c t a C r y s t a l l o g r . D 5 4 , 9 0 5 - 9 2 1 ( 1 9 9 8 ) ) 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 W H A T C H E C K ( H o f f , R . W W . ら、N a t u r e 3 8 1 : 2 7 2 ( 1 9 9 6 ) ) でチェックした。I Q N 1 7 および D 1 0 p e p 1 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、ラムチャンドランプロットの最も好ましい領域を占める。I Q N 1 7 の 2 つの最も N 末端の残基ならびに D 1 0 p e p 1 ペプチドの A r g - 6 および A r g - 8 の側鎖以外については、残基の大部分のコンホメーションは十分に規定されている。

#### 【 0 1 1 4 】

リガンド非含有 I Q N 1 7 の構造を、プログラム A M O R E ( N a v a z a , J . ( 1 9 9 4 ) A c t a C r y s t a l l o g r . A 5 0 , 1 5 7 - 1 6 3 ) および試験モデルとして精密化された I Q N 1 7 / D 1 0 p e p 1 構造の I Q N 1 7 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 D M 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 ( J o n e s ら、A c t a C r y s t a l l o g r . D 5 4 , 9 0 5 - 9 2 1 ( 1 9 9 1 ) ) で行った。I Q N 1 7 / D 1 0 p e p 1 複合体の構造をプログラム C N S ( B r u n g e r , A . T . ら、A c t a C r y s t a l l o g r . D 5 4 , 9 0 5 - 9 2 1 ( 1 9 9 8 ) ) を用いて精密化した。

#### 【 0 1 1 5 】

結晶構造は、H I V 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。

#### 【 0 1 1 6 】

実施例 6 g p 4 1 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 ( N M R ) 法

A . I Q N 1 7 疎水性ポケットと D - ペプチドとの特異的結合アッセイ

I Q N 1 7 への各 D - ペプチドの結合をアッセイするために N M R 実験を使用した。I Q N 1 7 の単一のトリプトファン残基 ( T r p - 5 7 1 で示される ) は、g p 4 1 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、I Q N 1 7 の単純な均一核一次元  $^1\text{H}$  N M R スペクトル ( 図 9 A 、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、T r p - 5 7 1 インドール由来の 5 つのシグナルを示す。g p 4 1 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  $^1\text{H}$  N M R 測定を重水素化緩衝液中の試料で行った。最初に、I Q N 1 7 の参照 ( 対照 ) スペクトルを採取し、非結合形態の T r p 5 7 1 化学シフトを同定した。第 2 のスペクトルを、I Q N 1 7 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。 $^1\text{H}$

NMR実験をBruker AMX500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Felix 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% D<sub>2</sub>O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/D10pep1a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】

D10pep1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/D10pep1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のいつかのプロトン (H<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>3</sub>; 芳香族環の4つのスカラー共役プロトン) によりD10pep1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SHIFT5 (3.0b2版、K. Osapay, D. Sitkoff, D. Case)の使用はまた、Trp-571に由来するプロトンのみが、特にH<sub>3</sub>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D10pep1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)。D10pep1複合体は、最も極度の高磁場シフトを示し、D10pep7a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、H<sub>3</sub>) に関しておよそ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

較して幾分ブロードである（交換プロセスのある型によるようである）、この効果は、D 1 0 p e p 5 a とのおよび D 1 0 p e p 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 T r p - 5 7 1 ）に対応することを確認するために、二次元 NMR（T O C S Y）実験を、各々の I Q N 1 7 / D - ペプチド複合体で行った。予想したように、T O C S Y 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 T O C S Y スペクトルを図 9 C に示す。研究したいいくつかの複合体について、N O E S Y 実験はまた、I Q N 1 7 / D 1 0 p e p 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 p p m 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 N O E 交差ピークの全てを分離することはできなかった。J . C a v a n a u g h , W . J . F a i r b r o t h e r , A . G . P a l m e r , N . J . S k e l t o n , P r o t e i n N M R S p e c t r o s c o p y : P r i n c i p l e s a n d P r a c t i c e ( 1 9 9 6 ) に記載されるような 2 D N O E S Y および T O C S Y の実験を、I Q N 1 7 および各複合体の試料で 3 0 ~ 9 0 m s ( N O E S Y ) および 3 0 ~ 7 0 m s ( T O C S Y ) の範囲のミックス時間により行った。1 1 , 1 1 1 H z および 5 5 5 5 H z のスペクトル幅を、獲得 ( a c q u i s i t i o n ) ( t <sub>2</sub> ) および間接 ( i n c i r e c t ) ( t <sub>1</sub> ) の次元の各々に使用した。T O C S Y 実験には、D I P S I - 2 r c ミックス配列 ( J . C a v a n a u g h , M . R a n c e , J . M a g n . R e s o n . S e r y . A , , 1 0 5 : 3 2 8 ( 1 9 9 3 ) ) を使用した。

#### 【0120】

我々は、アッセイした全ての D - ペプチドが、I Q N 1 7 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 I Q N 1 7 複合体の大多数（すなわち、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 6、D 1 0 p e p 1 0、および D 1 0 p e p 1 2）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、T r p - 5 7 1 を T r p - 1 0 の芳香族環との近接した接触にもたらす。D 1 0 p e p 5 a との複合体および D 1 0 p e p 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ブロードなピークは、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、g p 4 1（例えば、I Q N 1 7 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 T r p - 5 7 1 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<sup>1</sup> H 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 I Q N 1 7 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（<sup>15</sup>N および / または <sup>13</sup>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。

#### 【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<sup>1</sup> H 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 ( $^{15}\text{N}$  および / または  $^{13}\text{C}$  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、I Q N 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せられ、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、T r p - 5 7 1 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 T r p - 5 7 1 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

## 【 0 1 2 4 】

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  $^1\text{H}$  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 ( $^{15}\text{N}$  および / または  $^{13}\text{C}$  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

## 【 0 1 2 5 】

## 【表 2】

表2 データ収集および精密化統計値

データ収集				
結晶	$\lambda$ (Å)	完全性 (%)	$R_{\text{sym}}^1$ (%)	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

10

MAD位相統計学 (22.0-2.0Å)								
誘導体	$R_{\text{iso}}^2$ (%)	$R_{\text{cullis}}^3$ Acentric	$R_{\text{cullis}}^3$ Centric	$R_{\text{cullis}}^3$ Anom.	Ph. Power <sup>4</sup> Acentric	Ph. Power <sup>4</sup> Centric	Occ. <sup>5</sup>	Anom. Occ. <sup>5</sup>
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	$R_{\text{cryst}}^6$	$R_{\text{free}}^6$	R.m.s. 偏向 結合 (°)	角度
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

<sup>1</sup> $R_{\text{sym}} = \sum_j \sum_i |I_j - \langle I \rangle| / \sum_j \sum_i \langle I \rangle$ 、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。

<sup>2</sup> $R_{\text{iso}} = \sum_i |F(\lambda_i) - F(\lambda_4)| / \sum_i |F(\lambda_i)|$ 、式中、 $F(\lambda_i)$ は、波長 $\lambda_i$ 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。

<sup>3</sup> $R_{\text{cullis}} = \sum_i |F(\lambda_i) - F(\lambda_4)| / \sum_i |F_h(\lambda_i)|$ 、式中、 $F_h(\lambda_i)$ は、計算された重原子構造因子である。

<sup>4</sup>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。

<sup>5</sup>占有率は、MLPHAREからの出力値である。

<sup>6</sup> $R_{\text{cryst, free}} = \sum_i |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}| / \sum_i |F_{\text{obs}}|$ 、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。

30

## 【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。

40

## 【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) (標識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 (SGIVQQQNNLLRAIEQQHLLQLTVWGIKQLQARIL) (配列番号: 13) およびC34 (WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNNQQEKNEQEEL) (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

50

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。T r p<sup>631</sup>位における置換を有するC34ペプチドバリエーションを、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 $IC_{50}$ 値を対数スケールでプロットする。置換の態様（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。

10

【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によりフランキングされており、N-末端にブロッキング基：（アセチル-GA-C-十量体-C-AA-CONH<sub>2</sub>；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でより評価する；（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。

20

【図5】 図5Aおよび5Bは、D10pep1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、D10pep1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-pIQI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D10pep1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。

30

【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 $IC_{50}$ データを表わす。

【図7】 図7A~7Nは、IQN17に結合したD10pep1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-pIQI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。

40

【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<sup>1</sup>H NMR実験の結果を示す。図9Aは、D10pep1a（上）、IQN17（中央）およびD10pep1a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

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。

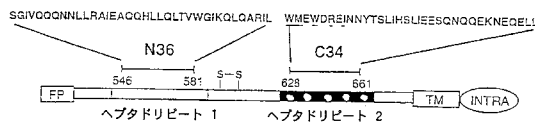
【図10】 図10は、X線結晶学により測定した、IQN17との複合体における場合のD10pep1ペプチドの立体配座を示す。

【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HIV gp41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

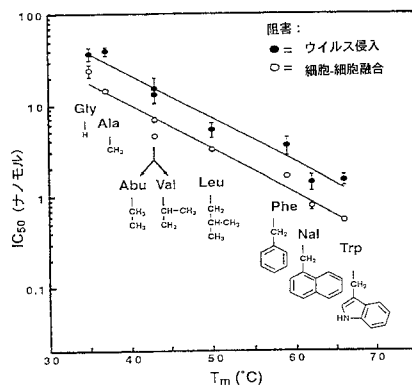
【図1】

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

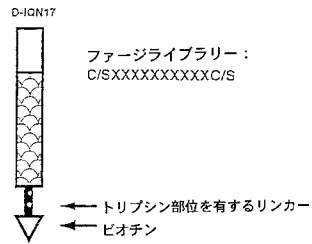
D10pep1 : Ac- G A C E A R H R E W A W L C A A - CONH2  
D10pep1a: Ac- K K G A C E A R H R E W A W L C A A - CONH2  
D10pep3 : Ac- K K G A C G L G Q E E W F W L C A A - CONH2  
D10pep4 : Ac- G A C D L K A K E W F W L C A A - CONH2  
D10pep5 : Ac- K K G A C E L L G W E W A W L C A A - CONH2  
D10pep5a: Ac- K K K G A C E L L G W E W A W L C A A - CONH2  
D10pep6 : Ac- G A C S R S Q P E W E W L C A A - CONH2  
D10pep6a : Ac- K K G A C S R S 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 C X X X X X E W X W L C

式中:  
G = グリシン  
A = アラニン  
C = シスチニン  
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  
Q = グルタミン

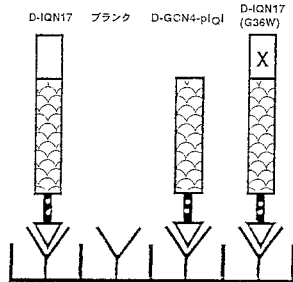
## 【図 4】

Figure 4

1. ファージ選択のラウンドを行ない、D-IQN17 に対するバインダーを同定。



2. 個々のファージクローンの配列決定  
3. 結合特異性についての試験。ファージが D-IQN17 の gp41 領域に結合するか否かの決定。



4. D-ペプチドの合成  
5. D-ペプチドの抗 HIV 活性のアッセイ

## 【図 5】

IQN17 に対する D-ペプチドの関係

Figure 5A

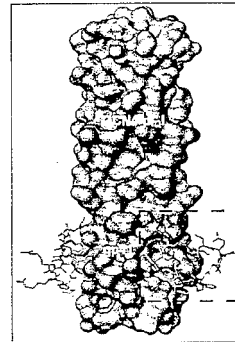
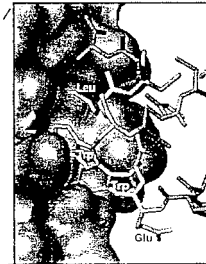


Figure 5B



## 【図 6】

Figure 6A

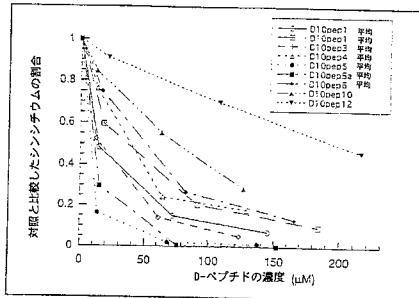


Figure 6B

D-ペプチド	およその IC <sub>50</sub> 値 (1 以上の実験から)
D10pep1	2 × 10 <sup>-5</sup> M
D10pep1A	3 × 10 <sup>-5</sup> M
D10pep3	1 × 10 <sup>-5</sup> M
D10pep4	3 × 10 <sup>-5</sup> M
D10pep5	3 × 10 <sup>-5</sup> M
D10pep5a	6 × 10 <sup>-6</sup> M
D10pep6	3 × 10 <sup>-5</sup> M
D10pep7a	4 × 10 <sup>-5</sup> M
D10pep10	6 × 10 <sup>-5</sup> M
D10pep12	2 × 10 <sup>-4</sup> M

D10pep3 } 1 × 10<sup>-4</sup> M 未満の IC<sub>50</sub> 値  
D10pep4 } を有する抗 HIV 効果を  
D10pep5 } 示す。

## 【図 7】

```

REMARK 3
REMARK 3 REFINEMENT
REMARK 3 PROGRAM : CNS 0.5
REMARK 3 AUTHORS : BRUNGER, ADAMS, CLORE, DELANO,
REMARK 3 GROS, GROSSE-KRISTELEV, JIANG,
REMARK 3 KUSZEMSKI, NILGES, 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 CUTOFF (SIGMA(F)) : 0.9
REMARK 3 DATA CUTOFF HIGH (ABS(F)) : 446169.44
REMARK 3 DATA CUTOFF LOW (ABS(F)) : 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 : THROUGHOUT
REMARK 3 FREE R VALUE TEST SET SELECTION : RANDOM
REMARK 3 R VALUE (WORKING SET) : 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 : 4
REMARK 3 BIN RESOLUTION RANGE HIGH (A) : 1.50
REMARK 3 BIN RESOLUTION RANGE LOW (A) : 1.59
REMARK 3 BIN COMPLETENESS (WORKING+TEST) (%) : 96.7
REMARK 3 REFLECTIONS IN BIN (WORKING SET) : 2508
REMARK 3 BIN R VALUE (WORKING SET) : 0.232
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 ESTIMATE ERROR OF BIN FREE R VALUE : 0.018
REMARK 3
REMARK 3 NUMBER OF NON-HYDROGEN ATOMS USED IN REFINEMENT
REMARK 3 PROTEIN ATOMS : 0
REMARK 3 NUCLEIC ACID ATOMS : 0
REMARK 3 METAL ION ATOMS : 0
REMARK 3 SOLVENT ATOMS : 0
REMARK 3
REMARK 3 B VALUES
REMARK 3 FROM WILSON PLOT (A**2) : 21.3
REMARK 3 MEAN B VALUE (OVERALL, A**2) : 29.7
REMARK 3 OVERALL ANISOTROPIC B VALUE
REMARK 3 B11 (A**2) : 3.51
REMARK 3 B22 (A**2) : 3.51
REMARK 3 B33 (A**2) : -7.22
REMARK 3 B12 (A**2) : 1.74
REMARK 3 B13 (A**2) : 0.30
REMARK 3 B23 (A**2) : 0.00
REMARK 3
REMARK 3 BULK SOLVENT MODELING
REMARK 3 METHOD USED : FLAT MODEL
REMARK 3 KSOL : 0.394054

```

Figure 7A



```

REMARK 3 BSOL : 58.3445 (A**2)
REMARK 3 ESTIMATED COORDINATE ERROR.
REMARK 3 ESC FROM LUCCAT PLOT (A) : 0.18
REMARK 3 ESC FROM SIGMA (A) : 0.09
REMARK 3 LOW RESOLUTION CUTOFF (A) : 5.00
REMARK 3
REMARK 3 CROSS-VALIDATED ESTIMATED COORDINATE ERROR.
REMARK 3 ESC FROM C-V LUCCAT PLOT (A) : 0.20
REMARK 3 ESC FROM C-V SIGMA (A) : 0.12
REMARK 3
REMARK 3 RMS DEVIATIONS FROM IDEAL VALUES.
REMARK 3 BOND LENGTHS (A) : 0.012
REMARK 3 BOND ANGLES (DEGREES) : 1.5
REMARK 3 DIHEDRAL ANGLES (DEGREES) : 15.7
REMARK 3 IMPROPER ANGLES (DEGREES) : 1.03
REMARK 3
REMARK 3 ISOTROPIC THERMAL MODEL : RESTRAINED
REMARK 3
REMARK 3 ISOTROPIC THERMAL FACTOR RESTRAINTS. RMS SIGMA
REMARK 3 MAIN-CHAIN BOND (A**2) : 0.956 ; 3.0
REMARK 3 MAIN-CHAIN ANGLE (A**2) : 0.903 ; 3.0
REMARK 3 SIDE-CHAIN BOND (A**2) : 1.853 ; 3.0
REMARK 3 SIDE-CHAIN ANGLE (A**2) : 1.676 ; 3.5
REMARK 3
REMARK 3 NCS MODEL : NONE
REMARK 3
REMARK 3 NCS RESTRAINTS. RMS SIGMA/WEIGHT
REMARK 3 GROUP 1 POSITIONAL (A**2) : NULL ; NULL
REMARK 3 GROUP 1 B-FACTOR (A**2) : NULL ; NULL
REMARK 3
REMARK 3
REMARK 3 PARAMETER FILE 1 : proteic_rep.d.param
REMARK 3 PARAMETER FILE 2 : CNS.TOPPAR/water_rep.param
REMARK 3 PARAMETER FILE 3 : CNS.TOPPAR/ion.param
REMARK 3 TOPOLOGY FILE 1 : CNS.TOPPAR/protein.top
REMARK 3 TOPOLOGY FILE 2 : CNS.TOPPAR/water.top
REMARK 3 TOPOLOGY FILE 3 : CNS.TOPPAR/ion.top
REMARK 3
REMARK 3 OTHER REFINEMENT REMARKS: NULL
SEOFES 1 A C14 ACE ARG MET LYS GLN ILE GLU ASP LYS ILE GLU GLU ILE
SEOFES 2 A C14 GLU SER LYS GLN LYS LYS ILE GLU ASN GLU ILE ALA ARG
SEOFES 3 A C11 ILE LYS LYS LEU LEU GLN LEU THR VAL TRP GLU ILE LYS
SEOFES 4 A C14 GLN ILE GLN ALA ARG ILE LEU ACE GLN GLA DCS DDU DLA
SEOFES 5 A C14 DNG DCS DNG DLU DRP DLA DRP DUT DCS DLA DLA CC WAT
SEOFES 6 A C14 WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT
SEOFES 7 A C14 WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT
SEOFES 8 A C14 WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT
SEOFES 9 A C14 WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT
SEOFES 10 A C14 WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT
SEOFES 11 A C14 WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT
SEOFES 12 A C14 WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT
SEOFES 13 A C14 WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT
SEOFES 14 A C14 WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT
SEOFES 15 A C14 WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT
SEOFES 16 A C14 WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT
SEOFES 17 A C14 WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT WAT
CRYST1 41.825 41.825 84.917 90.90 90.00 120.00 9 3 2 1 E
ORIGX1 1.906900 0.000000 0.000000 0.000000

```

Figure 7b

```

ORIGX2 0.006000 1.000000 0.000000 0.000000
ORIGX3 0.000000 0.000000 1.000000 0.000000
SCALE1 0.013907 0.013903 0.000000 0.000000
SCALE2 0.006000 0.007603 0.000000 0.000000
SCALE3 0.000000 0.000000 0.017796 0.000000
ATOM 1 CA ACE A 0 26.830 7.813 -22.925 1.00 54.89 A
ATOM 2 C ACE A 0 26.773 9.004 -22.017 1.00 54.85 A
ATOM 3 O ACE A 0 25.325 8.620 -22.124 1.00 54.90 A
ATOM 4 N ARG A 1 27.749 8.233 -1.00 54.74 A
ATOM 5 CA ARG A 1 27.815 10.139 -20.165 1.00 54.56 A
ATOM 6 CB ARG A 1 27.525 11.568 -20.887 1.00 54.54 A
ATOM 7 CG ARG A 1 27.841 12.790 -20.210 1.00 54.10 A
ATOM 8 CD ARG A 1 27.557 14.085 -20.800 1.00 54.18 A
ATOM 9 NE ARG A 1 28.177 15.253 -20.086 1.00 54.02 A
ATOM 10 CC ARG A 1 29.470 15.495 -19.870 1.00 54.03 A
ATOM 11 NH ARG A 1 30.295 14.654 -20.312 1.00 53.79 A
ATOM 12 NH2 ARG A 1 27.913 16.897 -19.266 1.00 51.77 A
ATOM 13 C ARG A 1 26.732 10.087 -19.074 1.00 54.54 A
ATOM 14 O ARG A 1 27.042 10.224 -17.894 1.00 54.51 A
ATOM 15 N MET A 2 25.528 9.809 -19.486 1.00 54.42 A
ATOM 16 CA MET A 2 24.446 9.071 -18.553 1.00 54.44 A
ATOM 17 CG MET A 2 23.074 9.796 -19.203 1.00 54.68 A
ATOM 18 CO MET A 2 22.749 8.736 -20.238 1.00 54.76 A
ATOM 19 CD MET A 2 21.345 9.232 -21.775 1.00 55.63 A
ATOM 20 CE MET A 2 22.185 9.658 -22.920 1.00 55.29 A
ATOM 21 C MET A 2 24.597 8.360 -17.755 1.00 54.51 A
ATOM 22 O MET A 2 24.073 8.245 -16.629 1.00 54.42 A
ATOM 23 N LYS A 3 25.208 7.372 -18.862 1.00 54.34 A
ATOM 24 CA LYS A 3 25.383 6.082 -17.702 1.00 54.29 A
ATOM 25 CB LYS A 3 26.212 5.139 -18.581 1.00 54.05 A
ATOM 26 CG LYS A 3 26.527 3.786 -17.956 1.00 54.04 A
ATOM 27 CD LYS A 3 27.727 3.852 -17.218 1.00 54.11 A
ATOM 28 CE LYS A 3 28.108 2.489 -16.513 1.00 54.37 A
ATOM 29 NZ LYS A 3 29.332 2.493 -15.556 1.00 53.92 A
ATOM 30 C LYS A 3 26.097 6.344 -18.384 1.00 54.33 A
ATOM 31 O LYS A 3 25.775 5.740 -15.353 1.00 54.69 A
ATOM 32 N GLN A 4 27.664 7.258 -16.426 1.00 53.94 A
ATOM 33 CA GLN A 4 27.811 7.626 -15.236 1.00 52.69 A
ATOM 34 CB GLN A 4 28.645 8.699 -15.580 1.00 54.21 A
ATOM 35 CD GLN A 4 29.863 8.574 -16.477 1.00 55.15 A
ATOM 36 CE GLN A 4 29.523 10.285 -13.732 1.00 55.56 A
ATOM 37 OE1 GLN A 4 29.532 11.354 -14.343 1.00 56.19 A
ATOM 38 NH2 GLN A 4 29.533 10.209 -12.403 1.00 55.86 A
ATOM 39 C GLN A 4 26.528 8.182 -14.212 1.00 53.19 A
ATOM 40 O GLN A 4 26.872 7.953 -13.008 1.00 53.10 A
ATOM 41 N ILE A 5 25.832 8.818 -14.705 1.00 52.58 A
ATOM 42 CA ILE A 5 24.517 9.523 -13.852 1.00 51.70 A
ATOM 43 CB ILE A 5 23.676 10.380 -14.647 1.00 52.71 A
ATOM 44 CG2 ILE A 5 22.643 10.812 -13.631 1.00 51.42 A
ATOM 45 CG1 ILE A 5 24.347 11.611 -15.246 1.00 51.48 A
ATOM 46 CD ILE A 5 23.648 12.369 -16.017 1.00 51.33 A
ATOM 47 CE ILE A 5 24.055 8.487 -12.060 1.00 51.38 A
ATOM 48 O ILE A 5 23.650 8.700 -11.920 1.00 51.09 A
ATOM 49 N GLU A 6 23.864 7.300 -13.662 1.00 50.54 A
ATOM 50 CA GLU A 6 23.148 6.214 -13.013 1.00 50.40 A
ATOM 51 CB GLU A 6 22.789 5.148 -14.041 1.00 50.43 A
ATOM 52 CG GLU A 6 22.141 5.721 -15.239 1.00 51.26 A
ATOM 53 CD GLU A 6 22.045 4.702 -16.400 1.00 51.68 A

```

Figure 7c

```

ATOM 54 OE1 GLU A 6 23.016 3.931 -16.557 1.00 52.29 A
ATOM 55 OE2 GLU A 6 21.019 4.682 -17.116 1.00 52.25 A
ATOM 56 C GLU A 6 21.995 6.606 -13.904 1.00 49.32 A
ATOM 57 O GLU A 6 23.475 5.210 -10.859 1.00 49.24 A
ATOM 58 N ASP A 7 25.302 5.827 -12.128 1.00 48.32 A
ATOM 59 ASP A 7 26.175 4.970 -11.113 1.00 47.23 A
ATOM 60 CG ASP A 7 27.544 4.626 -11.703 1.00 47.90 A
ATOM 61 CG ASP A 7 27.450 3.585 -12.768 1.00 48.33 A
ATOM 62 OD ASP A 7 26.526 2.741 -12.739 1.00 48.43 A
ATOM 63 OD ASP A 7 26.310 3.606 -13.690 1.00 48.84 A
ATOM 64 CA ASP A 7 26.344 5.920 -9.926 1.00 46.95 A
ATOM 65 O ASP A 7 26.283 5.481 -8.773 1.00 45.71 A
ATOM 66 N LYS A 8 26.551 7.209 -10.201 1.00 44.57 A
ATOM 67 CA LYS A 8 26.703 8.194 -9.429 1.00 45.22 A
ATOM 68 CB LYS A 8 26.959 9.598 -9.708 1.00 43.49 A
ATOM 69 CG LYS A 8 28.895 10.076 -10.695 1.00 44.78 A
ATOM 70 CD LYS A 8 28.423 11.125 -11.702 1.00 45.38 A
ATOM 71 CE LYS A 8 26.698 12.490 -11.068 1.00 45.64 A
ATOM 72 NZ LYS A 8 27.153 13.493 -12.069 1.00 45.55 A
ATOM 73 C LYS A 8 28.433 8.172 -8.338 1.00 41.20 A
ATOM 74 O LYS A 8 25.429 8.348 -7.058 1.00 40.81 A
ATOM 75 N ILE A 9 26.302 7.958 -6.002 1.00 39.46 A
ATOM 76 CA ILE A 9 23.015 7.855 -6.333 1.00 37.29 A
ATOM 77 CB ILE A 9 21.872 7.859 -6.358 1.00 37.14 A
ATOM 78 CG1 ILE A 9 20.600 7.251 -6.759 1.00 37.06 A
ATOM 79 CG2 ILE A 9 21.631 9.303 -8.812 1.00 36.95 A
ATOM 80 CD ILE A 9 20.440 8.440 -11.066 1.00 36.95 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 6.956 -6.292 1.00 34.76 A
ATOM 83 N GLU A 10 23.389 5.478 -7.887 1.00 34.23 A
ATOM 84 CA GLU A 10 23.353 4.263 -7.074 1.00 32.94 A
ATOM 85 CB GLU A 10 21.884 3.023 -7.847 1.00 32.87 A
ATOM 86 CG GLU A 10 23.890 -2.709 -6.991 1.00 33.10 A
ATOM 87 CD GLU A 10 24.387 0.427 -7.747 1.00 33.56 A
ATOM 88 OE1 GLU A 10 24.327 0.442 -8.999 1.00 34.07 A
ATOM 89 OE2 GLU A 10 24.342 -0.620 -7.084 1.00 32.41 A
ATOM 90 C GLU A 10 24.144 4.556 -5.878 1.00 32.53 A
ATOM 91 O GLU A 10 24.009 4.059 -4.779 1.00 32.14 A
ATOM 92 N GLU A 11 25.259 5.180 -6.100 1.00 21.82 A
ATOM 93 CA GLU A 11 26.165 5.721 -5.013 1.00 21.36 A
ATOM 94 CB GLU A 11 27.409 6.643 -5.536 1.00 21.18 A
ATOM 95 CG GLU A 11 28.338 6.833 -4.423 1.00 25.22 A
ATOM 96 CD GLU A 11 29.125 5.643 -3.822 1.00 36.93 A
ATOM 97 OE1 GLU A 11 28.438 4.580 -3.575 1.00 38.03 A
ATOM 98 OE2 GLU A 11 25.774 5.774 30.759 1.00 38.85 A
ATOM 99 C GLU A 11 25.456 6.521 -3.958 1.00 30.15 A
ATOM 100 O GLU A 11 25.556 6.277 -2.758 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 24.026 8.533 -3.550 1.00 28.34 A
ATOM 103 CB ILE A 12 23.321 9.575 -4.325 1.00 28.74 A
ATOM 104 CG1 ILE A 12 22.026 10.281 -3.501 1.00 28.70 A
ATOM 105 CG2 ILE A 12 24.327 10.743 -4.704 1.00 28.84 A
ATOM 106 CD ILE A 12 23.822 11.602 -5.890 1.00 28.69 A
ATOM 107 C ILE A 12 22.985 7.725 -2.761 1.00 27.83 A
ATOM 108 O ILE A 12 22.802 7.948 -1.560 1.00 26.48 A
ATOM 109 N GLU A 13 26.122 6.996 -3.423 1.00 27.40 A
ATOM 110 CA GLU A 13 27.163 5.965 -2.762 1.00 26.92 A
ATOM 111 CB GLU A 13 20.579 5.087 -3.805 1.00 28.34 A

```

Figure 7d

```

ATOM 112 CG GLU A 13 19.760 5.937 -4.839 1.00 29.72 A
ATOM 113 CD GLU A 13 19.080 5.118 -5.900 1.00 31.77 A
ATOM 114 OE1 GLU A 13 19.671 4.107 -6.231 1.00 33.64 A
ATOM 115 OE2 GLU A 13 17.960 5.495 -6.327 1.00 32.24 A
ATOM 116 O GLU A 13 21.510 -2.578 1.00 26.38 A
ATOM 117 C GLU A 13 22.421 4.810 0.855 1.00 25.76 A
ATOM 118 N SER A 14 23.179 4.629 -1.850 1.00 26.17 A
ATOM 119 CA SER A 14 23.899 3.702 -0.999 1.00 26.21 A
ATOM 120 CB SER A 14 25.184 4.224 -1.255 1.00 26.71 A
ATOM 121 CG SER A 14 25.934 2.470 -0.695 1.00 30.07 A
ATOM 122 C SER A 14 24.246 4.626 0.232 1.00 25.81 A
ATOM 123 O SER A 14 24.079 4.149 1.335 1.00 25.13 A
ATOM 124 N LYS A 15 24.753 5.946 0.009 1.00 24.70 A
ATOM 125 CA LYS A 15 25.092 6.713 -1.185 1.00 25.41 A
ATOM 126 CB LYS A 15 25.805 7.971 0.672 1.00 26.20 A
ATOM 127 CG LYS A 15 27.256 7.762 0.285 1.00 29.07 A
ATOM 128 CD LYS A 15 27.875 8.077 -0.220 1.00 30.87 A
ATOM 129 CE LYS A 15 29.328 8.924 0.603 1.00 32.06 A
ATOM 130 NZ LYS A 15 29.547 7.749 -1.523 1.00 34.63 A
ATOM 131 C LYS A 15 23.624 7.102 1.938 1.00 24.45 A
ATOM 132 O LYS A 15 23.862 7.779 3.272 1.00 24.50 A
ATOM 133 N GLN A 16 22.708 7.184 -0.603 1.00 24.12 A
ATOM 134 CA GLN A 16 21.450 7.566 1.904 1.00 23.82 A
ATOM 135 CB GLN A 16 20.356 7.815 2.834 1.00 25.71 A
ATOM 136 CG GLN A 16 19.229 6.942 3.232 1.00 26.64 A
ATOM 137 CD GLN A 16 18.543 9.230 0.004 1.00 32.26 A
ATOM 138 OE1 GLN A 16 18.015 8.498 -0.817 1.00 34.98 A
ATOM 139 NH2 GLN A 16 18.569 10.556 -0.135 1.00 32.74 A
ATOM 140 C GLN A 16 21.027 6.447 2.838 1.00 23.67 A
ATOM 141 O GLN A 16 20.584 6.681 3.975 1.00 22.84 A
ATOM 142 N LYS A 17 21.160 5.214 2.365 1.00 22.83 A
ATOM 143 CA LYS A 17 20.796 4.057 1.179 1.00 22.89 A
ATOM 144 CB LYS A 17 20.939 2.756 0.387 1.00 22.66 A
ATOM 145 CG LYS A 17 20.340 1.559 3.055 1.00 26.69 A
ATOM 146 CD LYS A 17 18.837 1.579 2.932 1.00 29.27 A
ATOM 147 CE LYS A 17 18.777 0.637 4.051 1.00 31.75 A
ATOM 148 NZ LYS A 17 26.686 8.870 0.943 1.00 34.25 A
ATOM 149 C LYS A 17 21.718 4.613 4.406 1.00 22.21 A
ATOM 150 O LYS A 17 22.261 3.747 5.513 1.00 21.02 A
ATOM 151 N LYS A 18 23.002 4.308 1.223 1.00 21.81 A
ATOM 152 CA LYS A 18 23.909 4.302 2.374 1.00 21.74 A
ATOM 153 CB LYS A 18 25.348 4.540 4.964 1.00 24.04 A
ATOM 154 CG LYS A 18 26.029 3.321 4.401 1.00 27.20 A
ATOM 155 CD LYS A 18 27.381 3.732 3.863 1.00 29.23 A
ATOM 156 CE LYS A 18 27.972 2.592 4.025 1.00 30.50 A
ATOM 157 NZ LYS A 18 29.290 3.610 4.752 1.00 33.37 A
ATOM 158 C LYS A 18 23.502 5.376 6.378 1.00 20.62 A
ATOM 159 O LYS A 18 23.565 5.138 7.577 1.00 19.85 A
ATOM 160 N ILE A 19 23.061 6.514 5.887 1.00 19.99 A
ATOM 161 CA ILE A 19 22.655 7.636 6.762 1.00 19.98 A
ATOM 162 CB ILE A 19 22.406 8.926 5.914 1.00 20.09 A
ATOM 163 CG1 ILE A 19 21.356 9.964 6.692 1.00 20.80 A
ATOM 164 CG2 ILE A 19 23.756 8.989 5.464 1.00 21.45 A
ATOM 165 CD1 ILE A 19 23.669 10.495 4.296 1.00 21.18 A
ATOM 166 C ILE A 19 23.400 7.221 5.517 1.00 20.44 A
ATOM 167 NH ILE A 19 21.282 7.452 8.735 1.00 20.33 A
ATOM 168 N GLU A 20 20.458 6.553 6.836 1.00 20.24 A
ATOM 169 CA GLU A 20 19.230 6.149 7.503 1.00 20.43 A

```

Figure 7e

ATOM	170	CE	GLU	A	20	18.223	5.608	6.484	1.00	22.94	A
ATOM	171	CS	GLU	A	20	17.766	6.672	5.499	1.00	20.53	A
ATOM	172	CD	GLU	A	20	16.926	6.108	4.378	1.00	29.04	A
ATOM	173	OEI	GLU	A	20	16.961	6.871	4.408	1.00	30.40	A
ATOM	174	OEI	GLU	A	20	16.243	6.901	3.691	1.00	30.73	A
ATOM	175	C	GLU	A	20	16.531	5.109	6.576	1.00	20.88	A
ATOM	176	C	GLU	A	20	16.917	5.127	6.645	1.00	26.23	A
ATOM	177	N	ASN	A	21	20.478	6.808	8.201	1.00	20.33	A
ATOM	178	CA	ASN	A	21	20.820	3.222	9.328	1.00	21.87	A
ATOM	179	CS	ASN	A	21	21.694	3.121	8.720	1.00	24.15	A
ATOM	180	CG	ASN	A	21	20.875	1.185	7.872	1.00	25.24	A
ATOM	191	ODI	ASN	A	21	19.476	0.980	8.099	1.00	28.26	A
ATOM	183	HDJ	ASN	A	21	21.505	0.549	6.870	1.00	26.73	A
ATOM	181	C	ASN	A	21	21.500	3.854	10.527	1.00	21.75	A
ATOM	184	O	ASN	A	21	21.235	3.444	11.674	1.00	22.80	A
ATOM	185	HM	GLU	A	22	20.335	4.853	10.274	1.00	20.99	A
ATOM	186	CA	GLU	A	22	23.007	5.548	11.365	1.00	20.36	A
ATOM	187	CB	GLU	A	22	24.059	6.516	10.825	1.00	22.89	A
ATOM	188	CG	GLU	A	22	24.914	7.169	11.901	1.00	25.86	A
ATOM	189	CD	GLU	A	22	25.415	6.170	10.885	1.00	27.87	A
ATOM	190	OEI	GLU	A	22	26.121	5.158	10.444	1.00	30.05	A
ATOM	191	OEI	GLU	A	22	25.376	6.411	14.118	1.00	31.29	A
ATOM	192	C	GLU	A	22	21.956	6.294	13.087	1.00	19.79	A
ATOM	193	O	GLU	A	22	21.988	6.064	13.445	1.00	20.87	A
ATOM	194	N	LEU	A	33	21.002	6.951	11.518	1.00	18.92	A
ATOM	195	CA	LEU	A	33	19.933	7.670	10.254	1.00	18.60	A
ATOM	196	CB	LEU	A	33	19.012	8.386	11.244	1.00	18.79	A
ATOM	197	CG	LEU	A	33	17.676	8.764	11.880	1.00	20.11	A
ATOM	198	CD	LEU	A	33	15.739	9.596	10.701	1.00	20.45	A
ATOM	199	OEI	LEU	A	33	19.360	10.022	9.539	1.00	22.51	A
ATOM	200	C	LEU	A	33	19.183	6.687	13.118	1.00	19.09	A
ATOM	201	O	LEU	A	33	18.807	7.006	14.260	1.00	18.74	A
ATOM	202	N	ALA	A	24	18.903	5.479	12.617	1.00	18.44	A
ATOM	203	CA	ALA	A	24	18.153	4.517	13.420	1.00	18.86	A
ATOM	204	CB	ALA	A	24	17.624	3.127	12.573	1.00	19.19	A
ATOM	205	C	ALA	A	24	17.647	4.136	14.665	1.00	18.66	A
ATOM	206	O	ALA	A	24	18.343	3.966	15.757	1.00	19.32	A
ATOM	207	N	ARG	A	25	20.274	4.028	14.568	1.00	18.57	A
ATOM	208	CA	ARG	A	25	21.111	3.666	15.709	1.00	19.19	A
ATOM	209	CB	ARG	A	25	21.822	3.342	15.287	1.00	20.85	A
ATOM	210	CG	ARG	A	25	22.674	1.959	14.627	1.00	23.87	A
ATOM	211	CD	ARG	A	25	24.108	1.536	14.425	1.00	25.32	A
ATOM	212	OEI	ARG	A	25	24.723	2.254	13.376	1.00	27.13	A
ATOM	213	OEI	ARG	A	25	24.672	2.029	12.375	1.00	27.60	A
ATOM	214	NHJ	ARG	A	25	23.955	0.979	11.641	1.00	28.92	A
ATOM	215	NHJ	ARG	A	25	25.296	2.806	11.214	1.00	27.79	A
ATOM	216	C	ARG	A	25	21.981	4.819	15.712	1.00	19.95	A
ATOM	217	O	ARG	A	25	20.842	4.582	17.940	1.00	17.93	A
ATOM	218	N	LEU	A	33	21.201	6.041	15.221	1.00	17.83	A
ATOM	219	CA	LEU	A	33	21.184	7.222	17.080	1.00	16.94	A
ATOM	220	CB	LEU	A	33	21.369	8.479	15.215	1.00	17.95	A
ATOM	221	CG	LEU	A	33	20.943	9.741	17.006	1.00	19.34	A
ATOM	222	CD	LEU	A	33	20.821	8.337	15.796	1.00	21.86	A
ATOM	223	OEI	LEU	A	33	21.144	9.567	14.721	1.00	23.82	A
ATOM	224	C	LEU	A	33	19.876	7.131	17.857	1.00	18.02	A
ATOM	225	O	LEU	A	33	19.875	7.580	19.055	1.00	17.73	A
ATOM	226	N	LYS	A	37	18.751	7.069	17.191	1.00	17.60	A
ATOM	227	CA	LYS	A	37	17.450	7.127	17.853	1.00	17.90	A

Figure 7F

ATOM	228	CE	LYS	A	37	16.330	6.994	16.825	1.00	19.01	A
ATOM	229	CG	LYS	A	37	16.266	8.210	15.876	1.00	22.27	A
ATOM	230	CD	LYS	A	37	15.275	7.984	14.711	1.00	24.01	A
ATOM	231	OEI	LYS	A	37	13.860	7.464	16.181	1.00	24.41	A
ATOM	232	OEI	LYS	A	37	13.173	8.863	15.714	1.00	27.94	A
ATOM	233	C	LYS	A	37	17.326	6.097	16.969	1.00	28.17	A
ATOM	234	C	LYS	A	37	16.767	6.388	20.012	1.00	18.33	A
ATOM	235	N	LYS	A	38	17.071	4.896	16.711	1.00	17.00	A
ATOM	236	CA	LYS	A	38	17.768	3.867	19.790	1.00	17.31	A
ATOM	237	CB	LYS	A	38	18.244	2.503	19.223	1.00	18.92	A
ATOM	238	CG	LYS	A	38	17.288	1.962	18.164	1.00	24.56	A
ATOM	239	CD	LYS	A	38	17.833	0.732	17.464	1.00	36.89	A
ATOM	240	CE	LYS	A	38	16.950	0.371	16.260	1.00	28.84	A
ATOM	241	NHJ	LYS	A	38	17.284	-0.938	15.592	1.00	31.36	A
ATOM	242	C	LYS	A	38	18.618	4.257	21.016	1.00	17.36	A
ATOM	243	O	LYS	A	38	19.169	4.066	22.165	1.00	17.54	A
ATOM	244	N	LEU	A	39	19.794	4.835	20.793	1.00	16.84	A
ATOM	245	CA	LEU	A	39	20.642	5.234	21.912	1.00	16.41	A
ATOM	246	CB	LEU	A	39	22.077	5.529	22.453	1.00	16.28	A
ATOM	247	CG	LEU	A	39	23.050	6.048	22.215	1.00	16.76	A
ATOM	248	CD	LEU	A	39	23.062	5.096	23.701	1.00	16.47	A
ATOM	249	OEI	LEU	A	39	24.450	6.201	21.885	1.00	17.67	A
ATOM	250	C	LEU	A	39	20.023	6.429	22.606	1.00	16.92	A
ATOM	251	O	LEU	A	39	20.027	6.503	23.859	1.00	16.34	A
ATOM	252	N	LEU	A	39	19.447	7.343	21.820	1.00	15.57	A
ATOM	253	CA	LEU	A	39	18.818	8.519	22.424	1.00	15.77	A
ATOM	254	CB	LEU	A	39	18.401	9.501	21.296	1.00	15.65	A
ATOM	255	CG	LEU	A	39	17.717	10.780	21.696	1.00	17.55	A
ATOM	256	CD	LEU	A	39	18.557	11.504	20.722	1.00	16.71	A
ATOM	257	OEI	LEU	A	39	17.552	12.602	20.395	1.00	18.10	A
ATOM	258	C	LEU	A	39	17.659	8.057	23.288	1.00	16.42	A
ATOM	259	O	LEU	A	39	17.466	8.604	24.399	1.00	17.55	A
ATOM	260	N	GLN	A	31	16.903	7.053	23.862	1.00	16.79	A
ATOM	261	CA	GLN	A	31	15.816	6.564	23.692	1.00	18.12	A
ATOM	262	CB	GLN	A	31	14.945	5.593	22.886	1.00	21.45	A
ATOM	263	CG	GLN	A	31	14.519	6.258	22.834	1.00	24.92	A
ATOM	264	CD	GLN	A	31	13.196	7.417	22.424	1.00	26.81	A
ATOM	265	OEI	GLN	A	31	12.913	8.459	21.786	1.00	28.75	A
ATOM	266	NHJ	GLN	A	31	12.713	7.207	23.648	1.00	29.86	A
ATOM	267	C	GLN	A	31	16.319	5.895	25.008	1.00	17.82	A
ATOM	268	O	GLN	A	31	15.655	6.092	26.038	1.00	17.79	A
ATOM	269	N	LEU	A	32	17.494	5.307	24.987	1.00	15.77	A
ATOM	270	CA	LEU	A	32	18.070	4.755	26.209	1.00	14.63	A
ATOM	271	CB	LEU	A	32	19.314	4.912	25.911	1.00	16.15	A
ATOM	272	CG	LEU	A	32	19.015	2.574	25.375	1.00	18.58	A
ATOM	273	CD	LEU	A	32	20.291	1.961	24.770	1.00	20.70	A
ATOM	274	OEI	LEU	A	32	18.337	1.698	26.125	1.00	22.17	A
ATOM	275	C	LEU	A	32	18.449	5.895	27.140	1.00	13.68	A
ATOM	276	O	LEU	A	32	18.258	5.774	28.257	1.00	13.31	A
ATOM	277	N	THR	A	33	18.980	6.991	26.600	1.00	13.42	A
ATOM	278	CA	THR	A	33	19.348	8.081	27.500	1.00	12.96	A
ATOM	279	CB	THR	A	33	20.216	8.134	28.820	1.00	13.48	A
ATOM	280	CG	THR	A	33	19.530	9.745	25.733	1.00	15.60	A
ATOM	281	CD	THR	A	33	21.567	8.508	26.358	1.00	15.01	A
ATOM	282	C	THR	A	33	19.124	8.742	28.117	1.00	13.65	A
ATOM	283	O	THR	A	33	18.155	9.169	29.263	1.00	12.87	A
ATOM	284	N	VAL	A	34	17.038	8.838	27.245	1.00	13.20	A
ATOM	285	CA	VAL	A	34	15.804	9.410	27.863	1.00	13.98	A

Figure 7G

ATOM	286	CB	VAL	A	34	14.708	9.498	26.773	1.00	14.31	A
ATOM	287	CG	VAL	A	34	13.380	9.811	27.382	1.00	15.35	A
ATOM	288	CD	VAL	A	34	15.098	10.517	25.710	1.00	15.04	A
ATOM	289	C	VAL	A	34	15.328	8.526	29.011	1.00	12.55	A
ATOM	290	O	VAL	A	34	14.997	9.016	30.151	1.00	11.43	A
ATOM	291	N	TRP	A	35	15.354	7.210	28.857	1.00	13.04	A
ATOM	292	CA	TRP	A	35	14.946	6.289	29.906	1.00	13.11	A
ATOM	293	CB	TRP	A	35	15.986	8.661	30.151	1.00	13.11	A
ATOM	294	CD	TRP	A	35	14.978	7.385	30.151	1.00	15.43	A
ATOM	295	CND	TRP	A	35	15.160	3.101	31.391	1.00	15.26	A
ATOM	296	CEL	TRP	A	35	14.860	3.165	31.961	1.00	15.15	A
ATOM	297	CE3	TRP	A	35	14.600	3.196	32.185	1.00	14.49	A
ATOM	298	CE4	TRP	A	35	15.157	3.258	32.909	1.00	17.57	A
ATOM	299	NE1	TRP	A	35	13.553	2.281	31.572	1.00	17.80	A
ATOM	300	CE2	TRP	A	35	15.459	1.204	32.905	1.00	15.31	A
ATOM	301	CE3	TRP	A	35	17.600	2.255	32.349	1.00	16.17	A
ATOM	302	CE2	TRP	A	35	15.437	1.204	32.905	1.00	15.31	A
ATOM	303	C	TRP	A	35	15.869	6.429	31.341	1.00	13.13	A
ATOM	304	O	TRP	A	35	15.118	6.409	32.873	1.00	15.76	A
ATOM	305	N	GLY	A	36	17.176	6.556	30.697	1.00	12.50	A
ATOM	306	C	GLY	A	36	16.448	6.669	30.697	1.00	12.50	A
ATOM	307	C	GLY	A	36	17.887	8.936	32.817	1.00	11.58	A
ATOM	308	O	GLY	A	36	17.917	7.875	34.042	1.00	11.70	A
ATOM	309	N	ILE	A	37	7.556	9.084	32.174	1.00	11.85	A
ATOM	310	C	ILE	A	37	10.303	8.183	32.174	1.00	11.85	A
ATOM	311	CB	ILE	A	37	12.852	14.439	33.882	1.00	13.22	A
ATOM	312	CG2	ILE	A	37	16.838	12.660	32.630	1.00	13.25	A
ATOM	313	CG1	ILE	A	37	16.656	11.739	31.491	1.00	12.70	A
ATOM	314	C	ILE	A	37	16.571	10.546	33.882	1.00	13.22	A
ATOM	315	C	ILE	A	37	16.082	10.105	35.765	1.00	13.99	A
ATOM	316	O	ILE	A	37	16.026	10.526	34.800	1.00	12.24	A
ATOM	317	N	LYS	A	38	15.069	8.485	33.094	1.00	11.84	A
ATOM	318	C	LYS	A	38	15.825	8.485	33.094	1.00	11.84	A
ATOM	319	CB	LYS	A	38	12.840	8.515	32.661	1.00	15.00	A
ATOM	320	CG	LYS	A	38	11.429	8.437	33.389	1.00	17.76	A
ATOM	321	CD	LYS	A	38	14.545	7.635	33.267	1.00	20.78	A
ATOM	322	C	LYS	A	38	14.046	7.988	33.389	1.00	17.76	A
ATOM	323	NZ	LYS	A	38	8.721	7.049	33.582	1.00	29.03	A
ATOM	324	C	LYS	A	39	14.060	8.399	35.023	1.00	12.64	A
ATOM	325	O	LYS	A	38	13.490	8.724	36.753	1.00	15.58	A
ATOM	326	N	GLN	A	39	17.373	7.777	36.753	1.00	15.58	A
ATOM	327	CA	GLN	A	39	15.176	6.573	36.299	1.00	11.84	A
ATOM	328	CB	GLN	A	39	16.049	5.735	35.900	1.00	12.90	A
ATOM	329	CG	GLN	A	39	15.580	4.440	34.757	1.00	14.71	A
ATOM	330	C	GLN	A	39	14.116	4.815	35.900	1.00	12.90	A
ATOM	331	CD1	GLN	A	39	13.596	5.591	35.669	1.00	22.45	A
ATOM	332	NE2	GLN	A	39	13.420	4.721	33.391	1.00	22.45	A
ATOM	333	C	GLN	A	39	13.907	7.272	37.359	1.00	12.24	A
ATOM	334	O	GLN	A	39	13.711	8.205	38.584	1.00	12.24	A
ATOM	335	N	LEU	A	40	16.883	8.195	36.854	1.00	10.89	A
ATOM	336	CA	LEU	A	40	17.632	9.980	37.893	1.00	11.44	A
ATOM	337	CB	LEU	A	40	16.860	8.648	37.198	1.00	12.26	A
ATOM	338	CD	LEU	A	40	18.533	8.227	38.584	1.00	11.44	A
ATOM	339	CND	LEU	A	40	22.097	9.367	36.666	1.00	15.06	A
ATOM	340	CDS	LEU	A	40	20.293	7.026	37.050	1.00	17.91	A
ATOM	341	C	LEU	A	40	16.763	16.346	38.497	1.00	10.71	A
ATOM	342	O	LEU	A	40	16.763	16.346	38.497	1.00	10.71	A
ATOM	343	N	SIN	A	41	15.911	10.692	37.704	1.00	22.62	A

ATOM	402	SG	DCE D	3	-19.502	-2.991	25.840	1.00	30.98	E
ATOM	403	N	DLU D	4	-5.813	-4.736	26.474	1.00	31.68	B
ATOM	404	CA	DLU D	4	-14.782	-5.702	28.834	1.00	32.07	B
ATOM	405	CB	DLU D	4	-13.367	-3.264	28.874	1.00	32.45	B
ATOM	406	CO	DLU D	4	-13.060	-4.844	27.092	1.00	32.83	B
ATOM	407	CD	DLU D	4	-13.663	-3.568	26.500	1.00	36.29	B
ATOM	408	OEL	DLU D	4	-14.422	-2.859	27.182	1.00	37.11	B
ATOM	409	OEL	DLU D	4	-13.367	-3.264	28.874	1.00	37.45	B
ATOM	410	C	DLU D	4	-14.875	-6.180	30.270	1.00	31.86	B
ATOM	411	O	DLU D	4	-14.832	-7.381	30.833	1.00	30.19	B
ATOM	412	N	DLA D	5	-13.022	-5.237	31.198	1.00	30.98	B
ATOM	413	CA	DLA D	5	-15.098	-5.586	32.611	1.00	30.63	B
ATOM	414	CB	DLA D	5	-14.984	-4.296	33.408	1.00	30.93	B
ATOM	415	C	DLA D	5	-16.362	-6.340	33.008	1.00	30.19	B
ATOM	416	O	DLA D	5	-16.387	-7.044	34.027	1.00	30.50	B
ATOM	417	N	DRD D	6	-17.448	-6.222	32.136	1.00	27.42	B
ATOM	418	CA	DRD D	6	-18.473	-6.893	32.489	1.00	28.77	B
ATOM	419	CB	DRD D	6	-18.480	-8.408	32.369	1.00	31.46	B
ATOM	420	CO	DRD D	6	-18.169	-8.847	30.969	1.00	34.88	B
ATOM	421	CD	DRD D	6	-19.397	-8.752	30.070	1.00	37.42	B
ATOM	422	OE	DRD D	6	-16.725	-7.408	29.667	1.00	40.28	B
ATOM	423	OE	DRD D	6	-20.121	-7.134	28.370	1.00	40.89	B
ATOM	424	MH1	DRD D	6	-20.248	-8.118	27.491	1.00	42.76	B
ATOM	425	MH2	DRD D	6	-20.409	-5.891	26.015	1.00	42.55	B
ATOM	426	C	DRD D	6	-19.313	-6.582	33.833	1.00	27.29	B
ATOM	427	O	DRD D	6	-19.994	-7.403	34.421	1.00	27.43	B
ATOM	428	N	D18 D	7	-19.100	-5.579	34.342	1.00	24.49	B
ATOM	429	CA	D18 D	7	-19.721	-5.018	35.624	1.00	21.84	B
ATOM	430	CB	D18 D	7	-18.870	-3.888	36.284	1.00	22.68	B
ATOM	431	CG	D18 D	7	-17.655	-4.321	36.854	1.00	22.88	B
ATOM	432	CD	D18 D	7	-17.178	-5.587	37.104	1.00	24.08	B
ATOM	433	CE	D18 D	7	-16.650	-3.445	37.187	1.00	25.78	B
ATOM	434	CE	D18 D	7	-15.595	-4.134	37.608	1.00	26.45	B
ATOM	435	NE2	D18 D	7	-15.894	-5.419	37.562	1.00	25.11	B
ATOM	436	C	D18 D	7	-21.156	-4.036	35.229	1.00	21.84	B
ATOM	437	O	D18 D	7	-21.422	-3.743	34.536	1.00	22.52	B
ATOM	438	N	DRD D	8	-22.051	-5.298	36.003	1.00	20.53	B
ATOM	439	CA	DRD D	8	-22.454	-5.122	35.778	1.00	19.80	B
ATOM	440	CB	DRD D	8	-24.284	-5.994	36.755	1.00	20.87	B
ATOM	441	CG	DRD D	8	-24.723	-7.428	36.459	1.00	24.87	B
ATOM	442	CD	DRD D	8	-24.743	-8.307	37.631	1.00	29.07	B
ATOM	443	NE	DRD D	8	-24.981	-5.607	37.205	1.00	31.54	B
ATOM	444	CE	DRD D	8	-25.258	-10.289	36.252	1.00	32.94	B
ATOM	445	NE1	DRD D	8	-26.139	-9.481	35.658	1.00	37.88	B
ATOM	446	MH2	DRD D	8	-24.987	-11.432	36.027	1.00	33.88	B
ATOM	447	C	DRD D	8	-23.985	-3.711	35.973	1.00	17.95	B
ATOM	448	O	DRD D	8	-24.858	-3.361	35.124	1.00	17.42	B
ATOM	449	H	DRD D	9	-23.407	-2.814	36.783	1.00	24.93	B
ATOM	450	CA	DLU D	9	-23.900	-1.578	36.951	1.00	15.49	B
ATOM	451	CB	DLU D	9	-23.558	-0.954	38.261	1.00	16.03	B
ATOM	452	CG	DLU D	9	-21.876	-0.652	38.332	1.00	16.75	B
ATOM	453	CD	DLU D	9	-20.896	-1.816	38.786	1.00	14.82	B
ATOM	454	OE1	DLU D	9	-21.407	-1.982	38.584	1.00	19.63	B
ATOM	455	OE2	DLU D	9	-19.923	-1.498	39.310	1.00	20.12	B
ATOM	456	C	DLU D	9	-23.621	-0.717	38.747	1.00	19.57	B
ATOM	457	O	DLU D	9	-24.142	-0.152	35.615	1.00	15.24	B
ATOM	458	N	DRD D	10	-22.747	-1.186	34.844	1.00	15.66	B
ATOM	459	CA	DRD D	10	-22.462	-0.435	35.611	1.00	15.31	B

Figure J

ATOM	460	CB	DRP D	10	-20.560	-0.187	33.420	1.00	16.05	B
ATOM	461	CO	DRP D	10	-20.354	0.791	34.420	1.00	15.28	B
ATOM	462	CD	DRP D	10	-20.504	2.200	34.284	1.00	15.28	B
ATOM	463	CE	DRP D	10	-19.734	1.730	34.424	1.00	15.74	B
ATOM	464	CE	DRP D	10	-21.427	3.078	33.283	1.00	15.47	B
ATOM	465	CD	DRP D	10	-19.504	0.512	33.343	1.00	16.40	B
ATOM	466	NE1	DRP D	10	-19.121	1.876	36.073	1.00	17.32	B
ATOM	467	NE	DRP D	10	-19.450	4.177	35.466	1.00	15.91	B
ATOM	468	CB	DRP D	10	-21.174	4.444	33.805	1.00	14.91	B
ATOM	469	CH	DRP D	10	-20.382	4.933	34.855	1.00	15.26	B
ATOM	470	C	DRP D	10	-22.006	-1.140	32.376	1.00	17.72	B
ATOM	471	O	DRP D	10	-22.790	-0.682	32.244	1.00	16.99	B
ATOM	472	N	DLA D	11	-23.744	-2.227	32.572	1.00	17.72	B
ATOM	473	CA	DLA D	11	-24.253	-2.940	31.407	1.00	18.88	B
ATOM	474	CB	DLA D	11	-25.034	-4.168	31.867	1.00	20.11	B
ATOM	475	CG	DLA D	11	-25.126	-4.072	30.501	1.00	18.95	B
ATOM	476	C	DLA D	11	-25.078	-1.221	29.267	1.00	21.13	B
ATOM	477	N	DRD D	12	-25.884	-1.142	31.084	1.00	17.86	B
ATOM	478	CA	DRD D	12	-26.755	-0.275	30.317	1.00	17.72	B
ATOM	479	CB	DRD D	12	-27.586	0.645	27.129	1.00	18.43	B
ATOM	480	CO	DRD D	12	-26.725	1.588	22.055	1.00	16.68	B
ATOM	481	CD	DRD D	12	-26.285	2.900	32.676	1.00	16.49	B
ATOM	482	CE	DRD D	12	-25.459	3.371	32.706	1.00	15.68	B
ATOM	483	CE	DRD D	12	-26.519	3.714	30.561	1.00	17.34	B
ATOM	484	CD	DRP D	12	-26.177	1.335	33.258	1.00	15.60	B
ATOM	485	NE1	DRP D	12	-25.402	2.400	33.668	1.00	15.74	B
ATOM	486	CE2	DRP D	12	-24.842	4.628	32.664	1.00	15.78	B
ATOM	487	CE	DRP D	12	-25.904	6.097	30.525	1.00	17.42	B
ATOM	488	CH2	DRP D	12	-25.090	5.406	32.550	1.00	16.81	B
ATOM	489	C	DRP D	12	-25.923	0.377	29.346	1.00	18.81	B
ATOM	490	O	DRP D	12	-26.347	0.870	28.224	1.00	20.05	B
ATOM	491	CA	DRP D	12	-24.540	1.020	29.790	1.00	17.71	B
ATOM	492	CB	DRP D	12	-23.915	1.866	28.926	1.00	17.59	B
ATOM	493	CG	DRP D	12	-22.883	2.647	29.756	1.00	15.97	B
ATOM	494	CD	DRP D	12	-22.857	3.489	28.971	1.00	15.31	B
ATOM	495	CE	DRP D	12	-22.559	4.595	29.264	1.00	16.99	B
ATOM	496	CE2	DRP D	12	-20.886	4.105	29.938	1.00	16.07	B
ATOM	497	C	DRP D	12	-23.265	1.011	27.847	1.00	19.32	B
ATOM	498	C	DRP D	12	-23.224	1.429	26.702	1.00	20.12	B
ATOM	499	CA	DRP D	12	-22.775	2.800	29.259	1.00	20.93	B
ATOM	500	CA	DRP D	12	-22.190	-1.046	27.196	1.00	22.79	B
ATOM	501	C	DRP D	12	-23.273	-1.329	26.124	1.00	22.54	B
ATOM	502	O	DRP D	12	-22.962	-1.228	24.936	1.00	23.87	B
ATOM	503	CA	DRP D	12	-21.075	-0.219	27.474	1.00	23.47	B
ATOM	504	CB	DRP D	12	-21.316	-1.669	26.732	1.00	27.91	B
ATOM	505	N	DLA D	13	-24.514	-1.568	26.532	1.00	22.47	B
ATOM	506	CA	DLA D	13	-25.627	-1.857	25.624	1.00	23.31	B
ATOM	507	CB	DLA D	13	-24.863	-0.302	26.402	1.00	24.05	B
ATOM	508	C	DLA D	13	-25.987	-0.672	24.737	1.00	24.16	B
ATOM	509	O	DLA D	13	-26.511	-0.844	23.614	1.00	25.93	B
ATOM	510	N	DLA D	13	-25.723	0.544	25.192	1.00	22.60	B
ATOM	511	CA	DLA D	13	-26.017	-1.743	24.400	1.00	23.47	B
ATOM	512	CB	DLA D	13	-26.006	2.985	25.334	1.00	22.02	B
ATOM	513	C	DLA D	13	-24.995	-1.937	23.278	1.00	21.85	B
ATOM	514	C	DLA D	13	-25.255	-1.570	22.256	1.00	22.36	B
ATOM	515	YT	DLA D	16	-19.843	0.460	22.430	1.00	22.47	B
ATOM	516	CL-1	CL	1	-20.914	10.275	1.899	1.00	45.94	B
ATOM	517	CH2	WAT W	1	-23.921	6.454	-21.684	1.00	53.50	W

Figure K

ATOM	518	CH2	WAT W	2	-30.822	-2.444	-19.357	1.00	32.17	W
ATOM	519	CH2	WAT W	3	-30.359	-13.971	-17.693	1.00	37.23	W
ATOM	520	CH2	WAT W	4	-27.699	-12.875	-16.588	1.00	46.63	W
ATOM	521	CH2	WAT W	5	-21.437	-1.727	-13.268	1.00	48.42	W
ATOM	522	CH2	WAT W	6	-24.012	-1.401	-16.007	1.00	58.65	W
ATOM	523	CH2	WAT W	7	-16.572	-3.069	-7.432	1.00	56.12	W
ATOM	524	CH2	WAT W	8	-32.392	-12.028	-8.534	1.00	55.01	W
ATOM	525	CH2	WAT W	9	-29.756	-12.775	-10.061	1.00	56.48	W
ATOM	526	CH2	WAT W	10	-30.319	-10.662	-12.067	1.00	28.89	W
ATOM	527	CH2	WAT W	11	-26.634	-1.459	-10.109	1.00	43.04	W
ATOM	528	CH2	WAT W	12	-27.878	-0.322	-12.146	1.00	55.95	W
ATOM	529	CH2	WAT W	13	-28.878	-0.258	-12.146	1.00	55.95	W
ATOM	530	CH2	WAT W	14	-29.878	-0.441	-6.889	1.00	55.95	W
ATOM	531	CH2	WAT W	15	-22.531	-1.843	-4.021	1.00	32.19	W
ATOM	532	CH2	WAT W	16	-23.814	-0.594	-4.335	1.00	39.56	W
ATOM	533	CH2	WAT W	17	-19.996	-1.598	-5.230	1.00	32.28	W
ATOM	534	CH2	WAT W	18	-20.596	-0.389	-5.230	1.00	32.28	W
ATOM	535	CH2	WAT W	19	-20.596	-0.360	-6.051	1.00	35.95	W
ATOM	536	CH2	WAT W	20	-24.169	-1.421	-1.823	1.00	29.92	W
ATOM	537	CH2	WAT W	21	-29.134	-0.563	-6.291	1.00	44.18	W
ATOM	538	CH2	WAT W	22	-29.134	-0.563	-6.291	1.00	44.18	W
ATOM	539	CH2	WAT W	23	-26.774	-0.049	-4.587	1.00	45.47	W
ATOM	540	CH2	WAT W	24	-30.028	-5.236	-1.507	1.00	50.86	W
ATOM	541	CH2	WAT W	25	-27.776	-4.566	-0.616	1.00	50.86	W
ATOM	542	CH2	WAT W	26	-27.776	-4.566	-0.616	1.00	50.86	W
ATOM	543	CH2	WAT W	28	-18.650	-4.460	-0.423	1.00	53.15	W
ATOM	544	CH2	WAT W	29	-18.229	-1.842	-1.284	1.00	40.23	W
ATOM	545	CH2	WAT W	30	-11.826	-6.259	-7.700	1.00	40.23	W
ATOM	546	CH2	WAT W	31	-15.829	-6.259	-7.700	1.00	55.95	W
ATOM	547	CH2	WAT W	32	-16.956	-4.594	-3.980	1.00	47.84	W
ATOM	548	CH2	WAT W	33	-17.260	-2.099	-7.679	1.00	46.32	W
ATOM	549	CH2	WAT W	34	-17.636	-1.737	-4.373	1.00	51.34	W
ATOM	550	CH2	WAT W	35	-17.636	-1.737	-4.373	1.00	51.34	W
ATOM	551	CH2	WAT W	36	-26.030	-6.896	-8.979	1.00	51.32	W
ATOM	552	CH2	WAT W	37	-13.758	-2.898	-5.624	1.00	52.05	W
ATOM	553	CH2	WAT W	38	-18.959	-5.914	-1.925	1.00	52.05	W
ATOM	554	CH2	WAT W	39	-18.959	-5.914	-1.925	1.00	47.80	W
ATOM	555	CH2	WAT W	40	-13.762	-3.335	-1.229	1.00	50.60	W
ATOM	556	CH2	WAT W	41	-13.767	-3.805	-6.276	1.00	51.80	W
ATOM	557	CH2	WAT W	42	-15.867	-5.017	-6.276	1.00	51.80	W
ATOM	558	CH2	WAT W	43	-20.080	-4.998	-18.025	1.00	45.74	W
ATOM	559	CH2	WAT W	44	-14.273	-3.983	-13.842	1.00	32.62	W
ATOM	560	CH2	WAT W	45	-14.275	-2.720	-20.720	1.00	40.13	W
ATOM	561	CH2	WAT W	46	-21.969	-2.228	-2.885	1.00	28.23	W
ATOM	562	CH2	WAT W	47	-19.958	-2.228	-2.885	1.00	28.23	W
ATOM	563	CH2	WAT W	48	-11.908	-3.300	-22.023	1.00	50.50	W
ATOM	564	CH2	WAT W	49	-13.679	-0.626	-18.643	1.00	46.46	W
ATOM	565	CH2	WAT W	50	-16.169	-2.296	-22.597	1.00	30.08	W
ATOM	566	CH2	WAT W	51	-16.169	-2.296	-22.597	1.00	30.08	W
ATOM	567	CH2	WAT W	52	-24.603	-7.931	-19.581	1.00	65.55	W
ATOM	568	CH2	WAT W	53	-13.967	-0.791	-23.131	1.00	56.27	W
ATOM	569	CH2	WAT W	54	-24.646	-5.366	-27.933	1.00	40.24	W
ATOM	570	CH2	WAT W	55	-24.646	-5.366	-27.933	1.00	40.24	W
ATOM	571	CH2	WAT W	56	-13.747	-0.562	-13.394	1.00	36.92	W
ATOM	572	CH2	WAT W	57	-14.818	-4.442	-15.902	1.00	23.61	W
ATOM	573	CH2	WAT W	58	-10.854	-5.349	-19.724	1.00	45.93	W
ATOM	574	CH2	WAT W	59	-10.854	-5.349	-19.724	1.00	45.93	W
ATOM	575	CH2	WAT W	60	-10.497	-0.303	-21.845	1.00	34.16	W

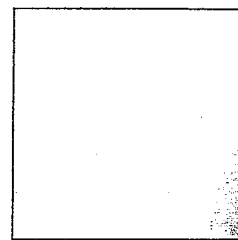
ATOM	634	CH2	WAT	W 119	33.766	4.315	-14.106	1.00	57.44	W
ATOM	635	CH2	WAT	W 120	26.821	7.497	7.075	1.00	40.38	W
ATOM	636	CH2	WAT	W 121	26.562	8.205	4.240	1.00	32.00	W
ATOM	637	CH2	WAT	W 122	29.061	7.029	1.251	1.00	46.10	W
ATOM	638	CH2	WAT	W 123	21.080	-0.375	10.516	1.00	29.31	W
ATOM	639	CH2	WAT	W 124	28.285	3.991	13.044	1.00	45.28	W
ATOM	640	CH2	WAT	W 125	29.400	7.324	10.996	1.00	52.21	W
ATOM	641	CH2	WAT	W 126	12.966	3.595	24.073	1.00	59.42	W
ATOM	642	CH2	WAT	W 127	8.932	7.961	36.476	1.00	45.85	W
ATOM	643	CH2	WAT	W 128	12.712	5.206	41.719	1.00	38.55	W
ATOM	644	CH2	WAT	W 129	9.421	10.564	47.230	1.00	35.27	W
ATOM	645	CH2	WAT	W 130	6.643	9.576	45.596	1.00	44.00	W
ATOM	646	CH2	WAT	W 131	21.501	13.057	45.856	1.00	43.49	W
ATOM	647	CH2	WAT	W 132	19.368	14.112	46.567	1.00	41.15	W
ATOM	648	CH2	WAT	W 133	20.913	12.058	48.230	1.00	36.86	W
ATOM	649	CH2	WAT	W 134	13.556	4.967	44.137	1.00	45.55	W
ATOM	650	CH2	WAT	W 135	17.568	0.000	0.010	1.00	54.94	W
ATOM	651	CH2	WAT	W 136	17.847	-0.139	11.093	1.00	42.03	W
ATOM	652	CH2	WAT	W 137	25.724	4.074	15.641	1.00	35.36	W
ATOM	653	CH2	WAT	W 138	8.107	7.930	38.831	1.00	37.47	W
ATOM	654	CH2	WAT	W 139	10.614	4.503	44.378	1.00	61.10	W
ATOM	655	CH2	WAT	W 140	14.180	-9.552	32.610	1.00	37.66	W
ATOM	656	CH2	WAT	W 141	26.549	-4.070	22.858	1.00	48.09	W
ATOM	657	CH2	WAT	W 142	21.688	-2.141	22.847	1.00	36.75	W
ATOM	658	CH2	WAT	W 143	15.457	1.462	37.789	1.00	38.11	W
ATOM	659	CH2	WAT	W 144	18.956	16.356	45.521	1.00	36.93	W
ATOM	660	CH2	WAT	W 145	15.655	2.928	40.193	1.00	40.77	W
ATOM	661	CH2	WAT	W 146	15.688	-1.613	15.777	1.00	47.04	W
ATOM	662	CH2	WAT	W 147	26.880	-5.027	38.327	1.00	44.89	W
ATOM	663	CH2	WAT	W 148	28.682	-5.605	33.707	1.00	43.34	W
ATOM	664	CH2	WAT	W 149	28.220	11.179	-23.836	1.00	53.67	W
ATOM	665	CH2	WAT	W 150	27.905	3.222	-7.774	1.00	44.54	W
ATOM	666	CH2	WAT	W 151	15.403	-11.541	32.995	1.00	47.39	W
TER										
END										

【図 8】

Figure 8A



Figure 8B



D-ペプチドなしのシンシウムアッセイ

[100μM] ペプチドありのシンシウムアッセイ

Figure 7A

【図 9】

IQN17/D-ペプチド複合体の芳香族残基の NMR 特性

Figure 9A

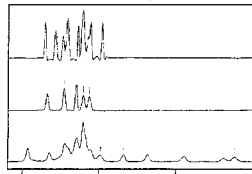


Figure 9B

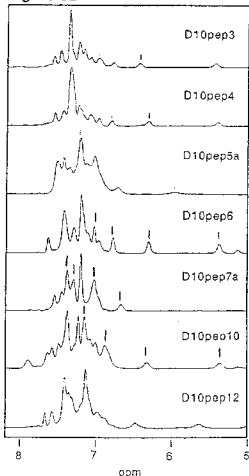
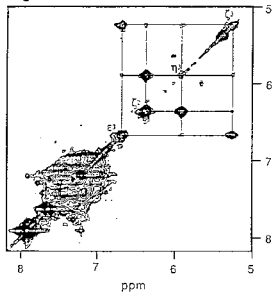
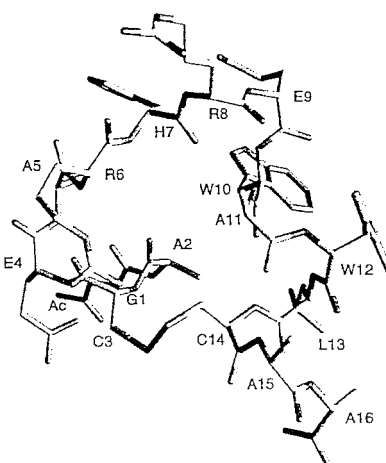


Figure 9C



【図 10】

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



【 図 11 】

CRYST1	57.935	121.959	73.669	90.00	90.00	90.00	C2221	1			
ORIGX1	1.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000					
ORIGY1	0.000000	1.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000					
ORIGZ1	0.000000	0.000000	1.000000	0.000000	0.000000	0.000000					
SCALE1	0.017261	0.000030	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000					
SCALE2	0.000000	0.008199	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000					
SCALE3	0.000000	0.000000	0.013574	0.000000	0.000000	0.000000					
ATOM	1	CA	ACE	A	0	25.799	17.140	37.286	1.00	51.88	A
ATOM	2	C	ACE	A	0	25.799	18.276	36.435	1.00	52.00	A
ATOM	3	C	ACE	A	0	25.500	19.475	36.921	1.00	52.10	A
ATOM	4	N	ARG	A	1	26.134	18.217	35.157	1.00	50.34	A
ATOM	5	CA	ARG	A	1	26.203	19.328	34.217	1.00	50.56	A
ATOM	6	CB	ARG	A	1	27.212	18.993	33.110	1.00	51.87	A
ATOM	7	C	ARG	A	1	27.630	20.135	32.212	1.00	50.78	A
ATOM	8	CD	ARG	A	1	28.500	19.587	31.097	1.00	54.25	A
ATOM	9	NE	ARG	A	1	29.018	20.628	30.217	1.00	55.07	A
ATOM	10	CE	ARG	A	1	29.706	20.377	29.109	1.00	63.90	A
ATOM	11	NH1	ARG	A	1	29.951	19.124	28.766	1.00	64.20	A
ATOM	12	NH2	ARG	A	1	30.157	21.367	28.351	1.00	62.51	A
ATOM	13	C	ARG	A	1	24.823	19.573	32.595	1.00	59.45	A
ATOM	14	C	ARG	A	1	24.453	20.714	33.294	1.00	57.69	A
ATOM	15	N	MET	A	2	24.065	18.494	33.425	1.00	57.40	A
ATOM	16	CA	MET	A	2	22.736	18.573	32.836	1.00	59.95	A
ATOM	17	CB	MET	A	2	22.273	17.198	32.397	1.00	59.85	A
ATOM	18	CG	MET	A	2	21.204	17.251	31.742	1.00	61.56	A
ATOM	19	SD	MET	A	2	20.044	15.905	31.454	1.00	67.77	A
ATOM	20	CE	MET	A	2	19.089	16.438	32.857	1.00	66.61	A
ATOM	21	C	MET	A	2	21.723	19.130	32.834	1.00	61.33	A
ATOM	22	O	MET	A	2	20.543	19.276	33.521	1.00	59.97	A
ATOM	23	N	LYS	A	3	22.200	19.417	35.041	1.00	52.72	A
ATOM	24	CA	LYS	A	3	21.373	19.961	36.167	1.00	63.07	A
ATOM	25	CB	LYS	A	3	21.817	19.361	37.449	1.00	64.25	A
ATOM	26	CG	LYS	A	3	20.982	19.721	38.687	1.00	64.89	A
ATOM	27	CD	LYS	A	3	21.195	21.159	39.160	1.00	64.67	A
ATOM	28	CE	LYS	A	3	20.543	21.405	40.525	1.00	66.66	A
ATOM	29	NH	LYS	A	3	19.077	21.123	40.548	1.00	63.04	A
ATOM	30	C	LYS	A	3	21.599	21.467	36.062	1.00	64.85	A
ATOM	31	O	LYS	A	3	20.635	22.245	36.032	1.00	64.65	A
ATOM	32	N	GLN	A	4	22.869	21.873	36.036	1.00	64.34	A
ATOM	33	CA	GLN	A	4	23.232	23.289	35.952	1.00	63.46	A
ATOM	34	CB	GLN	A	4	24.746	23.447	35.780	1.00	67.71	A
ATOM	35	CG	GLN	A	4	25.552	22.954	36.963	1.00	67.16	A
ATOM	36	CD	GLN	A	4	25.297	23.771	38.213	1.00	75.18	A
ATOM	37	CE	GLN	A	4	25.618	24.962	38.269	1.00	77.70	A
ATOM	38	NH2	GLN	A	4	24.706	25.133	39.225	1.00	76.77	A
ATOM	39	C	GLN	A	4	22.508	25.928	34.758	1.00	64.11	A
ATOM	40	N	GLN	A	4	22.191	25.128	34.776	1.00	62.09	A
ATOM	41	N	LYS	A	3	22.260	25.120	33.726	1.00	59.80	A
ATOM	42	CA	LYS	A	3	21.540	25.587	32.552	1.00	58.23	A
ATOM	43	CB	LYS	A	3	21.567	22.558	31.398	1.00	56.85	A
ATOM	44	CG	LYS	A	3	20.438	22.851	30.416	1.00	53.92	A
ATOM	45	CD	LYS	A	3	22.942	22.862	30.719	1.00	56.47	A
ATOM	46	CE	LYS	A	3	23.079	21.524	29.614	1.00	59.50	A
ATOM	47	C	LYS	A	3	20.083	23.828	32.929	1.00	58.93	A
ATOM	48	O	LYS	A	3	19.575	24.928	32.729	1.00	58.48	A
ATOM	49	N	GLU	A	5	19.424	22.796	33.172	1.00	59.29	A
ATOM	50	CA	GLU	A	5	18.013	22.383	33.377	1.00	56.51	A
ATOM	51	CB	GLU	A	5	17.529	21.217	34.446	1.00	55.52	A

Figure 11A

ATOM	112	CG	GLU	A	13	11.673	29.794	31.895	1.00	46.65	A
ATOM	113	CD	GLU	A	13	11.419	27.372	32.259	1.00	49.90	A
ATOM	114	CE	GLU	A	13	12.051	26.968	33.366	1.00	49.96	A
ATOM	115	OE1	GLU	A	13	10.599	26.668	31.723	1.00	50.11	A
ATOM	116	C	GLU	A	13	11.377	32.163	33.749	1.00	47.83	A
ATOM	117	O	GLU	A	13	10.279	32.731	33.638	1.00	48.72	A
ATOM	118	N	SER	A	14	12.168	32.313	34.786	1.00	48.67	A
ATOM	119	NH	SER	A	14	11.862	33.187	35.907	1.00	46.89	A
ATOM	120	CB	SER	A	14	12.906	32.985	37.014	1.00	45.05	A
ATOM	121	CG	SER	A	14	12.634	33.773	38.160	1.00	49.45	A
ATOM	122	C	SER	A	14	11.885	34.627	35.415	1.00	50.52	A
ATOM	123	O	SER	A	14	10.869	35.313	35.431	1.00	54.15	A
ATOM	124	N	LYS	A	15	13.054	35.067	34.971	1.00	49.77	A
ATOM	125	CA	LYS	A	15	13.248	36.416	34.474	1.00	52.02	A
ATOM	126	CB	LYS	A	15	14.707	36.589	34.042	1.00	54.30	A
ATOM	127	CG	LYS	A	15	15.018	37.931	33.427	1.00	58.79	A
ATOM	128	CD	LYS	A	15	14.841	39.039	34.437	1.00	65.42	A
ATOM	129	CE	LYS	A	15	15.841	38.880	35.576	1.00	65.66	A
ATOM	130	NH	LYS	A	15	15.722	39.983	36.569	1.00	68.14	A
ATOM	131	C	LYS	A	15	13.313	36.758	35.305	1.00	50.99	A
ATOM	132	O	LYS	A	15	12.022	37.926	35.361	1.00	49.62	A
ATOM	133	N	GLN	A	16	11.848	35.740	32.397	1.00	50.06	A
ATOM	134	CA	GLN	A	16	10.965	35.937	31.444	1.00	49.96	A
ATOM	135	CB	GLN	A	16	10.950	34.684	30.570	1.00	49.89	A
ATOM	136	CG	GLN	A	16	10.113	34.810	29.286	1.00	50.59	A
ATOM	137	CD	GLN	A	16	10.287	35.603	28.369	1.00	54.27	A
ATOM	138	CE	GLN	A	16	9.799	35.511	28.667	1.00	56.26	A
ATOM	139	NH2	GLN	A	16	10.985	33.796	27.250	1.00	54.59	A
ATOM	140	C	GLN	A	16	9.551	35.256	31.899	1.00	50.61	A
ATOM	141	O	GLN	A	16	8.788	36.931	31.235	1.00	48.56	A
ATOM	142	N	LYS	A	17	9.198	35.736	33.067	1.00	49.38	A
ATOM	143	CA	LYS	A	17	7.883	35.373	33.623	1.00	49.73	A
ATOM	144	CB	LYS	A	17	7.582	34.982	34.750	1.00	52.97	A
ATOM	145	CG	LYS	A	17	6.250	35.226	35.448	1.00	56.86	A
ATOM	146	CD	LYS	A	17	6.066	34.276	36.618	1.00	59.31	A
ATOM	147	CE	LYS	A	17	4.763	34.552	37.354	1.00	59.95	A
ATOM	148	NH	LYS	A	17	4.592	32.621	38.506	1.00	62.05	A
ATOM	149	C	LYS	A	17	7.927	37.390	34.163	1.00	48.25	A
ATOM	150	O	LYS	A	17	6.977	38.144	34.008	1.00	47.73	A
ATOM	151	N	LYS	A	18	9.043	37.750	34.791	1.00	45.58	A
ATOM	152	CA	LYS	A	18	9.190	39.101	35.309	1.00	45.26	A
ATOM	153	CB	LYS	A	18	10.523	39.270	36.047	1.00	47.34	A
ATOM	154	CG	LYS	A	18	10.627	38.493	37.262	1.00	50.10	A
ATOM	155	CD	LYS	A	18	11.831	38.976	38.168	1.00	52.93	A
ATOM	156	CE	LYS	A	18	11.869	38.358	39.550	1.00	55.07	A
ATOM	157	NH	LYS	A	18	12.931	38.368	40.798	1.00	59.26	A
ATOM	158	C	LYS	A	18	9.107	40.110	34.171	1.00	41.55	A
ATOM	159	O	LYS	A	18	8.585	41.206	34.349	1.00	42.70	A
ATOM	160	N	LYS	A	19	9.623	39.740	33.008	1.00	40.25	A
ATOM	161	CA	LYS	A	19	9.605	40.595	32.831	1.00	39.57	A
ATOM	162	CB	LYS	A	19	10.494	40.015	30.710	1.00	42.08	A
ATOM	163	CG	LYS	A	19	10.123	40.521	29.369	1.00	41.71	A
ATOM	164	CD	LYS	A	19	11.969	40.214	31.074	1.00	42.52	A
ATOM	165	CE	LYS	A	19	12.939	39.656	30.039	1.00	43.25	A
ATOM	166	C	LYS	A	19	8.172	40.725	31.325	1.00	39.27	A
ATOM	167	O	LYS	A	19	7.751	41.790	30.899	1.00	37.81	A
ATOM	168	N	GLU	A	20	7.421	39.597	31.372	1.00	39.00	A
ATOM	169	CA	GLU	A	20	6.036	39.692	30.930	1.00	40.27	A
ATOM	170	CB	GLU	A	20	5.437	38.280	30.834	1.00	41.21	A
ATOM	171	CG	GLU	A	20	5.898	37.474	29.606	1.00	48.10	A

Figure 11C

ATOM	52	CG	GLU	A	6	17.638	20.259	33.490	1.00	56.46	A
ATOM	53	CD	GLU	A	6	17.293	19.009	34.119	1.00	56.33	A
ATOM	54	CE	GLU	A	6	17.702	18.790	33.776	1.00	53.42	A
ATOM	55	OE1	GLU	A	6	16.644	18.157	33.459	1.00	50.03	A
ATOM	56	OE2	GLU	A	6	17.273	19.677	33.820	1.00	56.73	A
ATOM	57	O	GLU	A	6	16.783	24.505	35.137	1.00	52.82	A
ATOM	58	N	ASP	A	7	18.986	24.008	35.572	1.00	55.92	A
ATOM	59	CA	ASP	A	7	19.039	23.336	36.197	1.00	56.65	A
ATOM	60	CB	ASP	A	7	20.451	25.462	36.581	1.00	57.90	A
ATOM	61	OU	ASP	A	7	20.010	24.717	38.762	1.00	57.37	A
ATOM	62	OD1	ASP	A	7	19.180	33.534	38.775	1.00	53.78	A
ATOM	63	OD2	ASP	A	7	20.637	24.862	39.771	1.00	57.66	A
ATOM	64	A	ASP	A	7	19.034	23.745	36.042	1.00	56.30	A
ATOM	65	N	ASP	A	7	19.652	24.652	36.670	1.00	57.43	A
ATOM	66	N	LYS	B	8	18.532	25.945	34.873	1.00	58.99	A
ATOM	67	CA	LYS	B	8	19.642	26.290	34.512	1.00	59.87	A
ATOM	68	CB	LYS	B	8	20.971	28.599	33.521	1.00	52.61	A
ATOM	69	CD	LYS	B	8	22.203	29.773	34.487	1.00	56.85	A
ATOM	70	CE	LYS	B	8	23.498	30.958	35.257	1.00	57.92	A
ATOM	71	CF	LYS	B	8	22.915	30.676	35.293	1.00	71.00	A
ATOM	72	NZ	LYS	B	8	21.593	31.323	35.951	1.00	72.05	A
ATOM	73	C	LYS	B	8	18.467	28.428	32.594	1.00	58.08	A
ATOM	74	O	LYS	B	8	18.145	29.605	32.965	1.00	56.46	A
ATOM	75	CD	ILE	A	9	17.655	27.976	32.947	1.00	56.44	A
ATOM	76	CA	ILE	A	9	16.668	27.436	32.099	1.00	56.69	A
ATOM	77	CB	ILE	A	9	16.325	26.052	31.685	1.00	54.89	A
ATOM	78	CG1	ILE	A	9	14.892	26.067	30.825	1.00	54.20	A
ATOM	79	CG2	ILE	A	9	17.373	27.676	30.423	1.00	54.22	A
ATOM	80	CH	ILE	A	9	14.338	27.777	30.772	1.00	54.98	A
ATOM	81	C	ILE	A	9	15.526	27.876	30.108	1.00	57.98	A
ATOM	82	O	ILE	A	9	14.602	25.872	22.616	1.00	55.85	A
ATOM	83	N	GLU	A	10	15.626	27.458	34.271	1.00	59.96	A
ATOM	84	CA	GLU	A	10	16.788	28.263	35.283	1.00	60.00	A
ATOM	85	CB	GLU	A	10	14.850	26.961	34.540	1.00	63.01	A
ATOM	86	CG	GLU	A	10	13.846	27.117	37.619	1.00	56.89	A
ATOM	87	CD	GLU	A	10	14.387	26.672	36.955	1.00	58.37	A
ATOM	88	CE	GLU	A	10	14.844	25.510	35.954	1.00	57.70	A
ATOM	89	CF	GLU	A	10	15.487	27.487	36.903	1.00	58.99	A
ATOM	90	O	GLU	A	10	14.872	29.243	35.634	1.00	59.41	A
ATOM	91	O	GLU	A	10	13.947	29.958	36.307	1.00	59.95	A
ATOM	92	N	GLU	A	11	16.127	29.623	35.565	1.00	57.16	A
ATOM	93	CA	GLU	A	11	16.524	31.064	35.895	1.00	58.88	A
ATOM	94	CB	GLU	A	11	16.092	31.095	35.010	1.00	58.99	A
ATOM	95	CD	GLU	A	11	18.569	32.775	36.527	1.00	62.73	A
ATOM	96	CE	GLU	A	11	18.459	32.382	38.129	1.00	67.75	A
ATOM	97	OE1	GLU	A	11	19.101	31.561	38.782	1.00	67.91	A
ATOM	98	OE2	GLU	A	11	17.351	33.249	36.68	1.00	68.84	A
ATOM	99	CA	GLU	A	11	16.659	32.976	37.899	1.00	68.91	A
ATOM	100	D	GLU	A	11	15.805	33.160	35.030	1.00	54.78	A
ATOM	101	N	ILE	A	12	15.945	31.443	33.575	1.00	52.61	A
ATOM	102	CA	ILE	A	12	15.510	32.120	32.414	1.00	50.09	A
ATOM	103	CB	ILE	A	12	16.002	31.548	32.805	1.00	50.09	A
ATOM	104	CD	ILE	A	12	15.201	32.073	33.904	1.00	48.54	A
ATOM	105	CE1	ILE	A	12	17.508	31.763	35.930	1.00	50.30	A
ATOM	106	CE2	ILE	A	12	18.114	31.072	29.724	1.00	33.10	A
ATOM	107	O	ILE	A	12	13.998	32.324	32.363	1.00	49.83	A
ATOM	108	N	ILE	A	12	13.776	32.376	32.350	1.00	49.83	A
ATOM	109	N	GLU	A	13	13.306	32.123	32.598	1.00	48.87	A
ATOM	110	N	GLU	A	13	11.849	32.123	32.597	1.00	48.82	A
ATOM	111	CB	GLU	A	13	11.320	28.818	32.954	1.00	45.44	A

ATOM	232	NE	LVS	A	27	-0.384	43.774	25.698	1.00	53.94	A
ATOM	233	C	LVS	A	27	-0.267	49.402	29.344	1.00	28.67	A
ATOM	234	C	LVS	A	27	-0.258	50.252	26.757	1.00	26.05	A
ATOM	235	N	LVS	A	28	-0.852	49.020	30.593	1.00	27.68	A
ATOM	236	CA	LVS	A	28	-1.597	49.609	31.371	1.00	27.30	A
ATOM	237	CB	LVS	A	28	-1.797	48.845	32.691	1.00	24.82	A
ATOM	238	CD	LVS	A	28	-2.961	49.384	33.573	1.00	27.48	A
ATOM	239	CE	LVS	A	28	-4.263	49.506	32.744	1.00	31.59	A
ATOM	240	CF	LVS	A	28	-5.526	49.695	33.606	1.00	30.02	A
ATOM	241	CG	LVS	A	28	-5.440	50.820	34.386	1.00	32.11	A
ATOM	242	CH	LVS	A	28	-1.284	50.076	31.641	1.00	29.57	A
ATOM	243	O	LVS	A	28	-2.164	51.951	31.866	1.00	26.21	A
ATOM	244	H	LEU	A	29	-0.017	51.359	31.923	1.00	29.36	A
ATOM	245	CA	LEU	A	29	0.385	52.723	32.179	1.00	33.70	A
ATOM	246	CB	LEU	A	29	1.822	52.745	32.657	1.00	35.26	A
ATOM	247	CG	LEU	A	29	2.023	53.727	33.587	1.00	38.04	A
ATOM	248	CH	LEU	A	29	3.363	53.485	34.506	1.00	39.85	A
ATOM	249	CD	LEU	A	29	1.891	55.149	33.332	1.00	36.01	A
ATOM	250	CE	LEU	A	29	0.243	55.561	30.905	1.00	34.59	A
ATOM	251	O	LEU	A	29	-0.281	54.692	30.927	1.00	37.16	A
ATOM	252	N	LEU	A	30	0.722	53.020	29.792	1.00	34.03	A
ATOM	253	CA	LEU	A	30	0.616	53.724	28.528	1.00	35.56	A
ATOM	254	CB	LEU	A	30	1.230	52.874	27.414	1.00	36.09	A
ATOM	255	CG	LEU	A	30	1.470	53.508	26.050	1.00	40.19	A
ATOM	256	CH	LEU	A	30	2.270	54.805	26.163	1.00	39.79	A
ATOM	257	CD	LEU	A	30	2.215	52.484	25.198	1.00	45.44	A
ATOM	258	CE	LEU	A	30	-0.882	53.980	28.263	1.00	34.76	A
ATOM	259	C	LEU	A	30	-1.269	55.050	27.794	1.00	32.56	A
ATOM	260	N	GLN	A	31	-1.713	52.596	28.572	1.00	30.55	A
ATOM	261	CA	GLN	A	31	-3.152	53.142	28.464	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	CH	GLN	A	31	-6.045	50.592	29.159	1.00	45.53	A
ATOM	265	CD	GLN	A	31	-5.715	49.940	30.159	1.00	32.75	A
ATOM	266	CE	GLN	A	31	-6.973	50.151	28.310	1.00	46.91	A
ATOM	267	C	GLN	A	31	-3.633	54.303	29.273	1.00	31.34	A
ATOM	268	O	GLN	A	31	-4.419	55.125	28.832	1.00	26.45	A
ATOM	269	H	LEU	A	32	-5.141	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	55.237	32.811	1.00	25.49	A
ATOM	272	CG	LEU	A	32	-3.572	54.158	33.732	1.00	31.78	A
ATOM	273	CH	LEU	A	32	-2.810	54.215	33.075	1.00	31.29	A
ATOM	274	CD	LEU	A	32	-2.810	54.376	33.972	1.00	28.39	A
ATOM	275	C	LEU	A	32	-3.031	56.797	30.860	1.00	32.26	A
ATOM	276	O	LEU	A	32	-3.707	57.810	31.021	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	-1.298	58.019	25.640	1.00	31.33	A
ATOM	279	CB	THR	A	33	-0.158	57.787	25.156	1.00	35.07	A
ATOM	280	CD	THR	A	33	0.949	57.272	30.238	1.00	39.00	A
ATOM	281	CE	THR	A	33	0.776	59.087	28.687	1.00	34.58	A
ATOM	282	C	THR	A	33	-2.129	58.560	28.471	1.00	32.63	A
ATOM	283	O	THR	A	33	-2.237	59.787	28.298	1.00	33.87	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	26.591	1.00	36.90	A
ATOM	286	CB	VAL	A	34	-2.810	56.832	25.622	1.00	36.47	A
ATOM	287	CG	VAL	A	34	-4.895	57.506	24.558	1.00	34.36	A
ATOM	288	CH	VAL	A	34	-2.514	56.354	24.966	1.00	38.97	A
ATOM	289	C	VAL	A	34	-4.803	58.655	27.036	1.00	37.01	A
ATOM	290	O	VAL	A	34	-5.250	59.695	26.540	1.00	35.59	A
ATOM	291	N	TRP	A	35	-5.403	57.952	28.023	1.00	36.34	A

Figure 11E

ATOM	292	CA	TRP	A	35	-6.645	58.429	28.648	1.00	38.95	A
ATOM	293	CB	TRP	A	35	-7.022	57.429	29.742	1.00	44.03	A
ATOM	294	CG	TRP	A	35	-8.302	57.716	30.478	1.00	45.10	A
ATOM	295	CH	TRP	A	35	-8.445	58.535	31.640	1.00	46.19	A
ATOM	296	CD	TRP	A	35	-9.820	58.545	31.873	1.00	47.19	A
ATOM	297	CE	TRP	A	35	-7.556	59.277	32.429	1.00	46.15	A
ATOM	298	CD1	TRP	A	35	-9.549	57.260	30.165	1.00	45.42	A
ATOM	299	NE1	TRP	A	35	-10.468	57.752	31.682	1.00	47.75	A
ATOM	300	CD2	TRP	A	35	-10.317	59.288	33.067	1.00	48.22	A
ATOM	301	CD3	TRP	A	35	-8.049	59.991	33.509	1.00	44.34	A
ATOM	302	CH2	TRP	A	35	-9.415	59.968	33.824	1.00	47.03	A
ATOM	303	C	TRP	A	35	-6.408	59.814	29.259	1.00	40.04	A
ATOM	304	O	TRP	A	35	-7.155	60.759	25.013	1.00	39.15	A
ATOM	305	N	GLY	A	36	-5.352	59.594	30.055	1.00	38.98	A
ATOM	306	CA	GLY	A	36	-5.039	61.211	30.658	1.00	38.44	A
ATOM	307	C	GLY	A	36	-5.034	62.327	29.634	1.00	38.41	A
ATOM	308	O	GLY	A	36	-5.626	63.190	29.845	1.00	40.58	A
ATOM	309	H	ILE	A	37	-4.356	62.094	26.317	1.00	35.01	A
ATOM	310	CA	ILE	A	37	-4.279	63.079	27.451	1.00	40.60	A
ATOM	311	CB	ILE	A	37	-3.395	62.584	26.301	1.00	40.22	A
ATOM	312	CG	ILE	A	37	-3.509	63.527	25.136	1.00	39.97	A
ATOM	313	CH	ILE	A	37	-1.939	62.470	26.767	1.00	41.25	A
ATOM	314	CD	ILE	A	37	-1.036	62.777	25.778	1.00	38.31	A
ATOM	315	C	ILE	A	37	-5.662	63.366	26.886	1.00	42.00	A
ATOM	316	O	ILE	A	37	-6.019	64.516	26.654	1.00	42.52	A
ATOM	317	H	LVS	A	38	-6.418	62.217	26.660	1.00	42.56	A
ATOM	318	CA	LVS	A	38	-7.766	62.505	26.112	1.00	45.16	A
ATOM	319	CB	LVS	A	38	-8.459	61.156	25.825	1.00	46.50	A
ATOM	320	CG	LVS	A	38	-9.683	61.235	25.026	1.00	53.52	A
ATOM	321	CH	LVS	A	38	-10.840	62.017	25.621	1.00	55.55	A
ATOM	322	C	LVS	A	38	-11.822	62.480	24.981	1.00	56.01	A
ATOM	323	CD	LVS	A	38	-11.165	63.504	23.714	1.00	55.27	A
ATOM	324	C	LVS	A	38	-8.594	63.405	27.025	1.00	46.34	A
ATOM	325	O	LVS	A	38	-9.237	64.143	26.561	1.00	48.92	A
ATOM	326	N	GLN	A	39	-8.554	63.120	28.322	1.00	47.92	A
ATOM	327	CA	GLN	A	39	-9.303	63.877	29.318	1.00	49.31	A
ATOM	328	CB	GLN	A	39	-9.142	63.230	30.691	1.00	52.07	A
ATOM	329	CG	GLN	A	39	-9.431	63.742	30.777	1.00	59.01	A
ATOM	330	CH	GLN	A	39	-10.889	63.405	30.523	1.00	61.01	A
ATOM	331	CD	GLN	A	39	-11.742	63.800	31.310	1.00	62.56	A
ATOM	332	CE	GLN	A	39	-11.188	66.677	29.437	1.00	62.00	A
ATOM	333	C	GLN	A	39	-8.840	65.324	29.412	1.00	48.78	A
ATOM	334	O	GLN	A	39	-9.649	66.243	29.431	1.00	48.03	A
ATOM	335	H	GLN	A	40	-7.530	65.522	29.472	1.00	48.67	A
ATOM	336	CA	GLN	A	40	-6.980	66.861	29.590	1.00	50.78	A
ATOM	337	CB	GLN	A	40	-5.479	66.785	29.968	1.00	47.62	A
ATOM	338	CG	GLN	A	40	-4.736	68.118	29.382	1.00	49.99	A
ATOM	339	CH	GLN	A	40	-5.416	69.030	31.311	1.00	51.12	A
ATOM	340	CD	GLN	A	40	-1.300	67.850	30.376	1.00	48.82	A
ATOM	341	C	LEU	A	40	-7.277	67.736	28.363	1.00	53.20	A
ATOM	342	O	LEU	A	40	-7.230	68.964	28.457	1.00	53.67	A
ATOM	343	N	GLN	A	41	-7.433	67.104	27.235	1.00	56.61	A
ATOM	344	CA	GLN	A	41	-7.648	67.850	26.994	1.00	60.81	A
ATOM	345	CB	GLN	A	41	-7.295	66.994	24.781	1.00	60.60	A
ATOM	346	CG	GLN	A	41	-7.257	67.753	23.467	1.00	61.60	A
ATOM	347	CH	GLN	A	41	-6.756	66.885	22.230	1.00	62.14	A
ATOM	348	CD	GLN	A	41	-6.430	66.377	23.367	1.00	56.13	A
ATOM	349	CE	GLN	A	41	-7.598	66.697	21.316	1.00	60.61	A
ATOM	350	C	GLN	A	41	-9.054	68.344	25.915	1.00	61.54	A
ATOM	351	O	GLN	A	41	-9.388	69.277	25.179	1.00	65.13	A

Figure 11F

ATOM	352	N	ALA	A	42	-9.971	67.722	26.679	1.00	67.16	A
ATOM	353	CA	ALA	A	42	-11.362	68.150	26.693	1.00	70.08	A

ATOM	470	OEL	GLU	B	10	27.975	32.751	24.495	1.00	67.38	B
ATOM	471	OEL	GLU	B	10	28.824	33.173	26.485	1.00	66.28	B
ATOM	474	C	GLU	B	10	22.525	33.111	25.757	1.00	65.16	B
ATOM	475	C	GLU	B	10	23.261	34.351	26.141	1.00	65.31	B
ATOM	476	N	GLU	B	11	23.258	32.785	24.524	1.00	66.64	B
ATOM	477	CA	GLU	B	11	22.617	33.627	23.529	1.00	67.59	B
ATOM	478	CB	GLU	B	11	22.348	32.822	22.252	1.00	68.72	B
ATOM	479	CG	GLU	B	11	21.735	33.636	21.117	1.00	72.88	B
ATOM	480	CD	GLU	B	11	21.556	34.864	20.767	1.00	74.80	B
ATOM	481	OEL	GLU	B	11	23.775	34.717	20.526	1.00	75.81	B
ATOM	482	OEL	GLU	B	11	21.978	35.975	20.711	1.00	74.99	B
ATOM	483	C	GLU	B	11	21.307	34.197	24.398	1.00	67.17	B
ATOM	484	N	GLU	B	11	20.995	35.381	23.918	1.00	68.06	B
ATOM	485	N	ILE	B	12	23.541	33.348	24.784	1.00	64.61	B
ATOM	486	CA	ILE	B	12	19.278	33.790	25.389	1.00	61.65	B
ATOM	487	CB	ILE	B	12	18.459	32.600	25.926	1.00	62.84	B
ATOM	488	CG	ILE	B	12	17.424	33.094	26.940	1.00	62.63	B
ATOM	489	CD	ILE	B	12	17.799	31.864	24.750	1.00	62.13	B
ATOM	490	CD1	ILE	B	12	16.910	30.698	25.156	1.00	61.29	B
ATOM	491	C	ILE	B	12	19.553	34.776	26.522	1.00	59.17	B
ATOM	492	O	ILE	B	12	19.010	35.981	26.522	1.00	59.06	B
ATOM	493	N	GLU	B	13	20.198	34.184	27.479	1.00	55.87	B
ATOM	494	CA	GLU	B	13	20.710	35.268	28.600	1.00	54.71	B
ATOM	495	CB	GLU	B	13	21.810	34.669	29.477	1.00	50.19	B
ATOM	496	CG	GLU	B	13	21.447	33.331	30.109	1.00	49.30	B
ATOM	497	CD	GLU	B	13	22.577	32.729	30.933	1.00	49.10	B
ATOM	498	OEL	GLU	B	13	23.741	32.765	30.472	1.00	50.79	B
ATOM	499	OEL	GLU	B	13	23.304	32.194	32.027	1.00	47.00	B
ATOM	500	C	GLU	B	13	22.166	36.612	28.347	1.00	55.57	B
ATOM	501	O	GLU	B	13	20.790	37.967	28.557	1.00	56.33	B
ATOM	502	N	SER	B	14	21.950	36.559	26.977	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	21.488	37.389	25.278	1.00	54.62	B
ATOM	505	CG	SER	B	14	21.968	38.550	24.529	1.00	56.74	B
ATOM	506	CD	SER	B	14	21.666	38.624	25.736	1.00	55.96	B
ATOM	507	O	SER	B	14	21.465	39.854	25.696	1.00	54.91	B
ATOM	508	N	LEU	B	15	20.310	37.979	25.263	1.00	55.94	B
ATOM	509	CA	LEU	B	15	19.208	38.704	24.350	1.00	56.72	B
ATOM	510	CB	LEU	B	15	18.484	37.779	24.693	1.00	55.67	B
ATOM	511	CG	LEU	B	15	17.494	38.484	22.770	1.00	58.33	B
ATOM	512	CD	LEU	B	15	17.000	37.527	21.705	1.00	59.89	B
ATOM	513	CE	LEU	B	15	16.440	36.282	20.518	1.00	60.44	B
ATOM	514	NE	LEU	B	15	16.420	37.373	19.421	1.00	61.67	B
ATOM	515	C	LEU	B	15	18.282	39.207	25.748	1.00	56.31	B
ATOM	516	O	LEU	B	15	17.716	40.296	25.661	1.00	56.85	B
ATOM	517	N	GLN	B	16	18.149	38.403	26.791	1.00	56.76	B
ATOM	518	CA	GLN	B	16	17.293	38.748	27.914	1.00	56.78	B
ATOM	519	CB	GLN	B	16	17.106	37.604	28.823	1.00	56.94	B
ATOM	520	CG	GLN	B	16	16.000	37.194	28.652	1.00	55.90	B
ATOM	521	CD	GLN	B	16	15.908	36.017	30.300	1.00	56.24	B
ATOM	522	OEL	GLN	B	16	16.611	35.702	31.283	1.00	57.78	B
ATOM	523	NE2	GLN	B	16	15.404	35.160	29.760	1.00	55.69	B
ATOM	524	C	GLN	B	16	17.935	40.040	28.528	1.00	58.82	B
ATOM	525	O	GLN	B	16	17.049	40.929	28.905	1.00	59.68	B
ATOM	526	N	LEU	B	17	19.146	40.163	28.921	1.00	59.44	B
ATOM	527	CA	LEU	B	17	18.111	41.379	29.189	1.00	59.34	B
ATOM	528	CB	LEU	B	17	17.238	41.275	29.386	1.00	60.30	B
ATOM	529	CG	LEU	B	17	17.740	42.342	30.356	1.00	64.52	B
ATOM	530	CD	LEU	B	17	22.150	42.325	30.576	1.00	65.00	B
ATOM	531	CE	LEU	B	17	24.008	42.784	29.344	1.00	67.22	B

Figure 111

ATOM	532	NE	LVS	B	17	25.465	42.961	29.625	1.00	67.09	B
ATOM	533	C	LVS	B	17	19.389	42.522	31.210	1.00	59.16	B
ATOM	534	C	LVS	B	17	19.088	43.634	29.656	1.00	55.77	B
ATOM	535	N	LVS	B	18	19.433	42.233	30.931	1.00	58.38	B
ATOM	536	CA	LVS	B	18	19.120	43.248	29.972	1.00	58.35	B
ATOM	537	CB	LVS	B	18	19.247	42.875	24.511	1.00	59.39	B
ATOM	538	CD	LVS	B	18	20.617	42.083	24.130	1.00	61.47	B
ATOM	539	CD1	LVS	B	18	21.768	43.111	24.099	1.00	61.91	B
ATOM	540	CE	LVS	B	18	22.034	43.761	25.461	1.00	63.96	B
ATOM	541	NE	LVS	B	18	23.248	44.620	25.423	1.00	63.66	B
ATOM	542	C	LVS	B	19	17.706	43.761	26.163	1.00	58.07	B
ATOM	543	C	LVS	B	19	17.475	44.969	26.254	1.00	58.82	B
ATOM	544	N	ILE	B	19	16.757	42.825	26.268	1.00	56.85	B
ATOM	545	CA	ILE	B	19	15.358	43.189	26.488	1.00	53.78	B
ATOM	546	CB	ILE	B	19	14.455	41.921	26.488	1.00	53.22	B
ATOM	547	CD	ILE	B	19	13.057	42.286	26.976	1.00	52.56	B
ATOM	548	CD1	ILE	B	19	14.416	41.322	25.081	1.00	52.79	B
ATOM	549	CD1	ILE	B	19	13.542	40.069	24.970	1.00	54.45	B
ATOM	550	C	ILE	B	19	15.117	43.961	27.786	1.00	52.82	B
ATOM	551	C	ILE	B	19	14.327	44.897	27.809	1.00	51.74	B
ATOM	552	N	GLU	B	20	15.781	43.565	28.869	1.00	51.04	B
ATOM	553	CA	GLU	B	20	15.601	44.247	30.128	1.00	50.06	B
ATOM	554	CB	GLU	B	20	16.403	45.622	31.252	1.00	49.90	B
ATOM	555	CG	GLU	B	20	15.969	42.207	31.584	1.00	54.15	B
ATOM	556	CD	GLU	B	20	16.761	41.620	32.736	1.00	55.98	B
ATOM	557	CD1	GLU	B	20	18.010	41.568	32.641	1.00	53.22	B
ATOM	558	OEL	GLU	B	20	16.427	41.255	32.735	1.00	56.20	B
ATOM	559	C	GLU	B	20	16.053	45.706	29.965	1.00	49.26	B
ATOM	560	O	GLU	B	20	15.479	46.621	30.581	1.00	48.88	B
ATOM	561	N	ASN	B	21	17.093	45.932	29.163	1.00	49.15	B
ATOM	562	CA	ASN	B	21	17.596	47.256	28.930	1.00	49.99	B
ATOM	563	CB	ASN	B	21	18.885	47.229	28.098	1.00	51.35	B
ATOM	564	CD	ASN	B	21	20.054	46.576	28.814	1.00	54.79	B
ATOM	565	CD1	ASN	B	21	20.421	46.978	29.943	1.00	55.96	B
ATOM	566	NE2	ASN	B	21	20.656	45.572	28.205	1.00	57.15	B
ATOM	567	C	ASN	B	21	16.537	48.078	28.202	1.00	49.63	B
ATOM	568	O	ASN	B	21	15.249	49.209	28.591	1.00	50.14	B
ATOM	569	N	GLU	B	22	15.957	47.497	27.153	1.00	47.34	B
ATOM	570	CA	GLU	B	22	16.942	48.160	26.354	1.00	44.99	B
ATOM	571	CB	GLU	B	22	14.534	47.372	25.174	1.00	44.99	B
ATOM	572	CG	GLU	B	22	13.703	47.990	24.116	1.00	45.85	B
ATOM	573	CD	GLU	B	22	14.377	49.268	23.621	1.00	54.71	B
ATOM	574	OEL	GLU	B	22	15.543	49.191	23.182	1.00	55.60	B
ATOM	575	OEL	GLU	B	22	13.743	50.330	22.673	1.00	57.01	B
ATOM	576	C	GLU	B	22	13.710	48.921	27.183	1.00	44.17	B
ATOM	577	O	GLU	B	22	13.044	49.527	26.916	1.00	45.50	B
ATOM	578	N	ILE	B	23	13.386	47.693	28.169	1.00	42.28	B
ATOM	579	CA	ILE	B	23	12.241	47.977	29.024	1.00	40.61	B
ATOM	580	CB	ILE	B	23	12.801	46.734	29.809	1.00	38.57	B
ATOM	581	CD	ILE	B	23	10.826	47.096	30.925	1.00	37.31	B
ATOM	582	CD1	ILE	B	23	11.138	45.723	28.850	1.00	38.28	B
ATOM	583	CD1	ILE	B	23	10.634	44.436	29.530	1.00	38.32	B
ATOM	584	C	ILE	B	23	12.626	45.108	29.974	1.00	41.50	B
ATOM	585	O	ILE	B	23	11.752	49.926	30.249	1.00	42.54	B
ATOM	586	N	ALA	B	24	13.858	49.170	30.348	1.00	40.42	B
ATOM	587	CA	ALA	B	24	14.349	50.240	31.224	1.00	38.49	B
ATOM	588	CB	ALA	B	24	15.811	50.059	31.578	1.00	34.26	B
ATOM	589	C	ALA	B	24	14.147	51.552	30.496	1.00	37.75	B
ATOM	590	O	ALA	B	24	11.674	52.528	31.078	1.00	38.39	B
ATOM	591	N	ARG	B	25	14.458	51.592	29.204	1.00	36.47	B

Figure 112

ATOM	592	CA	ARG	B	25	14.354	52.756	28.394	1.00	38.10	B
------	-----	----	-----	---	----	--------	--------	--------	------	-------	---

ATOM	712	CE	GLN	B	39	4.625	69.582	34.167	1.00	33.05	E
ATOM	713	CG	GLN	B	39	5.436	70.614	34.985	1.00	43.49	B
ATOM	714	CD	GLN	B	39	4.822	72.026	35.008	1.00	48.65	B
ATOM	715	OE1	GLN	B	39	4.889	72.774	34.021	1.00	51.46	B
ATOM	716	NE1	GLN	B	39	4.220	73.389	34.243	1.00	47.33	B
ATOM	717	C	GLN	B	39	2.342	70.427	33.863	1.00	31.81	B
ATOM	718	O	GLN	B	39	2.125	71.574	34.206	1.00	31.08	B
ATOM	719	N	LEU	B	40	1.857	69.504	32.703	1.00	31.01	B
ATOM	720	CA	LEU	B	40	1.068	70.673	31.807	1.00	33.43	B
ATOM	721	CB	LEU	B	40	0.872	69.886	31.551	1.00	31.63	B
ATOM	722	CG	LEU	B	40	-0.126	70.405	32.482	1.00	34.65	B
ATOM	723	CD1	LEU	B	40	0.171	71.843	32.092	1.00	35.24	B
ATOM	724	CD2	LEU	B	40	-0.058	69.495	32.285	1.00	35.90	B
ATOM	725	C	LEU	B	40	-0.289	70.943	32.465	1.00	36.85	B
ATOM	726	O	LEU	B	40	-0.874	72.010	32.215	1.00	37.81	B
ATOM	727	N	GLN	B	41	-0.768	69.964	33.218	1.00	36.13	B
ATOM	728	CA	GLN	B	41	-2.046	70.083	33.694	1.00	37.74	B
ATOM	729	CB	GLN	B	41	-1.365	68.738	34.227	1.00	41.21	B
ATOM	730	CG	GLN	B	41	-1.833	68.458	34.735	1.00	47.08	B
ATOM	731	CD	GLN	B	41	-4.070	67.139	35.420	1.00	54.09	B
ATOM	732	OE1	GLN	B	41	-3.517	66.102	35.013	1.00	55.40	B
ATOM	733	NE1	GLN	B	41	-4.908	67.154	36.462	1.00	54.90	B
ATOM	734	C	GLN	B	41	-2.035	71.148	34.974	1.00	39.95	B
ATOM	735	O	GLN	B	41	-2.988	71.925	35.089	1.00	39.23	B
ATOM	736	N	ALA	B	42	-0.972	71.194	35.767	1.00	39.05	B
ATOM	737	CA	ALA	B	42	-0.845	72.188	36.824	1.00	38.56	B
ATOM	738	CB	ALA	B	42	-0.345	72.852	37.757	1.00	34.14	B
ATOM	739	C	ALA	B	42	-0.647	73.566	36.228	1.00	40.18	B
ATOM	740	O	ALA	B	42	-1.139	74.560	36.765	1.00	41.44	B
ATOM	741	N	ARG	B	43	0.078	73.634	35.138	1.00	41.82	B
ATOM	742	CA	ARG	B	43	0.340	74.510	34.476	1.00	43.71	B
ATOM	743	CB	ARG	B	43	1.242	74.723	33.260	1.00	47.26	B
ATOM	744	CG	ARG	B	43	1.703	75.997	32.592	1.00	51.08	B
ATOM	745	CD	ARG	B	43	3.582	75.677	31.401	1.00	54.95	B
ATOM	746	NE	ARG	B	43	3.778	74.947	31.813	1.00	57.04	B
ATOM	747	C	ARG	B	43	4.618	75.499	32.428	1.00	56.95	B
ATOM	748	NH1	ARG	B	43	4.816	76.794	32.703	1.00	55.89	B
ATOM	749	NH2	ARG	B	43	5.858	74.753	32.773	1.00	57.00	B
ATOM	750	C	ARG	B	43	-0.987	75.522	34.048	1.00	42.38	B
ATOM	751	N	LEU	B	44	-1.308	72.657	34.598	1.00	43.41	B
ATOM	752	N	ILE	B	44	-1.756	74.736	33.310	1.00	43.63	B
ATOM	753	CA	ILE	B	44	-3.059	75.143	32.810	1.00	43.24	B
ATOM	754	CB	ILE	B	44	-3.034	74.085	31.866	1.00	44.23	B
ATOM	755	CG1	ILE	B	44	-5.083	74.401	31.952	1.00	45.04	B
ATOM	756	CG2	ILE	B	44	-2.778	73.964	30.600	1.00	47.45	B
ATOM	757	CD1	ILE	B	44	-3.156	72.745	29.759	1.00	49.42	B
ATOM	758	C	ILE	B	44	-4.081	75.306	31.935	1.00	42.37	B
ATOM	759	O	ILE	B	44	-4.422	76.416	34.332	1.00	42.08	B
ATOM	760	N	LEU	B	45	-4.573	74.162	34.598	1.00	42.20	B
ATOM	761	CA	LEU	B	45	-5.564	74.042	32.450	1.00	43.16	B
ATOM	762	CB	LEU	B	45	-6.041	72.592	35.513	1.00	46.08	B
ATOM	763	CG	LEU	B	45	-6.459	72.001	34.182	1.00	47.45	B
ATOM	764	CD	LEU	B	45	-7.013	70.594	34.357	1.00	47.51	B
ATOM	765	OE1	LEU	B	45	-7.504	70.999	33.502	1.00	48.61	B
ATOM	766	C	LEU	B	45	-5.016	74.467	36.810	1.00	42.48	B
ATOM	767	O	LEU	B	45	-5.674	75.060	37.483	1.00	45.35	B
ATOM	768	NH	LEU	B	45	-3.945	73.947	37.206	1.00	45.06	B
ATOM	769	CA	ACE	C	0	15.143	12.385	26.919	1.00	62.48	C
ATOM	770	C	ACE	C	0	14.856	12.476	27.575	1.00	62.44	C
ATOM	771	C	ACE	C	0	13.700	12.858	27.851	1.00	54.06	C

Figure 11M

ATOM	772	N	ARG	C	1	15.890	13.103	28.220	1.00	82.91	C
ATOM	773	CA	ARG	C	1	15.863	14.253	29.073	1.00	83.87	C
ATOM	774	CB	ARG	C	1	16.156	13.970	30.492	1.00	82.74	C
ATOM	775	CG	ARG	C	1	15.769	13.055	31.456	1.00	83.47	C
ATOM	776	CD	ARG	C	1	14.340	13.345	31.156	1.00	82.66	C
ATOM	777	NE	ARG	C	1	13.249	14.748	32.726	1.00	81.00	C
ATOM	778	C	ARG	C	1	13.069	13.434	31.597	1.00	79.16	C
ATOM	779	NH1	ARG	C	1	13.901	12.672	30.885	1.00	79.80	C
ATOM	780	NH2	ARG	C	1	12.010	12.875	32.168	1.00	79.18	C
ATOM	781	C	ARG	C	1	16.450	15.541	28.550	1.00	85.03	C
ATOM	782	O	ARG	C	1	15.875	16.644	29.016	1.00	85.10	C
ATOM	783	N	MET	C	2	17.169	15.394	27.581	1.00	85.40	C
ATOM	784	CA	MET	C	2	17.778	16.568	27.022	1.00	86.92	C
ATOM	785	CB	MET	C	2	19.063	16.215	26.290	1.00	88.20	C
ATOM	786	CG	MET	C	2	19.711	17.420	25.653	1.00	89.72	C
ATOM	787	SD	MET	C	2	21.192	16.937	24.823	1.00	94.98	C
ATOM	788	CE	MET	C	2	20.121	16.349	26.176	1.00	91.53	C
ATOM	789	C	MET	C	2	16.773	17.154	26.036	1.00	87.44	C
ATOM	790	O	MET	C	2	16.699	18.368	25.872	1.00	89.05	C
ATOM	791	N	LYS	C	3	16.001	16.278	25.392	1.00	85.66	C
ATOM	792	CA	LYS	C	3	14.873	16.712	24.444	1.00	83.09	C
ATOM	793	CB	LYS	C	3	14.233	15.551	24.107	1.00	82.30	C
ATOM	794	CG	LYS	C	3	12.821	15.895	23.122	1.00	81.54	C
ATOM	795	CD	LYS	C	3	11.826	14.746	23.005	1.00	81.93	C
ATOM	796	CE	LYS	C	3	10.866	15.022	22.952	1.00	80.79	C
ATOM	797	NZ	LYS	C	3	10.154	16.300	22.124	1.00	82.56	C
ATOM	798	C	LYS	C	3	14.777	17.809	25.128	1.00	82.12	C
ATOM	799	O	LYS	C	3	14.053	18.925	24.617	1.00	81.76	C
ATOM	800	N	GLN	C	4	13.651	17.474	26.302	1.00	80.32	C
ATOM	801	CA	GLN	C	4	12.856	18.401	27.094	1.00	78.87	C
ATOM	802	CB	GLN	C	4	12.504	17.759	28.440	1.00	79.91	C
ATOM	803	CG	GLN	C	4	12.122	16.375	28.356	1.00	80.66	C
ATOM	804	CD	GLN	C	4	11.087	15.971	27.380	1.00	81.02	C
ATOM	805	OE1	GLN	C	4	11.348	16.140	26.082	1.00	79.52	C
ATOM	806	NE2	GLN	C	4	9.907	15.516	27.701	1.00	81.57	C
ATOM	807	C	GLN	C	4	13.667	19.680	27.299	1.00	87.97	C
ATOM	808	O	GLN	C	4	13.186	20.781	27.032	1.00	78.45	C
ATOM	809	N	ILE	C	5	14.902	19.530	27.772	1.00	76.07	C
ATOM	810	CA	ILE	C	5	15.785	20.070	27.974	1.00	73.85	C
ATOM	811	CB	ILE	C	5	17.206	20.220	28.381	1.00	73.07	C
ATOM	812	CG1	ILE	C	5	18.175	21.388	28.264	1.00	71.17	C
ATOM	813	CG2	ILE	C	5	17.174	19.523	29.795	1.00	72.84	C
ATOM	814	CD1	ILE	C	5	18.518	19.113	30.285	1.00	71.35	C
ATOM	815	C	ILE	C	5	15.880	21.422	26.656	1.00	74.14	C
ATOM	816	O	ILE	C	5	15.939	22.651	26.628	1.00	73.70	C
ATOM	817	N	GLU	C	6	15.695	20.664	25.567	1.00	73.86	C
ATOM	818	CA	GLU	C	6	15.972	21.222	24.225	1.00	73.70	C
ATOM	819	CB	GLU	C	6	16.395	20.135	23.129	1.00	72.24	C
ATOM	820	CG	GLU	C	6	17.787	19.535	22.464	1.00	69.96	C
ATOM	821	CD	GLU	C	6	18.922	20.428	22.985	1.00	68.01	C
ATOM	822	OE1	GLU	C	6	19.044	21.575	23.461	1.00	65.93	C
ATOM	823	OE2	GLU	C	6	15.702	19.962	23.125	1.00	68.26	C
ATOM	824	C	GLU	C	6	14.602	21.773	23.842	1.00	74.50	C
ATOM	825	O	GLU	C	6	14.476	22.546	22.890	1.00	75.27	C
ATOM	826	N	ASP	C	7	13.577	21.372	24.587	1.00	74.82	C
ATOM	827	CA	ASP	C	7	13.018	21.838	24.327	1.00	76.17	C
ATOM	828	CB	ASP	C	7	11.195	20.742	24.644	1.00	77.40	C
ATOM	829	CG	ASP	C	7	11.408	19.488	25.818	1.00	76.45	C
ATOM	830	CD1	ASP	C	7	11.518	19.609	22.580	1.00	79.36	C
ATOM	831	CD2	ASP	C	7	11.452	18.380	24.104	1.00	79.10	C

Figure 11N

ATOM	832	C	ASP	C	7	11.906	23.079	25.160	1.00	75.92	C
ATOM	833	N	ASP	C	7	11.379	24.063	24.643	1.00	77.15	C
ATOM	834	CA	LYS	C	8	12.223	23.024	26.455	1.00	74.05	C
ATOM	835	CB	LYS	C	8	11.987	24.157	27.231	1.00	72.09	C
ATOM	836	CG	LYS	C	8	11.647	24.827	28.765	1.00	72.69	C
ATOM	837	CG	LYS	C	8	11.647	24.225	29.901	1.00	72.96	C
ATOM	838	CD	LYS	C	8	10.428	23.312	29.921	1.00	75.00	C
ATOM	839	CE	LYS	C	8	9.587	23.471	31.197	1.00	76.69	C
ATOM	840	NE	LYS	C	8	10.822	23.302	32.067	1.00	76.98	C
ATOM	841	LYS	LYS	C	8	12.727	25.319	26.975	1.00	69.24	C
ATOM	842	N	LYS	C	8	12.295	26.469	26.745	1.00	69.77	C
ATOM	843	C	LYS	C	9	13.855	25.013	26.046	1.00	65.63	C
ATOM	844	CA	LYS	C	9	14.609	26.053	25.362	1.00	64.27	C
ATOM	845	CB	LYS	C	9	15.512	25.512	25.881	1.00	68.88	C
ATOM	846	CD	LYS	C	9	16.585	26.515	23.871	1.00	62.42	C
ATOM	847	CE	LYS	C	9	16.900	25.231	25.976	1.00	64.19	C
ATOM	848	CON	LYS	C	9	18.244	24.656	25.557	1.00	64.32	C
ATOM	849	C	GLU	C	9	13.756	26.605	26.223	1.00	63.69	C
ATOM	850	CA	GLU	C	10	14.717	27.817	26.523	1.00	62.21	C
ATOM	851	N	GLU	C	10	-10.036	25.712	25.243	1.00	62.89	C
ATOM	852	CB	GLU	C	10	12.163	26.052	22.429	1.00	62.21	C
ATOM	853	CB	GLU	C	10	11.419	24.865	21.886	1.00	63.68	C
ATOM	854	CD	GLU	C	10	10.451	25.180	20.751	1.00	62.12	C
ATOM	855	CE	GLU	C	10	9.686	23.367	20.300	1.00	62.29	C
ATOM	856	OE1	GLU	C	10	8.874	24.125	19.318	1.00	67.26	C
ATOM	857	OE2	GLU	C	10	9.894	22.845	20.780	1.00	68.61	C
ATOM	858	C	GLU	C	10	11.142	27.147	22.321	1.00	60.65	C
ATOM	859	CA	GLU	C	10	10.991	28.137	21.647	1.00	58.16	C
ATOM	860	CB	GLU	C	11	11.429	26.898	22.457	1.00	60.42	C
ATOM	861	CA	GLU	C	11	9.415	27.826	24.235	1.00	58.98	C
ATOM	862	CB	GLU	C	11	8.736	27.243	25.683	1.00	59.25	C
ATOM	863	CG	GLU	C	11	9.739	26.588	26.652	1.00	61.78	C
ATOM	864	CD	GLU	C	11	9.376	26.801	28.127	1.00	61.82	C
ATOM	865	CE	GLU	C	11	8.972	27.972	29.628	1.00	64.82	C
ATOM	866	OE1	GLU	C	11	9.184	25.804	28.855	1.00	60.50	C
ATOM	867	C	GLU	C	11	10.021	29.186	24.732	1.00	58.03	C
ATOM	868	N	GLU	C	11	9.519	30.229	24.375	1.00	59.21	C
ATOM	869	N	ILE	C	12	11.515	29.175	30.523	1.00	61.15	C
ATOM	870	CA	ILE	C	12	11.765	30.415	25.902	1.00	56.41	C
ATOM	871	CB	ILE	C	12	13.043	30.139	26.710	1.00	55.29	C
ATOM	872	CG	ILE	C	12	13.791	31.448	26.908	1.00	52.26	C
ATOM	873	OG1	ILE	C	12	12.680	29.404	28.080	1.00	55.56	C
ATOM	874	OG2	ILE	C	12	11.985	29.087	28.589	1.00	55.11	C
ATOM	874	OG1	ILE	C	12	12.133	31.239	24.671	1.00	57.76	C
ATOM	875	CD	ILE	C	12	11.944	32.454	26.459	1.00	59.18	C
ATOM	876	C	ILE	C	13	12.668	30.589	23.642	1.00	60.62	C
ATOM	877	N	GLU	C	13	13.029	31.312	23.423	1.00	62.64	C
ATOM	879	CB	GLU	C	13	13.045	30.404	25.589	1.00	60.88	C
ATOM	880	CD	GLU	C	13	13.319	29.091	25.138	1.00	70.85	C
ATOM	881	CD	GLU	C	13	14.091	28.355	20.041	1.00	73.58	C
ATOM	882	OE1	GLU	C	13	15.320	26.233	20.163	1.00	72.79	C
ATOM	883	OE2	GLU	C	13	13.435	27.837	19.284	1.00	70.95	C
ATOM	884	CD	GLU	C	13	13.748	28.789	23.748	1.00	70.78	C
ATOM	885	C	GLU	C	13	11.808	32.733	20.946	1.00	61.13	C
ATOM	886	N	SER	C	14	10.695	31.010	32.854	1.00	59.71	C
ATOM	887	CA	SER	C	14	9.432	31.350	33.211	1.00	60.53	C
ATOM	888	CB	SER	C	14	8.392	30.248	32.822	1.00	59.68	C
ATOM	889	CG	SER	C	14	8.573	30.573	32.920	1.00	56.34	C
ATOM	890	C	SER	C	14	8.921	32.568	31.790	1.00	61.04	C
ATOM	891	O	SER	C	14	8.793	33.555	31.072	1.00	55.08	C



ATOM	1011	CA	LEU	C	29	4.275	53.138	19.671	1.0C	53.07
ATOM	1013	CA	LEU	C	29	3.025	53.649	20.214	1.0C	53.04
ATOM	1014	CB	LEU	C	29	2.281	52.485	20.855	1.0C	51.13
ATOM	1015	CG	LEU	C	29	0.776	52.493	21.051	1.0C	50.66
ATOM	1016	CD	LEU	C	29	0.052	52.868	19.785	1.0C	51.59
ATOM	1017	CE1	LEU	C	29	6.211	52.102	20.000	1.0C	50.58
ATOM	1018	C	LEU	C	29	3.347	54.739	21.245	1.0C	50.83
ATOM	1019	O	LEU	C	29	3.237	55.805	21.269	1.0C	53.58
ATOM	1020	N	LEU	C	30	4.327	54.457	22.089	1.0C	50.52
ATOM	1021	CA	LEU	C	30	4.767	55.397	22.200	1.0C	48.88
ATOM	1022	CB	LEU	C	30	5.430	54.730	22.000	1.0C	48.88
ATOM	1023	CG	LEU	C	30	6.485	55.530	22.113	1.0C	47.31
ATOM	1024	CD1	LEU	C	30	5.447	56.172	26.033	1.0C	45.24
ATOM	1025	CD2	LEU	C	30	7.398	54.575	25.889	1.0C	48.28
ATOM	1026	CE1	LEU	C	30	5.374	56.587	22.379	1.0C	48.83
ATOM	1027	C	LEU	C	30	6.777	57.736	24.042	1.0C	46.60
ATOM	1028	N	GLN	C	11	6.298	56.289	21.470	1.0C	49.93
ATOM	1029	CA	GLN	C	11	6.983	57.304	20.670	1.0C	52.00
ATOM	1030	CB	GLN	C	11	7.822	56.609	19.590	1.0C	35.56
ATOM	1031	CG	GLN	C	11	6.575	57.551	18.645	1.0C	61.26
ATOM	1032	CD	GLN	C	11	9.768	58.341	18.123	1.0C	50.53
ATOM	1033	CE1	GLN	C	11	10.233	57.818	20.393	1.0C	68.00
ATOM	1034	NEE2	GLN	C	11	10.249	59.318	18.705	1.0C	64.37
ATOM	1035	C	GLN	C	11	8.947	58.225	20.039	1.0C	49.56
ATOM	1036	O	GLN	C	11	5.942	59.412	19.674	1.0C	45.68
ATOM	1037	N	LEU	C	32	4.793	57.657	19.675	1.0C	48.04
ATOM	1038	CA	LEU	C	32	3.723	56.401	19.034	1.0C	48.95
ATOM	1039	CB	LEU	C	32	2.689	57.433	18.461	1.0C	50.72
ATOM	1040	CG	LEU	C	32	1.602	57.895	17.502	1.0C	51.93
ATOM	1041	CD	LEU	C	32	0.589	58.199	16.544	1.0C	50.26
ATOM	1042	CD2	LEU	C	32	0.554	56.840	17.313	1.0C	50.26
ATOM	1043	C	LEU	C	32	3.070	59.295	20.077	1.0C	49.32
ATOM	1044	O	LEU	C	32	3.040	60.519	19.929	1.0C	50.51
ATOM	1045	THR	C	33	2.545	58.859	22.125	1.0C	48.74	
ATOM	1046	CA	THR	C	33	3.599	59.227	21.600	1.0C	48.74
ATOM	1047	CB	THR	C	33	1.643	58.329	22.400	1.0C	46.04
ATOM	1048	CG1	THR	C	33	0.707	57.332	22.977	1.0C	47.18
ATOM	1049	CG2	THR	C	33	1.121	59.039	22.635	1.0C	42.89
ATOM	1050	C	THR	C	33	2.212	60.494	22.771	1.0C	42.89
ATOM	1051	O	THR	C	33	1.132	61.533	21.132	1.0C	42.89
ATOM	1052	N	VAL	C	34	3.992	60.303	22.843	1.0C	38.83
ATOM	1053	CA	VAL	C	34	4.886	61.346	23.321	1.0C	36.90
ATOM	1054	CB	VAL	C	34	6.329	60.825	23.377	1.0C	37.71
ATOM	1055	CG	VAL	C	34	7.811	61.907	22.994	1.0C	39.40
ATOM	1056	CG2	VAL	C	34	9.366	60.959	22.554	1.0C	38.65
ATOM	1057	C	VAL	C	34	4.795	62.437	22.254	1.0C	38.65
ATOM	1058	O	VAL	C	34	4.983	63.595	22.556	1.0C	39.38
ATOM	1059	N	TRP	C	35	5.049	62.038	23.010	1.0C	42.18
ATOM	1060	CA	TRP	C	35	6.237	62.937	23.868	1.0C	40.40
ATOM	1061	CB	TRP	C	35	4.991	62.134	24.000	1.0C	40.66
ATOM	1062	CG	TRP	C	35	4.848	63.020	17.299	1.0C	36.56
ATOM	1063	CD	TRP	C	35	3.696	63.151	16.361	1.0C	36.91
ATOM	1064	CE1	TRP	C	35	3.968	64.212	15.673	1.0C	42.31
ATOM	1065	CE2	TRP	C	35	3.727	62.507	16.953	1.0C	46.00
ATOM	1066	CD1	TRP	C	35	5.748	52.944	26.974	1.0C	40.30
ATOM	1067	HE1	TRP	C	35	5.228	64.673	15.945	1.0C	29.45
ATOM	1068	CD2	TRP	C	35	3.017	64.643	14.704	1.0C	38.75
ATOM	1069	HE2	TRP	C	35	1.538	62.934	15.561	1.0C	39.54
ATOM	1070	C	TRP	C	35	3.984	64.983	15.502	1.0C	42.30
ATOM	1071	C	TRP	C	35	1.764	63.833	18.262	1.0C	42.30

Figure 118

ATOM	1132	NHL	ARG	C	43	-5.127	70.777	13.951	1.30	41.40	C
ATOM	1131	NHL	ARG	C	43	-6.476	72.288	18.421	1.00	44.00	C
ATOM	1130	NHL	ARG	C	43	-0.568	75.347	21.883	1.00	37.96	C
ATOM	1129	O	ARG	C	43	-1.049	76.525	22.558	1.00	36.78	C
ATOM	1136	N	ILE	C	44	-0.434	74.971	13.151	1.00	41.66	C
ATOM	1137	CA	ILE	C	44	-0.006	75.799	19.909	1.00	40.88	C
ATOM	1138	CB	ILE	C	44	-1.403	74.891	25.390	1.00	45.88	C
ATOM	1139	CD	ILE	C	44	-1.802	75.717	26.594	1.00	46.21	C
ATOM	1140	CS	ILE	C	44	-2.572	74.041	24.876	1.00	46.16	C
ATOM	1141	CD	ILE	C	44	-2.926	72.877	25.786	1.00	46.31	C
ATOM	1142	C	ILE	C	44	-0.006	76.802	22.400	1.00	40.49	C
ATOM	1143	C	ILE	C	44	-0.235	77.961	25.047	1.00	40.03	C
ATOM	1144	N	LEU	C	45	1.345	76.250	25.005	1.00	40.33	C
ATOM	1145	CA	LEU	C	45	2.001	77.184	25.579	1.00	39.81	C
ATOM	1146	CB	LEU	C	45	3.357	76.322	26.422	1.00	40.22	C
ATOM	1147	CD	LEU	C	45	3.508	76.508	26.462	1.00	40.80	C
ATOM	1148	CS	LEU	C	45	1.733	74.714	27.364	1.00	42.51	C
ATOM	1149	CD	LEU	C	45	4.029	74.789	28.399	1.00	39.45	C
ATOM	1150	C	LEU	C	45	3.215	77.953	24.540	1.00	38.94	C
ATOM	1151	O	LEU	C	45	3.071	77.689	25.137	1.00	38.85	C
ATOM	1152	CB	LEU	C	45	2.810	76.810	26.137	1.00	39.47	C
ATOM	1153	OH	TIP	W	2	8.280	62.369	23.238	1.00	39.82	C
ATOM	1154	OH	TIP	W	2	28.782	24.001	17.582	1.00	70.47	C
ATOM	1155	OH	TIP	W	4	0.452	62.029	33.896	1.00	50.43	C
ATOM	1156	OH	TIP	W	5	6.620	26.609	33.896	1.00	50.29	C
ATOM	1157	OH	TIP	W	6	1.993	78.695	31.896	1.00	27.25	C
ATOM	1158	OH	TIP	W	7	20.254	18.975	19.495	1.00	49.56	C
ATOM	1159	OH	TIP	W	8	18.592	15.432	15.405	1.00	34.86	C
ATOM	1160	OH	TIP	W	9	-5.907	64.337	32.524	1.00	31.24	C
ATOM	1161	OH	TIP	W	10	11.567	18.853	32.524	1.00	31.84	C
ATOM	1162	OH	TIP	W	11	18.456	23.794	32.524	1.00	46.60	C
ATOM	1163	OH	TIP	W	12	-2.842	65.953	28.078	1.00	59.15	C
ATOM	1164	OH	TIP	W	13	-1.409	77.305	18.855	1.00	37.51	C
ATOM	1165	OH	TIP	W	14	-5.597	64.224	37.408	1.00	39.02	C
ATOM	1166	OH	TIP	W	15	15.900	24.444	37.408	1.00	46.65	C
ATOM	1167	OH	TIP	W	16	12.444	58.431	21.920	1.00	62.97	C
ATOM	1168	OH	TIP	W	17	12.527	70.555	24.520	1.00	61.81	C
ATOM	1169	OH	TIP	W	18	14.897	23.256	34.064	1.00	40.13	C
ATOM	1170	OH	TIP	W	19	3.154	40.721	28.046	1.00	44.89	C
ATOM	1171	OH	TIP	W	20	20.915	24.444	34.064	1.00	44.83	C
ATOM	1172	OH	TIP	W	21	26.490	23.104	32.265	1.00	62.67	C
ATOM	1173	OH	TIP	W	22	13.085	59.262	33.622	1.50	54.53	C
ATOM	1174	OH	TIP	W	23	-0.166	65.626	35.300	1.00	36.86	C
ATOM	1175	OH	TIP	W	24	-0.278	62.692	33.281	1.00	36.86	C
ATOM	1176	OH	TIP	W	25	20.697	22.892	33.281	1.00	100.00	C
ATOM	1177	OH	TIP	W	26	4.281	19.254	26.136	1.00	62.39	C
ATOM	1178	OH	TIP	W	27	22.833	20.949	26.136	1.00	59.57	C
ATOM	1179	OH	TIP	W	28	-10.03C	74.838	23.547	1.00	53.18	C
ATOM	1180	OH	TIP	W	29	1.246	80.456	24.597	1.00	53.18	C
ATOM	1181	OH	TIP	W	30	76.181	26.066	26.066	1.00	80.44	C
ATOM	1182	OH	TIP	W	31	1.424	49.275	18.155	1.00	44.03	C
ATOM	1183	OH	TIP	W	32	6.269	64.921	23.915	1.00	31.68	C
ATOM	1184	OH	TIP	W	33	27.134	18.497	40.798	1.00	60.31	C
ATOM	1185	OH	TIP	W	34	24.226	28.222	40.798	1.00	60.31	C
ATOM	1186	OH	TIP	W	35	24.226	28.222	40.798	1.00	60.31	C
ATOM	1187	OH	TIP	W	36	17.270	23.540	41.621	1.00	45.61	C
ATOM	1188	OH	TIP	W	37	17.175	27.169	41.621	1.00	57.26	C
ATOM	1189	OH	TIP	W	38	17.133	30.354	42.769	1.00	94.65	C
ATOM	1190	OH	TIP	W	39	23.961	39.473	38.187	1.00	86.45	C
ATOM	1191	OH	TIP	W	40	23.961	39.473	38.187	1.00	86.45	C

© 2004 Blackwell Publishing Ltd *Journal of Internal Medicine* 255: 111–117

ATOM	1192	OH2	TIP	W	41	21.799	33.921	57.475	1.00	98.23	W
ATOM	1193	OH2	TIP	W	42	12.396	24.508	37.800	1.00	73.10	W
ATOM	1194	OH2	TIP	W	43	10.910	28.524	40.599	1.00	85.21	W
ATOM	1195	OH2	TIP	W	44	8.726	30.065	38.214	1.00	62.46	W
ATOM	1196	OH2	TIP	W	45	20.748	34.061	54.804	1.00	62.12	W
ATOM	1197	OH2	TIP	W	46	7.462	29.159	29.170	1.00	88.22	W
ATOM	1198	OH2	TIP	W	47	7.466	31.280	33.224	1.00	56.10	W
ATOM	1199	OH2	TIP	W	48	6.666	26.619	36.241	1.00	52.76	W
ATOM	1200	OH2	TIP	W	49	3.823	27.148	35.557	1.00	92.76	W
ATOM	1201	OH2	TIP	W	50	7.608	28.183	32.367	1.00	83.54	W
ATOM	1202	OH2	TIP	W	51	10.064	35.767	38.975	1.00	68.12	W
ATOM	1203	OH2	TIP	W	52	14.645	36.973	38.236	1.00	73.09	W
ATOM	1204	OH2	TIP	W	53	15.799	36.406	39.778	1.00	48.69	W
ATOM	1205	OH2	TIP	W	54	15.456	39.954	39.598	1.00	48.97	W
ATOM	1206	OH2	TIP	W	55	8.442	41.891	37.753	1.00	57.62	W
ATOM	1207	OH2	TIP	W	56	9.926	44.040	39.986	1.00	80.10	W
ATOM	1208	OH2	TIP	W	57	3.713	35.630	32.634	1.00	65.94	W
ATOM	1209	OH2	TIP	W	58	4.004	32.569	30.481	1.00	98.02	W
ATOM	1210	OH2	TIP	W	59	13.514	45.594	36.374	1.00	45.92	W
ATOM	1211	OH2	TIP	W	60	12.274	44.258	32.693	1.00	69.72	W
ATOM	1212	OH2	TIP	W	61	-1.770	41.459	30.285	1.00	86.62	W
ATOM	1213	OH2	TIP	W	62	-0.747	39.619	34.002	1.00	85.57	W
ATOM	1214	OH2	TIP	W	63	2.370	42.056	36.997	1.00	63.26	W
ATOM	1215	OH2	TIP	W	64	7.646	47.813	26.559	1.00	86.77	W
ATOM	1216	OH2	TIP	W	65	-1.942	50.096	25.818	1.00	33.47	W
ATOM	1217	OH2	TIP	W	66	-0.455	48.262	24.057	1.00	48.49	W
ATOM	1218	OH2	TIP	W	67	-1.850	44.976	32.352	1.00	45.89	W
ATOM	1219	OH2	TIP	W	68	-4.779	47.469	30.587	1.00	53.38	W
ATOM	1220	OH2	TIP	W	69	-8.800	47.417	33.155	1.00	55.34	W
ATOM	1221	OH2	TIP	W	70	-7.762	51.374	35.608	1.00	72.46	W
ATOM	1222	OH2	TIP	W	71	5.493	50.367	35.418	1.00	63.97	W
ATOM	1223	OH2	TIP	W	72	-2.293	60.587	33.176	1.00	58.11	W
ATOM	1224	OH2	TIP	W	73	-3.891	59.956	22.839	1.00	42.99	W
ATOM	1225	OH2	TIP	W	74	-2.324	52.365	21.898	1.00	68.11	W
ATOM	1226	OH2	TIP	W	75	-4.610	53.603	23.534	1.00	99.86	W
ATOM	1227	OH2	TIP	W	76	-5.369	51.251	24.806	1.00	66.59	W
ATOM	1228	OH2	TIP	W	77	-9.158	53.927	27.711	1.00	59.38	W
ATOM	1229	OH2	TIP	W	78	-6.839	60.379	22.155	1.00	48.43	W
ATOM	1230	OH2	TIP	W	79	-7.811	55.209	31.635	1.00	63.25	W
ATOM	1231	OH2	TIP	W	80	-8.988	55.740	34.680	1.00	48.03	W
ATOM	1232	OH2	TIP	W	81	-14.258	62.793	31.478	1.00	77.34	W
ATOM	1233	OH2	TIP	W	82	-14.884	67.194	30.254	1.00	100.00	W
ATOM	1234	OH2	TIP	W	83	-13.964	62.903	27.850	1.00	61.59	W
ATOM	1235	OH2	TIP	W	84	-16.467	64.338	27.598	1.00	62.99	W
ATOM	1236	OH2	TIP	W	85	-14.165	71.419	31.235	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	66.527	23.972	1.00	86.65	W
ATOM	1239	OH2	TIP	W	88	23.657	18.784	16.110	1.00	46.11	W
ATOM	1240	OH2	TIP	W	89	21.774	13.448	17.383	1.00	55.52	W
ATOM	1241	OH2	TIP	W	90	28.955	20.801	18.398	1.00	47.29	W
ATOM	1242	OH2	TIP	W	91	19.043	22.428	18.921	1.00	70.31	W
ATOM	1243	OH2	TIP	W	92	32.348	21.742	32.055	1.00	80.85	W
ATOM	1244	OH2	TIP	W	93	31.544	26.386	31.295	1.00	80.53	W
ATOM	1245	OH2	TIP	W	94	30.484	31.504	24.099	1.00	31.19	W
ATOM	1246	OH2	TIP	W	95	28.981	30.522	18.458	1.00	96.45	W
ATOM	1247	OH2	TIP	W	96	25.235	35.680	28.569	1.00	83.47	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	17.008	1.00	87.39	W
ATOM	1250	OH2	TIP	W	99	26.182	40.002	24.987	1.00	62.29	W
ATOM	1251	OH2	TIP	W	100	18.896	37.649	22.145	1.00	75.85	W
ATOM	1252	OH2	TIP	W	101	20.897	31.302	18.294	1.00	88.40	W
ATOM	1253	OH2	TIP	W	102	19.191	42.582	21.453	1.00	55.18	W
ATOM	1254	OH2	TIP	W	103	23.958	41.188	26.907	1.00	78.30	W
ATOM	1255	OH2	TIP	W	104	18.433	46.716	22.932	1.00	54.59	W
ATOM	1256	OH2	TIP	W	105	22.353	48.547	26.943	1.00	59.94	W
ATOM	1257	OH2	TIP	W	106	21.797	41.049	34.496	1.00	78.60	W
ATOM	1258	OH2	TIP	W	107	21.437	46.210	33.535	1.00	75.53	W
ATOM	1259	OH2	TIP	W	108	14.907	41.959	22.380	1.00	54.62	W
ATOM	1260	OH2	TIP	W	109	15.035	42.456	19.119	1.00	58.03	W
ATOM	1261	OH2	TIP	W	110	19.533	44.310	33.666	1.00	80.58	W
ATOM	1262	OH2	TIP	W	111	18.747	50.736	39.399	1.00	60.97	W
ATOM	1263	OH2	TIP	W	112	21.121	52.757	28.680	1.00	55.70	W
ATOM	1264	OH2	TIP	W	113	17.303	52.311	38.123	1.00	72.59	W
ATOM	1265	OH2	TIP	W	114	18.039	56.235	28.845	1.00	79.75	W
ATOM	1266	OH2	TIP	W	115	14.666	59.680	28.364	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	10.136	60.131	37.626	1.00	69.60	W
ATOM	1270	OH2	TIP	W	119	14.125	60.999	36.821	1.00	78.03	W
ATOM	1271	OH2	TIP	W	120	5.987	65.584	27.400	1.00	63.28	W
ATOM	1272	OH2	TIP	W	121	8.899	65.761	30.950	1.00	64.96	W
ATOM	1273	OH2	TIP	W	122	11.921	66.552	33.458	1.00	45.74	W
ATOM	1274	OH2	TIP	W	123	7.712	69.520	31.053	1.00	89.82	W
ATOM	1275	OH2	TIP	W	124	0.300	66.328	28.053	1.00	83.63	W
ATOM	1276	OH2	TIP	W	125	18.739	12.093	36.875	1.00	68.16	W
ATOM	1277	OH2	TIP	W	126	8.341	77.901	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	66.56	W
ATOM	1281	OH2	TIP	W	130	17.028	24.024	19.828	1.00	40.17	W
ATOM	1282	OH2	TIP	W	131	9.682	31.384	16.376	1.00	77.12	W
ATOM	1283	OH2	TIP	W	132	11.568	29.117	15.187	1.00	59.43	W
ATOM	1284	OH2	TIP	W	133	2.602	30.287	27.387	1.00	64.52	W
ATOM	1285	OH2	TIP	W	134	10.743	41.812	16.813	1.00	84.25	W
ATOM	1286	OH2	TIP	W	135	13.070	38.706	12.684	1.00	62.24	W
ATOM	1287	OH2	TIP	W	136	9.362	44.518	14.939	1.00	52.92	W
ATOM	1288	OH2	TIP	W	137	12.139	53.137	17.554	1.00	56.22	W
ATOM	1289	OH2	TIP	W	138	14.403	57.453	15.838	1.00	66.72	W
ATOM	1290	OH2	TIP	W	139	11.017	71.422	23.035	1.00	71.76	W
ATOM	1291	OH2	TIP	W	140	10.451	75.719	24.795	1.00	58.85	W
ATOM	1292	OH2	TIP	W	141	11.223	65.048	21.372	1.00	84.46	W
ATOM	1293	OH2	TIP	W	142	8.196	70.691	21.287	1.00	66.14	W
ATOM	1294	OH2	TIP	W	143	3.381	51.168	17.717	1.00	51.91	W
ATOM	1295	OH2	TIP	W	144	12.725	48.059	19.225	1.00	75.18	W
ATOM	1296	OH2	TIP	W	145	2.524	42.027	17.393	1.00	80.66	W
ATOM	1297	OH2	TIP	W	146	2.024	39.150	18.549	1.00	74.07	W
ATOM	1298	OH2	TIP	W	147	0.486	42.584	19.991	1.00	97.41	W
ATOM	1299	OH2	TIP	W	148	0.060	40.945	24.577	1.00	78.10	W
ATOM	1300	OH2	TIP	W	149	24.261	36.624	16.034	1.00	71.76	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	53.850	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	I	1	13.184	36.734	27.563	1.00	62.34	I

Figure 11V

Figure 11U

## 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partment 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, パスキン 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., D B名)

C07K 5/00-9/00  
C07K 14/16  
C12N 15/09  
C07K 19/00  
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
UniProt