【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第３部門第２区分
【発行日】平成25年8月1日(2013.8.1)

【公表番号】特表2012-530720(P2012-530720A)
【公表日】平成24年12月6日(2012.12.6)
【年通号数】公開・登録公報2012-051
【出願番号】特願2012-516346(P2012-516346)
【国際特許分類】
Ｃ０７Ｋ　14/155　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　39/21　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　39/39　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　31/12　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　31/18　(2006.01)
Ｃ０７Ｋ　16/08　(2006.01)
Ｃ１２Ｐ　21/08　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ０７Ｋ　14/155　ＺＮＡ
Ａ６１Ｋ　39/21
Ａ６１Ｋ　39/39
Ａ６１Ｐ　31/12
Ａ６１Ｐ　31/18
Ｃ０７Ｋ　16/08
Ｃ１２Ｐ　21/08

【手続補正書】
【提出日】平成25年6月13日(2013.6.13)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＭＰＥＲドメインの３～２２のアミノ酸を含有してなる、構造的に拘束されたペプチド。
【請求項２】
ＭＰＥＲドメインの３～２２のアミノ酸が、
（ｉ）炭化水素架橋、アミノ酸突然変異、及び非天然アミノ酸の取り込みからなる群より選択される少なくとも１つの修飾を含有している、又は
（ｉｉ）少なくとも３つの連続したアミノ酸、螺旋の単一面上の少なくとも２つのアミノ酸若しくは少なくとも２つの相互作用面アミノ酸、又はこれらの同類置換を含有しており、任意で、少なくとも３つの相互作用面アミノ酸又はその同類置換を含有しており、ペプチドは配列番号１及びその相同体からなる群から選ばれた配列に由来し、相互作用面アミノ酸はＴｒｐ－６７２、Ｐｈｅ－６７３、Ａｓｎ－６７４、Ｉｌｅ－６７５、Ｔｈｒ－６７６、Ｌｅｕ－６７９、Ｗ－６８０よりなる群のアミノ酸と対応する位置から選ばれる、請求項１に記載の構造的に拘束されたペプチド。
【請求項３】
（ｉ）螺旋の単一面が、１つ、２つ、３つ、又は４つの隣接するアミノ酸のスタックドカラム又はこれらの相同体を含有して、ここで、アミノ酸のスタックドカラムが、位置ａ～

ｇを連続して且つ一連に割当てられたアミノ酸を２回転当り７個有するα螺旋において、位置ａ、ｄ及びｇ、位置ｂ及びｅ又は位置ｃ及びｆで定義され、及び、位置ａ～ｆを連続して且つ一連に割当てられたアミノ酸を２回転当り２つ有する3_{10}螺旋において、位置ａ及びｄ、位置ｂ及びｅ又は位置ｃ及びｆで定義されている、又は
（ｉｉ）螺旋がα螺旋であって、ペプチドの単一面が、配列番号１０～２３、２６～４０、４５～４８、５８～６３、７１～７４に記載の配列、配列番号４９～５７に記載の配列の１～２５のアミノ酸配列、配列番号６４～７０に記載の配列の１～２５のアミノ酸配列及び配列番号７６～１２８、１３５～１４０に記載の配列、又はこれらの相同体の、位置１、４、５、８、１１、１２、１５、１８、１９、２２、２５、２６、２９、３２、及び３３、位置２、５、６、９、１２、１３、１６、１９、２０、２３、２６、２７、３０、３３、及び３４、位置３、６、７、１０、１３、１４、１７、２０、２１、２４、２７、２８、３１、及び３４、位置４、７、８、１１、１４、１５、１８、２１、２２、２５、２８、２９、３２、及び３５、位置５、８、９、１２、１５、１６、１９、２２、２３、２６、２９、３０、及び３３、位置６、９、１０、１３、１６、１７、２０、２３、２４、２７、３０、３１、及び３４、又は、位置７、１０、１１、１４、１７、１８、２１、２４、２５、２８、３１、３２、及び３５で定義される、
請求項２に記載の構造的に拘束されたペプチド。
【請求項４】
（ｉ）ペプチドが、
位置１７及び２０の間に炭化水素架橋を、そして随意に位置３と７の間に炭化水素架橋を含有している配列番号１３７に記載の配列（ＥＬＤＫＷＡＳＬＷＮＷＦＮＩＴＮＷＬＷＹＩＫ）の少なくとも１０～２２のアミノ酸、及び
配列番号１７～２３に記載の配列の３７～５７のアミノ酸配列、配列番号５０～５７、６４～７０に記載の配列の１９～３６のアミノ酸配列、及び、配列番号２４～２５、４１～４３、７５～１２８、１３５～１４０に記載の配列よりなる群から選ばれるアミノ酸配列の、少なくと３つの連続したアミノ酸、螺旋の単一面上の少なくとも２つのアミノ酸又は少なくとも２つの相互作用面アミノ酸との間に炭化水素架橋を含有している、配列番号４５に記載の配列
よりなる群から選ばれるペプチド又はそれらの相同体を含有してなり、
任意で、アミノ酸のスタックドカラムが配列番号１に記載の配列上の位置に対応する位置によって定義され、ここでアミノ酸のスタックドカラムは、
Ｇｌｕ－６６２、Ｌｙｓ－６６５、Ｔｒｐ－６６６、Ｌｅｕ－６６９及びＴｒｐ－６７２、
Ｌｅｕ－６６３、Ｔｒｐ－６６６、Ａｌａ－６６７及びＴｒｐ－６７０、
Ａｓｐ－６６４、Ａｌａ－６６７、Ｓｅｒ－６６８及びＡｓｎ－６７１、
Ｌｙｓ－６６５、Ｓｅｒ－６６８、Ｌｅｕ－６６９、及びＴｒｐ－６７２、
Ｔｒｐ－６６６、Ｌｅｕ－６６９及びＴｒｐ－６７０、
Ａｌａ－６６７、Ｔｒｐ－６７０及びＡｓｎ－６７１、
Ｓｅｒ－６６８、Ａｓｎ－６７１及びＴｒｐ－６７２、
Ｉｌｅ－６７５、Ｔｒｐ－６７８及びＴｙｒ－６８１、
Ａｓｎ－６７６、Ｌｅｕ－６７９及びＩｌｅ－６８２、
Ｔｈｒ－６７７、Ｔｒｐ－６８０及びＬｙｓ－６８３、
Ｉｌｅ－６７５、Ｔｒｐ－６７８、Ｔｒｐ－６７９及びＩｌｅ－６８２、
Ｔｈｒ－６７６、Ｌｅｕ－６７９、Ｔｒｐ－６８０及びＬｙｓ－６８３、
Ａｓｎ－６７７、Ｔｒｐ－６８０及びＴｙｒ－６８１、
Ｔｒｐ－６７８、Ｔｙｒ－６８１及びＩｌｅ－６８２、並びに
Ｌｅｕ－６７９、Ｉｌｅ－６８２及びＬｙｓ－６８３、
よりなる群より選ばれるアミノ酸の群又はこれらの相同体を含有し、
又は
（ｉｉ）ペプチドが更に、ＨＲ－２ペプチドの少なくとも３つの連続したアミノ酸、ＨＲ

－２ペプチドの螺旋の単一面上の少なくとも２つのアミノ酸若しくはＨＲ－２ペプチドの少なくとも２つの相互作用面アミノ酸、又はこれらの同類置換を含有し、
任意でＨＲ－２ペプチドの螺旋の単一面が、１つ、２つ、３つ又は４つの隣接するアミノ酸のスタックドカラム又はその相同体を含有して、ここでアミノ酸のスタックドカラムはα螺旋内の位置ａ、ｄ、及びｇ、位置ｂ及びｅ又は位置ｃ及びｆによって定義され、ここで位置ａは螺旋中のアミノ酸であり、そしてアミノ酸はα螺旋内でａからｇの文字を連続して且つ一連に割り当てられる、
請求項１～３の何れか一項に記載の構造的に拘束されたペプチド。
【請求項５】
（ｉ）ＨＲ－２ペプチドの相互作用面アミノ酸が、配列番号１に記載の配列の位置Ｔｈｒ－６２７、Ｔｒｐ－６２８、Ｔｒｐ－６３１、Ａｓｐ－６３２、Ａｒｇ－６３３、Ｉｌｅ－６３５、Ｔｙｒ－６３８、Ｉｌｅ－６４２、Ｌｅｕ－６４５、Ｉｌｅ－６４６、Ｓｅｒ－６４９、Ｇｌｎ－６５０、Ｇｌｎ－６５２、Ｇｌｎ－６５３、Ｇｌｕ－６５４、Ｌｙｓ－６５５、Ａｓｎ－６５６、Ｇｌｕ－６５７、Ｇｌｕ－６５９、Ｌｅｕ－６６０、Ｇｌｕ－６６２、及びＬｅｕ－６６３に対応するアミノ酸よりなる群から選ばれる、
（ｉｉ）ＨＲ－２ペプチドの相互作用面アミノ酸が、配列番号１に記載の配列の位置Ｔｒｐ－６２８、Ｔｒｐ－６３１、Ｉｌｅ－６３５、Ｔｙｒ－６３８、Ｉｌｅ－６４２、Ｌｅｕ－６４５、Ｓｅｒ－６４９、Ｇｌｎ－６５２、Ａｓｎ－６５６、Ｇｌｕ－６５９、及びＬｅｕ－６６３に対応するアミノ酸よりなる群から選ばれる、又は
（ｉｉｉ）ペプチド又はその相同体が、配列番号１０～２３、２６～４０、４５～４８、５８～６３、７１～７４に記載の配列、配列番号４９～５７に記載の配列の１～２５のアミノ酸配列、配列番号６４～７０に記載の配列の１～２５のアミノ酸配列及び配列番号７６～１２８、１３５～１４０に記載の配列よりなる群から選ばれるアミノ酸配列の、少なくとも３つの連続したアミノ酸、螺旋の単一面の少なくとも２つのアミノ酸又は少なくとも２つの相互作用面アミノ酸を含有しているペプチドのカルボキシ末端に直接又は間接的に操作可能に結合しており、配列番号１７～２３に記載の配列の３７～５７のアミノ酸配列、配列番号５０～５７、６４～７０に記載の配列の１９～３６のアミノ酸配列及び配列番号２４～２５、４１～４３、７５～８９に記載のアミノ酸配列よりなる群から選ばれるアミノ酸配列の、少なくと３つの連続したアミノ酸、螺旋の単一面上の少なくとも２つのアミノ酸又は少なくとも２つの相互作用面アミノ酸を含有してなるペプチドである、
請求項４に記載の構造的に拘束されたペプチド。
【請求項６】
ＨＲ－２配列の３～３８のアミノ酸を含有してなり、ここでペプチドがＨＲ－２ペプチドの少なくとも３つの連続したアミノ酸、ＨＲ－２ペプチドの螺旋の単一面上の少なくとも２つのアミノ酸若しくはＨＲ－２ペプチドの少なくとも２つの相互作用面アミノ酸、又はその同類置換を含有してなる、構造的に拘束されたペプチド。
【請求項７】
請求項１～６の何れか１項に記載の構造的に拘束されたペプチドを含有する、任意で組成物中の構造的に拘束されたペプチドが担体タンパク質と機能的に結合している、医薬組成物。
【請求項８】
請求項１～６の何れか一項に記載の構造的に拘束されたペプチドの何れかと特異的に結合する抗体。
【請求項９】
請求項１～６の何れか一項に記載の構造的に拘束されたペプチド又は請求項７に記載の医薬組成物を、免疫応答を促進するのに有効な用量で対象（ヒトを除く）に投与することを含有してなる、抗体を製造する方法。
【請求項１０】
請求項１～６の何れか一項に記載の構造的に拘束されたペプチド、請求項７に記載の医薬組成物又は請求項８に記載の抗体を含有してなる、ウィルス感染の予防、改善又は治療

のための医薬組成物。
【請求項１１】
ウィルス感染がＨＩＶ感染を含有してなる、請求項１０に記載の医薬組成物。
【請求項１２】
医薬組成物が、ウィルス融合又はウィルス感染性を阻害又は抑制する、請求項１０又は１１に記載の医薬組成物。
【請求項１３】
炭化水素架橋がＲ３－Ｓ６対合、Ｒ６－Ｓ３対合、Ｒ３－Ｓ５対合及びＲ５－Ｓ３対合よりなる群から選ばれる対合を含有してなる、請求項７に記載の医薬組成物。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１２】
本発明が提供する構造的に拘束されたペプチドは、ＭＰＥＲに隣接して自然に生じるｇｐ１６０（例えば、配列番号１）由来の他の配列、或いは配列番号１の別の部分に由来する配列、その他のタンパク質、又は合成配列の何れかである、追加のアミノ酸配列を包含できる。追加のアミノ酸配列は構造的に拘束されていてもいなくてもよい。ある特定の実施態様では、ＨＲ２配列に操作可能に結合する構造的に拘束されたＭＰＥＲ配列を提供する。本発明のある特定の実施態様では、ＨＲ－２ペプチドをＭＰＥＲ配列に結合せずに単独で用いることができる。例えば、ＭＰＥＲ配列のＮ末端を、例えば図２Ｃ、７Ｂ、及び９に示したように、ＨＲ－２配列のＣ末端に操作可能に結合することができる。本発明は、ＨＲ－２ペプチドの少なくとも３個の連続アミノ酸、又はＨＲ－２ペプチドの螺旋の単一面上の少なくとも２個のアミノ酸、又はＨＲ－２ペプチドの少なくとも２個の相互作用面アミノ酸、又はこれらの同一置換を有している、ＨＲ－２配列のＭＰＥＲ配列との同時使用を提供する。ＨＲ－２ペプチドの螺旋の単一面は、アミノ酸の隣接スタックドカラムを１、２、３、又は４つ（ここでアミノ酸のスタックドカラムはアルファ螺旋内の位置ａ、ｄ、及びｇ；位置ｂ及びｅ；又は位置ｃ及びｆ（ここで位置ａはその螺旋内のアミノ酸であって、このアミノ酸はアルファ螺旋内でｇまでの文字を逐次連続的に割り当てられている）によって定義付けられる）；又はそれらの相同体を包含する。例えば、ペプチドのアルファ螺旋及びアミノ酸のスタックドカラムは、配列番号１０～２３、配列番号２６～４０、配列番号４５～４８、配列番号５８～６３、配列番号７１～７４の位置１、４、５、８、１１、１２、１５、１８、１９、２２、２５、２６、２９、３２、及び３３；又は位置２、５、６、９、１２、１３、１６、１９、２０、２３、２６、２７、３０、３３、及び３４；又は位置３、６、７、１０、１３、１４、１７、２０、２１、２４、２７、２８、３１、及び３４；又は位置４、７、８、１１、１４、１５、１８、２１、２２、２５、２８、２９、３２、及び３５；又は位置５、８、９、１２、１５、１６、１９、２２、２３、２６、２９、３０、及び３３；又は位置６、９、１０、１３、１６、１７、２０、２３、２４、２７、３０、３１、及び３４；又は７、１０、１１、１４、１７、１８、２１、２４、２５、２８、３１、３２、及び３５、及び配列番号４９～５７のアミノ酸１～２５、配列番号６４～７０のアミノ酸１～２５；配列番号７６～１２８及び１３５～１４０の配列又はそれらの相同体として定義される。本明細書に提供されているような、アルファ螺旋構造を有するペプチドの単一面はアミノ酸の隣接スタックドカラムを１、２、３、又は４つ包含することができる。
【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００２４
【補正方法】変更
【補正の内容】

【００２４】
【図１】図１Ａ～Ｆは、以下のＨＲ２及びＭＰＥＲ（配列番号１のアミノ酸６２６～６８３）ドメインのアミノ酸配列を有するｇｐ４１グリコタンパク質のドメインの概略図（Ａ）を示す。ＭＰＥＲドメイン配列に下線を引いて；そして指定するアミノ酸のＲ基で示すＨＲ２（配列番号１のアミノ酸６２６～６６１）（Ｂ）及びＭＰＥＲドメイン（配列番号１のアミノ酸６６２～６８３）（Ｃ）のリボン図である。（Ｄ）宿主細胞を感染すると、示されたｇｐ４１サブユニットはすぐに消えて部分的に隠される構造配置の連続体を採る。（Ｅ）天然ＭＰＥＲ構造の４Ｅ１０及び２Ｆ５抗体認識について示したように、免疫原への露出及び中和免疫応答を最大化する目的で、中和可能な構造を補強して、その分解を抑えるために炭化水素架橋を適用して、（Ｆ）ＨＲ１及びＨＲ２ドメインの相互作用を妨害して融合を阻害するペプチド又はそれに由来する抗体を提供した。
【図２】図２は、異なったＨＩＶ株由来の、（Ａ）ＨＩＶ－１　ｇｐ４１　ＨＲ－１（配列番号３～９）、（Ｂ）ＨＩＶ－１　ｇｐ４１　ＨＲ－２（配列番号１０～１６）、及び（Ｃ）ＨＩＶ－１　ｇｐ４１　ＨＲ２－ＭＰＥＲ（配列番号１７～２３）ドメイン、並びにＨＩＶ－１ＫＲ５０８６ウィルス（配列番号２４）及びＳＡＲＳウィルス（配列番号２５）における相同領域の１つの例のアミノ酸配列を示す。ダッシュ（－）は適切な配置を挿入するためのスペースでアミノ酸を示していない。
【図３】図３Ａ～Ｂは、（Ａ）ＨＩＶ６螺旋バンドル及び螺旋Ｎ３６及びＣ３４の主要な螺旋内相互作用を示す。Ｎ３６の１つと２つのＣ３４の螺旋は明確化のために表示省略している。螺旋輪はａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、命名に基づいた螺旋間の主要接触をさらに説明している。（Ｂ）ＲＳＶ、インフルエンザ、ＳＡＲＳ、及びエボラ由来のＲＨ類縁ドメインによって形成された融合性バンドル。６螺旋融合性バンドルは多数の種にわたって高度に保持されている。
【図４】図４Ａ及びＢは、（Ａ）切断型ＳＡＨ－ｇｐ４１化合物（配列番号２６）、（Ｂ）ＳＡＨ－ｇｐ４１（６２６～６４５）（Ａ）（配列番号２７）の例示的な合成デザインを示す。Ｘ＝Ｓ５アミノ酸、Ｂ＝ノルロイシン。
【図５】図５は、ＨＩＶ　ｇｐ４１（配列番号２８のアミノ酸６２６～６６２）及び関連する適切なアミノ酸残基に適用した７個アミノ酸繰り返しドメインモチーフを説明している。ＨＲ１相互作用を保存するのに必要な特定アミノ酸残基を表すＨＩＶ－１　ＨＲ２ドメイン内の配列鋳型の例を（Ｃ、配列番号２９）及び（Ｄ、配列番号３０）に提供する。
【図６】図６は、本発明を実行する実施態様を説明するワークフローを示す。
【図７】図７Ａ及びＢは、ＨＲ２及びＭＰＥＲドメインを有する、図示的に表されているリボン図（Ａ）、ＢＮＡｂエピトープ、及びドメインのアミノ酸配列に基づいて、ｇｐ４１ＨＲ２及びＭＰＥＲ領域（配列番号１のアミノ酸６２６～６８３）の構造的に拘束されたペプチドの例示的なデザインを示す。（Ｂ）に示されているように、ペプチド断片ａ～ｊ（それぞれ、配列番号３１～４０）を含有しているＨＲ２架橋は何れも、３つの架橋されたＭＰＥＲペプチド断片（配列番号４１～４３）の何れかと結合することができる。＊は炭化水素架橋の位置を示す。ＳＡＳ－ｇｐ４１ペプチドは、例えば、４Ｅ１０エピトープのＣ末端螺旋部分を安定化するためにデザインされた３種の核架橋強化（Ａ：ｉ、ｉ＋３；、Ｂ：ｉ、ｉ＋４；、Ｃ：ｉ、ｉ＋７）のうちの１つから、構築される。ＭＰＥＲのＮ末端部分を架橋せずに（２Ｆ５エピトープが延長した構造を採ることができる）或いは位置１（ｉ、ｉ＋４）、２（ｉ、ｉ＋４）又は３（ｉ、ｉ＋７）内に１つ又はそれ以上の架橋を行って、４Ｅ１０エピトープのＮ末端螺旋部分を安定化する。ねじれ（kink）を強化するために、周辺のＦ６７３、Ｎ６７１Ｐ、又はＤ６７４Ｐ突然変異を行って天然の又は非天然のアミノ酸を組み込む。位置Ｆ６７３の突然変異は、領域内の他の突然変異と連動して又はそれとは独立して、行って、何れかの天然の又は非天然のアミノ酸、例えば、図１１Ａに示されているようなフェニルアラニン類縁体を組み込む。ＨＲ２螺旋を含有して構築物を延長することの影響を検討するために、示した二重架橋ＨＲ２ペプチド（ａ～ｊ）のような、一重又は多重架橋したＨＲ２ドメインを付加する。ＨＲ２－ＭＰＥＲ構築物については、随意的なＱ５６８Ｐ突然変異を、ＭＰＥＲの直前でＨＲ２螺旋を終結する

ようにデザインした。示した構築物の小区分を含有しているＨＲ２－ＭＰＥＲの欠失構築物も想定される（例えば、ＭＰＥＲと組み合わせてＨＲ２のＣ末端部分）。

【図８】図８Ａ～Ｄは、位置（Ａ）２つのＳ５アミノ酸を用いる螺旋の１回転を隔てたｉ、及びｉ＋４；（Ｂ）１個のＳ８及び１個のＲ５アミノ酸、又は１個のＲ８及び１個のＳ５アミノ酸を用いる螺旋の２回転を隔てたｉ、及びｉ＋７；（Ｃ）２個のｉ、ｉ＋４、２個のｉ、ｉ＋７、又は１個のｉ、ｉ＋４及び１個のｉ、ｉ＋７架橋を使用する二重架橋；及び（Ｄ）ｉ、ｉ＋４、ｉ、ｉ＋７、又はその他の架橋（例えば、ｉ、ｉ＋３）の何れかの組み合わせを用いる三重架橋、に形成されるα螺旋を安定化するための螺旋安定化架橋の例示的な組み合わせを示す。

【図９】図９Ａ～Ｂは、ｉ、ｉ＋３架橋ペプチドを容易に産生するために最適化された新規な非天然アミノ酸の架橋を製造するための反応スキームを示す。

【図１０】図１０Ａ～Ｃは、（Ａ）ＳＡＨ－ｇｐ４１（配列番号４４～４５、４９）の配列、一重架橋ペプチド（例えば、Ｎ末端：Ａｃ、ＦＩＴＣ－βＡｌａ、ビオチン－βＡｌａ；Ｃ末端：ＣＯＮＨ$_2$、ＣＯＯＨ）の配列（配列番号４６～４８及び５０～５７）、（Ｂ）二重及び三重架橋ＳＡＨｇｐ４１ペプチド（例えば、Ｎ末端：Ａｃ、ＦＩＴＣ－βＡｌａ、ビオチン－βＡｌａ；Ｃ末端：ＣＯＮＨ$_2$、ＣＯＯＨ）を包含する多種架橋ＨＩＶ ＨＲドメインを示す。Ｘ＝Ｓ５アミノ酸、Ｂ＝ノルロイシン（配列番号５８～７４）。

【図１１】図１１は、ｇｐ４１のＭＰＥＲ領域（配列番号１のアミノ酸６６２～６８３）の３つの構造成分、アミノ酸６６２～６７２由来のα－螺旋、アミノ酸のＲ基を示すアミノ酸６７２～６７５由来の「ねじれ」、及びアミノ酸６７５～６８３由来の3_{10}－螺旋の概略図を示す。3_{10}－螺旋は、１０原子を含有しているＨ－結合ループを形成している、１回転あたり３．０残基があるα－螺旋の形態である。例えば、「標準」α－螺旋も、この命名法を用いて３．6_{13}螺旋と呼ばれる。

【図１２】図１２は、架橋「Ｓ５」アミノ酸を（Ａ、配列番号７５～８２）（ｉ、ｉ＋４）位、（Ｂ，配列番号８３～８９）（ｉ、ｉ＋３）位、及び（Ｃ、配列番号９０～９７）（ｉ、ｉ＋４）及び（ｉ、ｉ＋３）両方の位置に挿入するｇｐ４１のＭＰＥＲドメインのα－及び3_{10}－螺旋の例示的な架橋位置を示す。図１２Ｄは、Ｒ３及びＳ６架橋非天然アミノ酸を含んでいる（ｉ、ｉ＋３）架橋の使用を含む、異なった長さ及び架橋組成のＳＡＨ－ＭＰＥＲにおける例示的な架橋位置を示す（配列番号９８～１０５）。

【図１３】図１３Ａ～Ｄは、（Ａ）は市販されている構造的に拘束されたフェニルアラニン類縁体の例を示し；（Ｂ）はＰｈｅ類縁体のうちの１つを用いた、ＭＰＥＲねじれ領域の結合配座及びねじれ領域の模擬の拘束された構造を示し；（Ｃ）はＦ６７３が一連のフェニルアラニン類縁体（配列番号１０６～１２８）で置換されている、配列番号１のアミノ酸６６２～６８３から成る合成ペプチドを示し；（Ｄ）は４Ｅ１０抗体競合結合ＥＬＩＳＡアッセイの結果を示し、これは組み込まれた非天然アミノ酸によるねじれを含んでいるＭＰＥＲ構築物が、天然のペプチドに匹敵する、高親和性４Ｅ１０結合を保持していることを示している。

【図１４】図１４Ａ～Ｂは、炭化水素架橋されたｇｐ４１ＨＲ２ペプチドが円偏光二色性分光法によって、対応する非修飾ペプチドと比較して、増大したα－螺旋構造を示すことを示している。（Ａ）非架橋ペプチド、エンフビルチド（配列番号４９）及び架橋ペプチド、順に、配列番号５０、５２、６５、及び６４。（Ｂ）非架橋ペプチド、Ｔ６４９ｖ（配列番号４５）及び架橋ペプチド、順に、配列番号４７、７６、５８、及び５９。

【図１５】図１５Ａ～Ｅは、ＨＩＶウィルス株を用いる感染性アッセイにおける、エンフビルチド及び本発明の構造的に拘束されたペプチドの活性を示す。（Ａ）ＨＸＢｃ２；非架橋ペプチド、エンフビルチド（配列番号４９）及び架橋ペプチド、順に、配列番号５１、５２、６５、及び６６。（Ｂ）ＡＤＡ；非架橋ペプチド、エンフビルチド（配列番号４９）及び架橋ペプチド、順に、配列番号５０、５２、６５、及び６４。（Ｃ）ＨＸＢｃ２ｐ ３．２；非架橋ペプチド、エンフビルチド（配列番号４９）及び架橋ペプチド、順に、配列番号５０、５２、６５、及び６４。（Ｄ）対照Ａ－ＭＬＶウィルス株；非架橋ペプチド、エンフビルチド（配列番号４９）及び架橋ペプチド、順に、配列番号５０、５２、

６５、及び６４。結果を（Ｅ）の表に要約した。
【図１６】図１６Ａ～Ｉは、エンフビルチド感受性株ＨＸＢｃ２（Ａ）及びエンフビルチド耐性及び中和耐性株ＹＵ２（Ｂ）をアッセイで用いる、ＨＩＶ－１感染性を阻害する本発明の構造的に拘束されたペプチドの活性を示す。ＨＩＶ－１阻害に対する拘束されたペプチドの特異性を、非ＨＩＶ－１ウィルス対照株Ａ－ＭＬＶの感染性をそれらが阻害できないことによって例示した（Ｃ）。図Ｄ～Ｇは、二重架橋ペプチドがエンフビルチド結合を阻害する二重変異ＨＲ１ドメインと結合でき（Ｃ～Ｅ）、そしてエンフビルチド耐性二重変異ＨＸＢｃ２ウィルス株に打ち勝ってＨＩＶ－１感染性を阻害する（Ｆ、Ｇ）ことを天然ＰＡＧＥ分析で明らかにしている。このような突然変異はＨＩＶ－１に感染しているヒトに起きてエンフビルチド耐性を引き起こす。用いたペプチド、配列番号４９（エンフビルチド）、４５（Ｔ６４９ｖ）、４７（Ａ）、４６（Ｆ）、及び５８（ａ、Ｆ）。図１６Ｈ～Ｉは、本発明の構造的に拘束されたペプチドが、対照のウィルスＡ－ＭＬＶが対応する架橋ペプチドによる処置で全く影響を受けない時に、ＨＩＶ－１感染性を特異的に阻害することを立証している。
【図１７】図１７は、（Ａ～Ｂ）天然のアミノ酸置換、螺旋性促進アラニン残基、及び／又は（ｉ、ｉ＋４）塩架橋を含有している、報告されている一連の次世代ｇｐ４１ＨＲ２ペプチド（配列番号４９、４５、及び１２９～１３４）（Dwyer et al, PNAS, 2007; He et al JBC, 2008）がキモトリプシンへ暴露すると急速なタンパク質分解を示すこと；（Ｃ）一重架橋ＳＡＨ－ｇｐ４１（６２６～６６２）ペプチド（配列番号４５、４７、４６、及び５８）が非修飾ペプチドと比較して６～８倍長い半減期を示して、二重架橋は２４倍増大したキモトリプシン耐性をもたらしたこと；（Ｄ）一重架橋ＳＡＨ－ｇｐ４１（６３８～６７３）誘導体（配列番号４９、５０、５２、及び６５）は、ＳＡＨ－ｇｐ４１（６２６～６６２）ペプチドと同様に、テンプレートペプチドと比較して増大したキモトリプシン耐性を有していて、二重架橋ペプチドは明らかにタンパク分解に対してより耐性であったこと；（Ｅ）ＳＡＨ－ｇｐ４１（６２６～６６２）（Ａ、Ｆ）（配列番号５８）及びＴ６４９ｖ（配列番号４５）を１０ｍｇ／ｋｇでマウスに静脈内投与して無傷のペプチドの血漿濃度を示した時点で測定する薬物動態分析が、Ｔ６４９ｖと比較してＳＡＨ－ｇｐ４１（６２６～６６２）（Ａ，Ｆ）の顕著なインビボ安定性を明らかにしたこと；（Ｆ）ＳＡＨ－ｇｐ４１（６２６～６６２）（Ａ，Ｆ）がｐＨ７よりｐＨ２で、両条件でＴ６４９ｖを越えて、より大きなα－螺旋性を示したことを円偏光二色性分析が明らかにしたこと；（Ｇ）ＳＡＨ－ｇｐ４１（６２６～６６２）（Ａ，Ｆ）及びＴ６４９ｖをｐＨ２でペプシンに暴露して明らかにされた、ＳＡＨ－ｇｐ４１（６２６～６６２）（Ａ，Ｆ）の著しい酸プロテアーゼ耐性；（Ｈ）ＳＡＨ－ｇｐ４１（６２６～６６２）（Ａ，Ｆ）を経口投与して経口吸収に変換したＳＡＨ－ｇｐ４１（６２６～６６２）（Ａ，Ｆ）の酸プロテアーゼ耐性が、測定可能で用量応答性の血漿濃度をもたらしたが、Ｔ６４９ｖは検出不可能であったことを示す。血漿濃度、平均値＋標準誤差；ＮＤ、検出不能。
【図１８】図１８は、（Ａ）担体タンパク質のような、担体と比べて、免疫付与して異なった抗原提示方向をもたらす構造的に拘束されたｇｐ４１ペプチドについての例示的な代替的結合部位、及び（Ｂ～Ｄ）免疫学的応答を最大化するために脂質認識モチーフをＳＡＨ－ＭＰＥＲペプチドに導入する３つの例示的なアプローチ（S. M. Alam et al., Proc Natl Acad Sci USA 106, 20234 (2009); J. P. Julien et al., J Virol 84, 4136 (2010); E. M. Scherer, et al, Proc Natl Acad Sci USA 107, 1529 (2010)）を示し、これらは（Ｂ）ＭＰＥＲペプチドのＣ末端へのミリストイル化リジン及びその他のリポペプチド複合体の組み込み（D. S. Watson, F. C. Szoka, Vaccine 27, 4672 (2009); H. Y. Xu et al., J Virol 84, 1076 (2010)）、（Ｃ）炭化水素架橋自体を疎水性且つ脂質部分として拡張［例えば、（Ｓ）－２－（４’－ペンテニル）アラニン及び（Ｒ）－２－（４’－オクテニル）アラニンを用いて、１１－炭素鎖（ｉ，ｉ＋７）を挿入及び誘導体化する］、及び（Ｄ）脂質－ＮＴＡ－Ｎｉ含有リポソームに結合するために、ＳＡＨ－ＭＰＥＲ構築物のＣ末端にヘキサ－ヒスチジンモチーフを組み込んでＭＰＥＲで被覆したリポソーム[15]の作出（K. J. Oh et al., J Biol Chem 281, 36999 (2006); L. D. Walensky et al

., Mol Cell 24, 199 (2006)）を包含している。
【図１９】図１９は、（ｉ、ｉ＋３）、（ｉ、ｉ＋４）及び二重（ｉ、ｉ＋３）、（ｉ、ｉ＋４）架橋を有する「Ｓ５」－架橋ＳＡＨ－ＭＰＥＲペプチドを用いる、４Ｅ１０抗体競合結合ＥＬＩＳＡアッセイの結果を示す。　図１９は、免疫原性試験の結果を示す。ＳＡＨ－ＨＲ２（Ａ、Ｆ）及びそれに対応する非修飾ペプチドをＫＬＨに結合するために拡大し、次いで（Ａ）に示されているスケジュールに従う時限追加免疫を用いてウサギ免疫付与プロトコルに展開した後、対応する抗原に対して誘導した抗血清のＥＬＩＳＡ分析（Ｂ）及び交差抗原分析（Ｃ）を行った。結果は、ペプチドモチーフを天然の三次元形態に固定する構造化された抗原はより強い抗体応答を生じないばかりか、この構造的安定化なしに、得られた抗血清は螺旋性ｇｐ４１ドメインを認識することが実質的に不可能であった。
【図２０】図２０は、蛍光偏光で測定した、４Ｅ１０抗体のＦＩＴＣ－ＭＰＥＲ野生型ペプチドへの結合を示す；この４Ｅ１０／ＦＩＴＣ－ＭＰＥＲ複合体は、ＳＡＨ－ＭＰＥＲペプチドの競合結合活性を試験するために用いる４Ｅ１０抗体競合結合ＥＬＩＳＡ分析の基準を形成した。
【図２１】図２１Ａ～Ｂは、「Ｓ５］置換、一重架橋（ｉ、ｉ＋４）又は（ｉ、ｉ＋３）ペプチド（配列番号１３５、１３６、７８、及び１３７）、及び二重架橋（ｉ、ｉ＋４）、（ｉ、ｉ＋３）、（配列番号７８、７７、８５、９２、９３、及び１３７）の、野生型Ａｃ－ＭＰＥＲペプチドを凌いでいる、４Ｅ１０抗体結合に対する野生型ＦＩＴＣ－ＭＰＥＲペプチドと効果的に競合する能力を示す。
【図２２】図２２は、Ｒ３－Ｓ５及びＲ３－Ｓ６（ｉ、ｉ＋３）架橋を含んでいる短縮ＳＡＨ－ＭＰＥＲペプチド（配列番号１３７～１４０）の、４Ｅ１０抗体結合に対する野生型Ａｃ－ＭＰＥＲペプチドより効果的に競合する能力を示す。
【図２３】図２３Ａ～Ｂは、（Ａ）ｉ、ｉ＋４架橋を含んでいる典型的な炭化水素架橋ＲＳＶ ＨＲ２ドメインペプチド（配列番号１４１～１４６）及び（Ｂ）ＦＩＴＣ－ＳＡＨ－ＲＳＶペプチド及び組み替えＲＳＶ５－螺旋バンドルを用いた蛍光偏光結合分析の結果を示す。
【図２４】図２４は、配列番号１及び配列番号２を示す。