(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2025-510591
(P2025-510591A)
(43)公表日　令和7年4月15日(2025.4.15)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）	
C07K	*14/00*	*(2006.01)*	C07K	14/00	ZNA	4B065	
C12N	*15/11*	*(2006.01)*	C12N	15/11	Z	4C076	
C12N	*5/00*	*(2006.01)*	C12N	5/00		4C084	
A61K	*47/64*	*(2017.01)*	A61K	47/64		4C086	
A61P	*43/00*	*(2006.01)*	A61P	43/00	111	4H045	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全83頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-553833(P2024-553833)
(86)(22)出願日　令和5年3月10日(2023.3.10)
(85)翻訳文提出日　令和6年11月8日(2024.11.8)
(86)国際出願番号　PCT/EP2023/056243
(87)国際公開番号　WO2023/170302
(87)国際公開日　令和5年9月14日(2023.9.14)
(31)優先権主張番号　2203399.7
(32)優先日　令和4年3月11日(2022.3.11)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

(71)出願人　514007092
ザ ユニバーシティ オブ バース
イギリス ＢＡ２ ７ＡＹ バース アンド ノース イースト サマセット バース クラバートン ダウン
(74)代理人　100118902
弁理士　山本 修
(74)代理人　100106208
弁理士　宮前 徹
(74)代理人　100196508
弁理士　松尾 淳一
(74)代理人　100187540
弁理士　國枝 由紀子
(72)発明者　メイソン，ジョディ・マイケル
イギリス国 ＢＡ２ ７ＡＹ サマセット
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチド

(57)【要約】
ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストが記載される。これらのｃ－Ｊｕｎアンタゴニストを含む組成物、ならびに治療方法を含む方法およびｃ－Ｊｕｎアンタゴニストの治療使用も記載される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＬＶ［Ｘ$_1$］ＥＥ［Ｘ$_2$］［Ｘ$_3$］ＬＥ［Ｘ$_4$］Ｅ（配列番号１）のアミノ酸配列を有する伸長したヒンジ領域；および
伸長したヒンジ領域のＣ末端のロイシンジッパー（ＬＺ）領域、
［ここで、
Ｘ$_1$は、Ｖ、Ｄ、Ｋ、ＣおよびＲから選択され、
Ｘ$_2$は、Ｄ、Ｋ、ＣおよびＲから選択され、
Ｘ$_3$は、Ｖ、Ｄ、Ｃ、ＫおよびＲから選択され、ならびに
Ｘ$_4$は、Ｅ、Ｄ、Ｃ、ＫおよびＲから選択される］
を含むｃ－Ｊｕｎアンタゴニスト。
【請求項２】
伸長したヒンジ領域が、ＥＡ［Ｘ$_5$］［Ｘ$_6$］のアミノ酸配列（配列番号２）、
［ここで、
Ｘ$_5$は、Ｅ、ＫまたはＣから選択され、および
Ｘ$_6$は、ＥまたはＤから選択される］
を有するＮ末端酸性鎖をさらに含む、請求項１に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニスト。
【請求項３】
酸性鎖が、ＥＡＥＥのアミノ酸配列（配列番号３）を有する、請求項２に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニスト。
【請求項４】
Ｘ$_1$が、Ｖであり、および／またはＸ$_3$が、Ｖである、前記請求項のいずれか一項に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニスト。
【請求項５】
（ｉ）Ｘ$_1$は、Ｖであり、Ｘ$_2$は、Ｄであり、Ｘ$_3$はＶであり、およびＸ$_4$はＥである；
（ｉｉ）Ｘ$_1$は、Ｖであり、Ｘ$_2$は、Ｋであり、Ｘ$_3$はＶであり、およびＸ$_4$はＤである；または
（ｉｉｉ）Ｘ$_1$は、Ｖであり、Ｘ$_2$は、Ｃであり、Ｘ$_3$はＶであり、およびＸ$_4$はＣである、
前記請求項のいずれか一項に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニスト。
【請求項６】
ＬＺ領域が、ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＫＤＬＱＤＱ（配列番号７）、または１、２、３、４または５アミノ酸改変を含むこのバリアントのアミノ酸配列を含む、前記請求項のいずれか一項に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニスト。
【請求項７】
（ｉ）ＬＺ領域が、ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＫＤＬＱＤＱ（配列番号７）、または１、２、もしくは３アミノ酸改変を含むこのバリアントのアミノ酸配列を含み、
場合により、バリアントの配列番号７の１６位および２０位に相当する位置のアミノ酸残基が、それぞれＫおよびＤアミノ酸残基であり；または
（ｉｉ）ＬＺ領域が、ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＣＤＬＱＣＱ（配列番号２７）、または１、２、もしくは３アミノ酸改変を含むこのバリアントのアミノ酸配列を含み、
場合により、バリアントの配列番号２７の１６位（ヘプタドのｂ位）および２０位（ヘプタドのｆ位）に相当する位置のアミノ酸残基が、両方ともＣアミノ酸残基である、
請求項６に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニスト。
【請求項８】
ＬＺ領域が、ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲ［Ｘ$_7$］Ｅ［Ｘ$_8$］Ｋ［Ｘ$_9$］Ｌ［Ｘ$_{10}$］Ｄ［Ｘ$_{11}$］（配列番号２９）またはＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲ［Ｘ$_7$］Ｅ［Ｘ$_8$］Ｃ［Ｘ$_9$］Ｌ［Ｘ$_{10}$］Ｃ［Ｘ$_{11}$］（配列番号３０）のアミノ酸配列を含み、
｛ここで、

［Ｘ７］は、Ｋ、Ｌ、Ｓ、Ｗ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｍ、Ｔ、Ｖ、Ａ、Ｅ、またはＧであり；
［Ｘ８］は、Ｉ、Ｖ、またはＬであり；
［Ｘ９］および［Ｘ１０］は、任意のアミノ酸残基であり、
［Ｘ１１］は、Ｑ、Ｅ、またはＫである｝、
請求項１から５のいずれか一項に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニスト。
【請求項９】
ＬＺ領域が、
ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＳＥＩＣＳＬＱＣＱ（配列番号６６）；または
ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＣＥＬＳＣＱ（配列番号６７）；または
ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＡＥＩＣＮＬＳＣＱ（配列番号６８）；または
ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＴＥＩＣＳＬＭＣＫ（配列番号６９）；または
ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＡＥＩＣＳＬＱＣＱ（配列番号７０）、
または１、２もしくは３アミノ酸改変を含むこれらのバリアントからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項８に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニスト。
【請求項１０】
アンタゴニストが、
（ｉ）ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＫＤＬＱＤＱ（配列番号１０）、または、１、２もしくは３アミノ酸改変を含むこれらのバリアントであって、場合により、バリアントの配列番号１０の３１位および３５位に相当する位置のアミノ酸残基が、それぞれＫおよびＤアミノ酸残基である、バリアント；
（ｉｉ）ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＫＶＬＥＤＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＫＤＬＱＤＱ（配列番号１１）、または、１、２もしくは３アミノ酸改変を含むこのバリアントであって、場合により、バリアントの配列番号１１の１０位および１４位に相当する位置のアミノ酸残基が、それぞれＫおよびＤアミノ酸残基であり、バリアントの配列番号１１の３１位および３５位に相当する位置のアミノ酸残基が、それぞれＫおよびＤアミノ酸残基である、バリアント；
（ｉｉｉ）ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＣＤＬＱＣＱ（配列番号２８）、または、１、２もしくは３アミノ酸改変を含むこのバリアントであって、場合により、バリアントの配列番号２８の３１位および３５位に相当する位置のアミノ酸残基が、両方ともＣアミノ酸残基である、バリアント；
（ｉｖ）ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＳＥＩＣＳＬＱＣＱ（配列番号３７）、または、１、２もしくは３アミノ酸改変を含むこのバリアントであって、場合により、バリアントの配列番号２８の３１位および３５位に相当する位置のアミノ酸残基が、両方ともＣアミノ酸残基である、バリアント；または
（ｖ）ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＡＥＩＣＮＬＳＣＱ（配列番号３９）、または、１、２もしくは３アミノ酸改変を含むこのバリアントであって、場合により、バリアントの配列番号２８の３１位および３５位に相当する位置のアミノ酸残基が、両方ともＣアミノ酸残基である、バリアント
のアミノ酸配列を有する、前記請求項のいずれか一項に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニスト。
【請求項１１】
アンタゴニストが、３０アミノ酸と７０アミノ酸の間、３０アミノ酸と６０アミノ酸の間、３０アミノ酸と５０アミノ酸の間、または３０アミノ酸と４０アミノ酸の間の長さを有する、前記請求項のいずれか一項に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニスト。
【請求項１２】
ｃ－ＪｕｎのＤＮＡ結合活性を阻害するＨｉｎｇｅＷ（配列番号４８）の能力の１０倍以内に、ｃ－ＪｕｎのＤＮＡ結合活性を阻害することができる、前記請求項のいずれか一項に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニスト。
【請求項１３】
少なくとも１つのアミノ酸残基架橋剤を含む、前記請求項のいずれか一項に記載のｃ－

Ｊｕｎアンタゴニスト。
【請求項１４】
少なくとも１つの共有結合性のｉからｉ＋４またはｉからｉ＋７へのアミノ酸残基架橋剤を含む、前記請求項のいずれか一項に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニスト。
【請求項１５】
少なくとも１つの共有結合性のｉからｉ＋４へのアミノ酸残基架橋剤を含み、場合により、ペプチドが２つの共有結合性のｉからｉ＋４へのアミノ酸残基架橋剤を含む、請求項１４に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニスト。
【請求項１６】
共有結合性のｉからｉ＋４へのアミノ酸架橋剤（複数可）が、ヘプタドのｂ位からｆ位またはｆ位からｃ位に存在する、請求項１４または請求項１５に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニスト。
【請求項１７】
共有結合性のｉからｉ＋４へのアミノ酸残基架橋剤（複数可）が、Ｋ－Ｄラクタム架橋（複数可）またはＣ残基の対（複数可）の間に形成されたアルキル架橋結合（複数可）である、請求項１４から１６のいずれか一項に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニスト。
【請求項１８】
２つのＣ残基の間に形成されたアルキル架橋結合が１，３　ジブロモメチルベンゼン（ＤＢＭＢ）によって形成される、請求項１３から１７のいずれか一項に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニスト。
【請求項１９】
前記請求項のいずれか一項に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニストをコードする核酸。
【請求項２０】
脂質、ポリマー、または第２のペプチドにコンジュゲートされた、請求項１から１８のいずれか一項に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニストを含むコンジュゲートであって、場合により、第２のペプチドが細胞透過性ペプチドである、コンジュゲート。
【請求項２１】
薬学的に許容される賦形剤または担体と組み合わせた、請求項１～１８のいずれか一項に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニスト、または請求項１９に記載の核酸、または請求項２０に記載のコンジュゲートを含む医薬組成物。
【請求項２２】
医薬としての使用のための請求項１から１８のいずれか一項に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニスト、請求項１９に記載の核酸、請求項２０に記載のコンジュゲート、または請求項２１に記載の医薬組成物。
【請求項２３】
がん、糖尿病、心血管疾患、自己免疫疾患、関節障害、および神経変性疾患からなる群から選択される疾患を処置する方法での使用のための、請求項１から１８のいずれか一項に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニスト、請求項１９に記載の核酸、請求項２０に記載のコンジュゲート、または請求項２１に記載の医薬組成物。
【請求項２４】
請求項１から１８のいずれか一項に記載のペプチド、請求項１９に記載の核酸、または請求項２０に記載のコンジュゲートを、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで、ｃ－Ｊｕｎを含むかまたは発現する細胞へと投与するステップを含む、ｃ－Ｊｕｎを阻害する方法。
【請求項２５】
がん、糖尿病、心血管疾患、自己免疫疾患、関節障害、および神経変性疾患からなる群から選択される疾患を処置する医薬の製造のための、請求項１から１８のいずれか一項に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニスト、請求項１９に記載の核酸、請求項２０に記載のコンジュゲート、または請求項２１に記載の医薬組成物の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】

【０００１】
本出願は、その内容および要素が全ての目的のために参照により本明細書に組み込まれる、２０２２年３月１１日に出願された英国特許第２２０３３９９．７号の優先権を主張する。
【０００２】
本発明は、ｃ－Ｊｕｎをアンタゴナイズするペプチド、ｃ－Ｊｕｎをアンタゴナイズするペプチドをコードする核酸、ｃ－Ｊｕｎをアンタゴナイズするペプチドを含む医薬調製物、およびｃ－Ｊｕｎ媒介性疾患の処置におけるアンタゴニストペプチドの使用に関する。
【背景技術】
【０００３】
転写因子（ＴＦ）は、細胞機能および運命の決定に重要な役割を果たす。広範な上流のシグナルがＴＦへと収束し、特定のＤＮＡ部位認識を介して、生細胞シグナル伝達プロセスを転写アウトプットへと変換する。結果として、ヒトゲノムのおよそ１６００個のＴＦのうち、３００より多くが疾患表現型と関連する。ＴＦの機能不全は、がん、糖尿病、および心血管疾患を含む、広範な有害転帰をもたらす（Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，２０１３；Ｌａｍｂｅｒｔ ｅｔ ａｌ．，２０１８）。選択的ＴＦアンタゴニズムは、したがって、これらの疾患の処置のための有力な治療経路である。
【０００４】
ｃ－Ｊｕｎは、広範なヒト疾患に関連する転写因子である（Ｅｆｅｒｌ ｅｔ ａｌ．，２００３；Ｙｕｎｇ ｅｔ ａｌ．，２０１０；Ｓｈｉｏｚａｗａ ｅｔ ａｌ．，２００９）。ｃ－Ｊｕｎは、二量体転写因子の活性化タンパク質－１（ＡＰ－１）ファミリーのメンバーである。ＡＰ－１タンパク質は、二量体化を促進するロイシンジッパー（ＬＺ）およびＤＮＡ配列認識を促進するＤＮＡ結合ドメイン（ＤＢＤ）からなる、それらの塩基性ロイシンジッパー（ｂＺＩＰ）ドメインを介してＤＮＡ認識エレメントに結合する（Ｇｌｏｖｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９５；Ｒｉｓｓｅ ｅｔ ａｌ．，１９８９）。ｃ－Ｊｕｎは、１２－Ｏ－テトラデカノイルホルボール－１３－酢酸応答エレメント（ＴＲＥ）に結合し、分化、増殖、および生存などの細胞プロセスに直接影響する（Ｓｈａｕｌｉａｎ ｅｔ ａｌ．，２００１；Ｅｆｅｒｌ ｅｔ ａｌ．，２００３；Ｅｃｋｅｒｔ ｅｔ ａｌ．，２０１３；Ａｌａｎｉ ｅｔ ａｌ．，１９９１）。したがって、これらの機能の制御不全は、がん細胞挙動の特徴を促進し、ｃ－Ｊｕｎをがん治療の焦点にする。
【０００５】
ＴＦ機能は、それらの広い表面に多くの接触点を形成するタンパク質－タンパク質相互作用（ＰＰＩ）およびタンパク質－ＤＮＡ相互作用による。小分子（ＳＭ）は、典型的には、扱いやすいポケットの欠損により、これらの型の相互作用を廃止できない。
【０００６】
平面のタンパク質－タンパク質相互作用は、小分子を含む多くの医薬品にはアクセスできないが、ペプチドは広い標的表面を補完するように設計された場合、高親和性および選択的阻害剤として優れた能力を有する。様々な方法により、広いＬＺ結合界面を標的化するペプチドｃ－Ｊｕｎアンタゴニストが産生された（Ｂｏｙｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，２００２；Ｍａｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，２００６；Ｋａｐｌａｎ ｅｔ ａｌ．，２０１４；Ｂａｘｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，２０１７；Ｌａｔｈｂｒｉｄｇｅ ｅｔ ａｌ．，２０１８）。しかしながら、ｃＪｕｎ ＤＢＤが未結合のままであり、ＴＲＥ ＤＮＡに結合することができるため、ＬＺ結合が機能性アンタゴニズムへとつながるかどうか予測するのは困難である（Ｓｅｌｄｅｅｎ ｅｔ ａｌ．，２００８；Ｓｚａｌｏｋｉ ｅｔ ａｌ．，２０１５）。合理的に設計されたペプチドは、ｃ－Ｊｕｎ ＤＢＤを標的化することが示されたが、ＬＺアンタゴニストよりも低い効力を示し、ＡＰ－１ファミリーＤＢＤにわたる高い配列類似性により特異性に関する懸念がある（Ｔｓｕｃｈｉｄａ ｅｔ ａｌ．，２００４）。

【０００７】
既存の方法の否定的側面の可能性を回避する１つの手法は、選択的であるが高親和性の相互作用により全長ｃ－Ｊｕｎ ｂＺＩＰドメインを標的化し、同時に、ＤＮＡ結合とＬＺ二量体化の両方をブロッキングする、より長いペプチドを利用することである。Ｏｌｉｖｅらは、この手法により、野生型（ＷＴ）ｃＦｏｓ ＬＺ（ｃ－Ｊｕｎとヘテロ二量体化することが公知）および合理的に設計されたＧｌｕ－リッチ酸性鎖を組み合わせたＡ－Ｆｏｓを産生した（Ｏｌｉｖｅ ｅｔ ａｌ．， １９９７）。Ａ－Ｆｏｓ設計原理は、ＬＺ相互作用がＮ末端側で伸び、酸性鎖の推定のｄ位へのＬｅｕ残基の組込みにより促進されたＤＢＤ酸性鎖相互作用を生じることを前提とする。
【０００８】
ペプチドが機能的に活性なｃ－Ｊｕｎアンタゴニストとして作用できるためには、それらはｃ－Ｊｕｎに結合するだけでなく、標的結合が機能の消失ももたらさなければならない。転写因子の機能的アンタゴニストを同定する、近年記載された一手法は、国際公開第２０２０１２８０１５号に記載されるＴｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ｂｌｏｃｋ Ｓｕｒｖｉｖａｌ（ＴＢＳ）アッセイである。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００９】
機能的アンタゴニストとして作用するｃ－Ｊｕｎアンタゴニスト、特に、治療使用のための所望の薬物動態特性を示すものの必要性が依然としてある。
【課題を解決するための手段】
【００１０】
本発明は、上記の考察に照らして考案された。
本発明者らは、ｃ－Ｊｕｎに結合し、そのＤＮＡ結合機能をアンタゴナイズすることが実証される新規のペプチド阻害剤を同定した。
【００１１】
本発明に至る研究において、本発明者らは、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストの酸性鎖およびロイシンジッパー領域にまたがるヒンジ領域が半無作為化された、ライブラリーベースの手法を使用した。ペプチドライブラリーは、この足場上で産生され、残基の中心系にわたり無作為化され、ＴＢＳスクリーニングプラットフォームを使用して試験された。これは、およそ１３０，０００ペプチドのライブラリーから、「ＨｉｎｇｅＷ」と呼ばれる、組換えにより産生した機能的ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストの同定をもたらした。ＨｉｎｇｅＷペプチドは、実施例において、優先的に、およびＨｉｎｇｅＷが由来するｃ－Ｊｕｎアンタゴニストと比較して高親和性でｃ－Ｊｕｎに結合し、ｃ－Ｊｕｎ／ＴＲＥ ＤＮＡ相互作用を効果的にアンタゴナイズすることが実証される。ｃ－Ｊｕｎの広く、浅いヘリックス結合表面の性質は、ＴＢＳによって同定されたものなど、より長いペプチドの使用を支持する。
【００１２】
ｂＺＩＰアンタゴニストの結合エピトープは、単一のα－ヘリックスの片側に提示され、それにより、標的結合は、この二次構造を採用するペプチドを必要とする。治療ペプチドの開発における基本工程が、効率的な結合のために必要とされる最小の機能単位に対するペプチドの縮小であることを認めて、本発明者らは、同定したアンタゴニストペプチドに段階的トランケーションを導入した。縮小は、相互作用界面と、広がった内部水素結合ネットワークの両方が減少し、水がこれらの相互作用と競合し、ランダムコイルに対するフォールディング平衡をシフトするため、ペプチドのαヘリックスを減少させる傾向がある。安定性および膜透過性などの薬物様特徴を増加させるようにペプチドを縮小することは、したがって、ペプチドのα－ヘリックスの減少から生じる親和性の減少に対してバランスを取る必要がある。本明細書において実証したように、ペプチドの薬物様特徴を改善しながら機能的活性を保持する、ＨｉｎｇｅＷペプチドの様々な最適化およびトランケート形態が開発された。

【００１３】
第１の態様では、本発明は、ＬＶ［Ｘ$_1$］ＥＥ［Ｘ$_2$］［Ｘ$_3$］ＬＥ［Ｘ$_4$］Ｅ（配列番号１）のアミノ酸配列を有する伸長したヒンジ領域；および伸長したヒンジ領域のＣ末端側のロイシンジッパー（ＬＺ）領域、
［ここで、
Ｘ$_1$は、Ｖ、Ｄ、Ｋ、ＣおよびＲから選択され、
Ｘ$_2$は、Ｄ、Ｋ、ＣおよびＲから選択され、
Ｘ$_3$は、Ｖ、Ｄ、Ｃ、ＫおよびＲから選択され、ならびに
Ｘ$_4$は、Ｅ、Ｄ、Ｃ、ＫおよびＲから選択される］
を含むｃ－Ｊｕｎアンタゴニストを提供する。
【００１４】
一部の実施形態では：
Ｘ$_1$は、Ｖ、Ｄ、Ｋ、およびＣから選択され、
Ｘ$_2$は、Ｄ、Ｋ、およびＣから選択され、
Ｘ$_3$は、Ｖ、Ｄ、およびＣから選択され、ならびに
Ｘ$_4$は、Ｅ、Ｄ、およびＣから選択される。
【００１５】
一部の実施形態では、伸長したヒンジ領域は、ＥＡ［Ｘ$_5$］［Ｘ$_6$］（配列番号２）のアミノ酸配列、
［ここで、
Ｘ$_5$は、Ｅ、ＫまたはＣから選択され、および
Ｘ$_6$は、ＥまたはＤから選択される］
を有するＮ末端酸性鎖をさらに含む。
【００１６】
一部の実施形態では、酸性鎖は、ＥＡＥＥ（配列番号３）のアミノ酸配列を有する。
一部の実施形態では、Ｘ$_1$は、Ｖである。一部の実施形態では、Ｘ$_3$は、Ｖである。一部の実施形態では、Ｘ$_1$およびＸ$_3$は、Ｖである。
【００１７】
一部の実施形態では：
（ｉ）Ｘ$_1$は、Ｖであり、Ｘ$_2$は、Ｄであり、Ｘ$_3$はＶであり、およびＸ$_4$はＥである；
（ｉｉ）Ｘ$_1$は、Ｖであり、Ｘ$_2$は、Ｋであり、Ｘ$_3$はＶであり、およびＸ$_4$はＤである；または
（ｉｉｉ）Ｘ$_1$は、Ｖであり、Ｘ$_2$は、Ｃであり、Ｘ$_3$はＶであり、およびＸ$_4$はＣである。
【００１８】
一部の実施形態では、ＬＺ領域は、アミノ酸配列
ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲ［Ｘ７］Ｅ［Ｘ８］Ｋ［Ｘ９］Ｌ［Ｘ１０］Ｄ［Ｘ１１］（配列番号２９）またはＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲ［Ｘ７］Ｅ［Ｘ８］Ｃ［Ｘ９］Ｌ［Ｘ１０］Ｃ［Ｘ１１］（配列番号３０）、
｛ここで
［Ｘ７］は、Ｋ、Ｌ、Ｓ、Ｗ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｍ、Ｔ、Ｖ、Ａ、Ｅ、またはＧであり；
［Ｘ８］は、Ｉ、Ｖ、またはＬであり；
［Ｘ９］および［Ｘ１０］は、任意のアミノ酸残基であり、
［Ｘ１１］は、Ｑ、Ｅ、またはＫである｝
を含む。
【００１９】
一部の実施形態では、ＬＺ領域は、
ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＳＥＩＣＳＬＱＣＱ（配列番号６６）；または
ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＣＥＬＳＣＱ（配列番号６７）；または

ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＡＥＩＣＮＬＳＣＱ（配列番号６８）；または
ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＴＥＩＣＳＬＭＣＫ（配列番号６９）；または
ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＡＥＩＣＳＬＱＣＱ（配列番号７０）、
または１、２もしくは３アミノ酸改変を含むこれらのバリアントからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【００２０】

一部の実施形態では、ＬＺ領域は、
ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＥＤＬＱＫＱ（配列番号４）；
ＩＥＱＬＥＥＫＮＫＡＬＫＤＥＩＥＤＬＱＫＱ（配列番号５）；
ＩＫＱＬＥＤＲＮＹＡＬＲＫＥＩＥＤＬＱＫＱ（配列番号６）；
ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＫＤＬＱＤＱ（配列番号７）；
ＩＥＱＬＥＥＫＮＫＡＬＫＤＥＩＥＤＬＹ（配列番号８）；
ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＥＤＬＱ（配列番号９）；および
ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＣＤＬＱＣＱ（配列番号２７）、
または１、２もしくは３アミノ酸改変を含むこれらのバリアントからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【００２１】

一部の実施形態では、ＬＺ領域は、ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＫＤＬＱＤＱ（配列番号７）、または１、２もしくは３アミノ酸改変を含むそのバリアントのアミノ酸配列を含み、

場合により、バリアントの配列番号７の１６位（ヘプタドのｂ位）および２０位（ヘプタドのｆ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、それぞれＫおよびＤアミノ酸残基である。

【００２２】

一部の実施形態では、ＬＺ領域は、ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＣＤＬＱＣＱ（配列番号２７）、または１、２もしくは３アミノ酸改変を含むそのバリアントのアミノ酸配列を含み、

場合により、バリアントの配列番号２７の１６位（ヘプタドのｂ位）および２０位（ヘプタドのｆ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、両方ともＣアミノ酸残基である。

【００２３】

一部の実施形態では、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、３０アミノ酸と７０アミノ酸の間、３０アミノ酸と６０アミノ酸の間、３０アミノ酸と５０アミノ酸の間、または３０アミノ酸と４０アミノ酸の間の長さを有する。特定の実施形態では、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、３６アミノ酸の長さを有する。

【００２４】

一部の実施形態では、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＫＤＬＱＤＱ（配列番号１０）；
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＫＶＬＥＤＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＫＤＬＱＤＱ（配列番号１１）；または
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＣＤＬＱＣＱ（配列番号２８）；
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＳＥＩＣＳＬＱＣＱ（配列番号３７）；
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＣＥＬＳＣＱ（配列番号３８）；または
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＡＥＩＣＮＬＳＣＱ（配列番号３９）；または
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＴＥＩＣＳＬＭＣＫ（配列番号４０）；または

ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＡＥＩＣＳＬＱＣＱ（配列番号４１）
または１、２もしくは３アミノ酸改変を含むこれらのバリアントのアミノ酸配列を有する。

【００２５】
一部の実施形態では、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、少なくとも１つの共有結合性のアミノ酸残基架橋剤を含む。そのようなペプチドは、本明細書において、「ヘリックス制約ｃ－Ｊｕｎアンタゴニスト」と呼ばれうる。一部の実施形態では、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチドは、少なくとも１つの共有結合性のｉからｉ＋４またはｉからｉ＋７へのアミノ酸残基架橋剤を含む。本明細書において実証するように、共有結合性のアミノ酸残基架橋剤の導入は、ヘリックス性を増加させ、ペプチドのアンタゴニスト活性を増加させることができる。小分子治療と類似の安定性および可溶性を保持しながら特異性を付与する同じアミノ酸配列により、親タンパク質と類似の結合親和性および機能を有する機能的に活性なペプチドアンタゴニストを誘導するために使用することができるため、これは有益である。これは、架橋剤としてＫ－Ｄラクタム架橋について実証されているが、類似の結果が、ＤＢＭＢなどのシステインアルキル化を介して２つのＣ残基間に形成されたアルキル架橋結合などの、他の架橋剤が使用される場合にも予期する。

【００２６】
一部の実施形態では、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチドは、少なくとも１つの共有結合性のｉからｉ＋４へのアミノ酸残基架橋剤を含む。例えば、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチドは、２つの共有結合性のｉからｉ＋４へのアミノ酸架橋剤を含みうる。好ましくは、共有結合性のｉからｉ＋４へのアミノ酸架橋剤（複数可）は、ヘプタドのｂ位からｆ位またはｆ位からｃ位に存在する。好ましくは、共有結合性のｉからｉ＋４へのアミノ酸架橋剤（複数可）は、Ｋ－Ｄラクタム架橋（複数可）または２つのＣ残基の間に形成されたアルキル架橋結合（システインアルキル化）である。

【００２７】
第２の態様では、本発明は、本発明の第１の態様に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチドをコードする核酸を提供する。
第３の態様では、本発明は、脂質、ポリマー、または第２のペプチドにコンジュゲートされた本発明の第１の態様に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチドを含むコンジュゲートを提供する。

【００２８】
第４の態様では、本発明は、生理学的に許容されるビヒクルまたは担体と組み合わせた、本発明の第１の態様に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニスト、本発明の第２の態様に記載の核酸、または本発明の第３の態様に記載のコンジュゲートを含む医薬組成物を提供する。

【００２９】
第５の態様では、本発明は、医薬として使用するための、本発明の第１の態様に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチド、本発明の第２の態様に記載の核酸、本発明の第３の態様に記載のコンジュゲート、または本発明の第４の態様に記載の医薬組成物を提供する。

【００３０】
第６の態様では、本発明は、ｃ－Ｊｕｎペプチドを含むかまたは発現する細胞に対して、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで、本発明の第１の態様に記載のペプチド、本発明の第２の態様に記載の核酸、または本発明の第３の態様に記載のコンジュゲートを含む、ｃ－Ｊｕｎを阻害する方法を提供する。

【００３１】
本明細書では、本発明の第１の態様に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチドを産生する方法も提供する。ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチドを産生する方法は、固相または液相ペプチド合成を使用してｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチドを合成するステップを含みうるか、または組換え発現によってｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチドを産生するステ

ップを含みうる。方法は、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチドをクロスリンカーと接触させ、ヘリックス制約ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチドを産生するステップをさらに含みうる。本明細書では、本発明の第１の態様に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチドを架橋剤と接触させるステップを含む、ヘリックス制約ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチドを産生する方法をさらに提供する。

【００３２】

本発明は、そのような組合せが明らかに容認できないかまたは明確に避けられるような場合を除き、態様と記載された好ましい特徴の組合せを含む。

本発明のこれらおよび他の態様は、以下により詳細に記載される。

【００３３】

本発明の原理を例示する実施形態および実験は、添付の図面を参照してここで議論されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【００３４】

【図１Ａ】ＴＲＥ　ＤＮＡ結合ｃＪｕｎ構造およびｃＪｕｎアンタゴニスト設計。（Ａ）ＤＮＡ結合ｃＪｕｎホモ二量体結晶構造（ＰＤＢ：２Ｈ７Ｈ）を、二量体化およびＤＮＡ結合に必要なＬＺおよびＤＢＤ成分をハイライトして示す。（Ｂ）酸性鎖設計原理の概略図（Ａ－ＦｏｓＷ、ＨｉｎｇｅＷ）。これは、Ｇｌｕリッチ鎖がｃＪｕｎ　ＤＢＤと相互作用するように付加される、ｃＪｕｎ　ＬＺへと結合することが公知の領域を利用する。

【図１Ｂ】ＴＲＥ　ＤＮＡ結合ｃＪｕｎ構造およびｃＪｕｎアンタゴニスト設計。（Ａ）ＤＮＡ結合ｃＪｕｎホモ二量体結晶構造（ＰＤＢ：２Ｈ７Ｈ）を、二量体化およびＤＮＡ結合に必要なＬＺおよびＤＢＤ成分をハイライトして示す。（Ｂ）酸性鎖設計原理の概略図（Ａ－ＦｏｓＷ、ＨｉｎｇｅＷ）。これは、Ｇｌｕリッチ鎖がｃＪｕｎ　ＤＢＤと相互作用するように付加される、ｃＪｕｎ　ＬＺへと結合することが公知の領域を利用する。

【図２】遺伝子への１５のＴＲＥ部位の導入を示すＴＲＥ－ｍＤＨＦＲのタンパク質およびＤＮＡ配列。ＷＴマウスタンパク質から変異したアミノ酸およびＤＮＡ塩基は赤で示され、これらの突然変異が付加されたＴＲＥ　ＤＮＡ部位は太字にされ、下線が引かれた。緑で示したのは、ｐＥＳ３００ｄベクターへと遺伝子をサブクローニングするために使用したＮｈｅＩおよびＨｉｎｄＩＩＩ部位である。

【図３Ａ】ｍＤＨＦＲは、ＴＲＥ部位の導入時に活性を保持する。（Ａ）１５のＴＲＥ部位が、ｍＤＨＦＲ遺伝子へと導入され（２個はサイレントであり１３個は置換である）、ｃＪｕｎ誘導転写ブロックを可能にした。置換は、ｍＤＨＦＲ構造（ＰＤＢコード：１Ｕ７２）上にマップし（緑）、基質ＤＨＦ（ＤＨＦ結合部位に結合した競合阻害剤メトトレキサート（ＭＴＸ）が示される）および共因子ＮＡＤＰＨが結合した、活性部位から遠位の表面曝露を示す。３４０ｎｍでの吸光度の変化を測定し、基質ＤＨＦありまたはなしでの、（Ｂ）ＷＴ－ｍＤＨＦＲおよび（Ｃ）ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲによるＮＡＤＰＨの代謝回転率を決定した。ＴＭＰの存在下で繰り返された反応も示し、予想されたようにＴＲＥ－ｍＤＨＦＲは部分的に阻害され、両酵素の活性が保持されることを示す。比活性は、直線初速度から算出した（ＷＴ－ｍＤＨＦＲは最初の２．５分、ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲは最初の１０分；＋ＮＡＤＰＨのみの反応ブランクを差し引いた）。データは、エラーを一標準偏差として示し、３回の実験からの平均である。ＭＴＸは、ＴＭＰよりも広範な阻害を示し、真核と原核ＤＨＦＲ酵素の両方を阻害し、したがって、ＷＴ－とＴＲＥ－ｍＤＨＦＲの両方を阻害した。

【図３Ｂ】ｍＤＨＦＲは、ＴＲＥ部位の導入時に活性を保持する。（Ａ）１５のＴＲＥ部位が、ｍＤＨＦＲ遺伝子へと導入され（２個はサイレントであり１３個は置換である）、ｃＪｕｎ誘導転写ブロックを可能にした。置換は、ｍＤＨＦＲ構造（ＰＤＢコード：１Ｕ７２）上にマップし（緑）、基質ＤＨＦ（ＤＨＦ結合部位に結合した競合阻害剤メトトレキサート（ＭＴＸ）が示される）および共因子ＮＡＤＰＨが結合した、活性部位から遠位の表面曝露を示す。３４０ｎｍでの吸光度の変化を測定し、基質ＤＨＦありまたはなしでの、（Ｂ）ＷＴ－ｍＤＨＦＲおよび（Ｃ）ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲによるＮＡＤＰＨの代謝回

転率を決定した。ＴＭＰの存在下で繰り返された反応も示し、予想されたようにＴＲＥ－ｍＤＨＦＲは部分的に阻害され、両酵素の活性が保持されることを示す。比活性は、直線初速度から算出した（ＷＴ－ｍＤＨＦＲは最初の２．５分、ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲは最初の１０分；＋ＮＡＤＰＨのみの反応ブランクを差し引いた）。データは、エラーを一標準偏差として示し、３回の実験からの平均である。ＭＴＸは、ＴＭＰよりも広範な阻害を示し、真核と原核ＤＨＦＲ酵素の両方を阻害し、したがって、ＷＴ－とＴＲＥ－ｍＤＨＦＲの両方を阻害した。

【図３Ｃ】ｍＤＨＦＲは、ＴＲＥ部位の導入時に活性を保持する。（Ａ）１５のＴＲＥ部位が、ｍＤＨＦＲ遺伝子へと導入され（２個はサイレントであり１３個は置換である）、ｃＪｕｎ誘導転写ブロックを可能にした。置換は、ｍＤＨＦＲ構造（ＰＤＢコード：１Ｕ７２）上にマップし（緑）、基質ＤＨＦ（ＤＨＦ結合部位に結合した競合阻害剤メトトレキサート（ＭＴＸ）が示される）および共因子ＮＡＤＰＨが結合した、活性部位から遠位の表面曝露を示す。３４０ｎｍでの吸光度の変化を測定し、基質ＤＨＦありまたはなしでの、（Ｂ）ＷＴ－ｍＤＨＦＲおよび（Ｃ）ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲによるＮＡＤＰＨの代謝回転率を決定した。ＴＭＰの存在下で繰り返された反応も示し、予想されたようにＴＲＥ－ｍＤＨＦＲは部分的に阻害され、両酵素の活性が保持されることを示す。比活性は、直線初速度から算出した（ＷＴ－ｍＤＨＦＲは最初の２．５分、ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲは最初の１０分；＋ＮＡＤＰＨのみの反応ブランクを差し引いた）。データは、エラーを一標準偏差として示し、３回の実験からの平均である。ＭＴＸは、ＴＭＰよりも広範な阻害を示し、真核と原核ＤＨＦＲ酵素の両方を阻害し、したがって、ＷＴ－とＴＲＥ－ｍＤＨＦＲの両方を阻害した。

【図４Ａ】ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲは、可溶性画分で発現され、さらなる研究のために精製されうる。（Ａ）ＩＰＴＧ（１ｍＭ、１８時間、３０℃）による、ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲプラスミド発現の誘導前後の細胞からの大腸菌（Ｅ．Ｃｏｌｉ）細胞溶解物のＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析。全（Ｔ）試料は、溶解直後に採取し、可溶性（Ｓ）試料は、溶解物の遠心分離後に採取する。これは、ＴおよびＳ画分において等しいバンド強度の、誘導した試料におけるタンパク質バンドの出現を示し、タンパク質がフォールドされ、可溶性であることを示している。ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲは、その６×Ｈｉｓタグにより固定化金属アフィニティクロマトグラフィーカラムに結合させ、続いてイミダゾール勾配によって溶出し（Ｂ）、誘導されたタンパク質バンドを含有することが示された合わせた濃縮画分のＳＤＳ－ＰＡＧＥ（Ｃ）によって決定された純タンパク質を得ることができる。ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲは、タンパク質マーカーレーン（Ｍ）によって予測されたように、ポリアクリルアミドゲルを通って遊走せず、明らかに高い分子量で流れるが、その同一性は、（Ｄ）エレクトロスプレーイオン化マススペクトロメトリーによって確認された。

【図４Ｂ】ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲは、可溶性画分で発現され、さらなる研究のために精製されうる。（Ａ）ＩＰＴＧ（１ｍＭ、１８時間、３０℃）による、ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲプラスミド発現の誘導前後の細胞からの大腸菌（Ｅ．Ｃｏｌｉ）細胞溶解物のＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析。全（Ｔ）試料は、溶解直後に採取し、可溶性（Ｓ）試料は、溶解物の遠心分離後に採取する。これは、ＴおよびＳ画分において等しいバンド強度の、誘導した試料におけるタンパク質バンドの出現を示し、タンパク質がフォールドされ、可溶性であることを示している。ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲは、その６×Ｈｉｓタグにより固定化金属アフィニティクロマトグラフィーカラムに結合させ、続いてイミダゾール勾配によって溶出し（Ｂ）、誘導されたタンパク質バンドを含有することが示された合わせた濃縮画分のＳＤＳ－ＰＡＧＥ（Ｃ）によって決定された純タンパク質を得ることができる。ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲは、タンパク質マーカーレーン（Ｍ）によって予測されたように、ポリアクリルアミドゲルを通って遊走せず、明らかに高い分子量で流れるが、その同一性は、（Ｄ）エレクトロスプレーイオン化マススペクトロメトリーによって確認された。

【図４Ｃ】ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲは、可溶性画分で発現され、さらなる研究のために精製されうる。（Ａ）ＩＰＴＧ（１ｍＭ、１８時間、３０℃）による、ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲプラスミド発現の誘導前後の細胞からの大腸菌（Ｅ．Ｃｏｌｉ）細胞溶解物のＳＤＳ－ＰＡＧ

Ｅ解析。全（Ｔ）試料は、溶解直後に採取し、可溶性（Ｓ）試料は、溶解物の遠心分離後に採取する。これは、ＴおよびＳ画分において等しいバンド強度の、誘導した試料におけるタンパク質バンドの出現を示し、タンパク質がフォールドされ、可溶性であることを示している。ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲは、その６×Ｈｉｓタグにより固定化金属アフィニティクロマトグラフィーカラムに結合させ、続いてイミダゾール勾配によって溶出し（Ｂ）、誘導されたタンパク質バンドを含有することが示された合わせた濃縮画分のＳＤＳ－ＰＡＧＥ（Ｃ）によって決定された純タンパク質を得ることができる。ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲは、タンパク質マーカーレーン（Ｍ）によって予測されたように、ポリアクリルアミドゲルを通って遊走せず、明らかに高い分子量で流れるが、その同一性は、（Ｄ）エレクトロスプレーイオン化マススペクトロメトリーによって確認された。

【図４Ｄ】ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲは、可溶性画分で発現され、さらなる研究のために精製されうる。（Ａ）ＩＰＴＧ（１ｍＭ、１８時間、３０℃）による、ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲプラスミド発現の誘導前後の細胞からの大腸菌（Ｅ．Ｃｏｌｉ）細胞溶解物のＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析。全（Ｔ）試料は、溶解直後に採取し、可溶性（Ｓ）試料は、溶解物の遠心分離後に採取する。これは、ＴおよびＳ画分において等しいバンド強度の、誘導した試料におけるタンパク質バンドの出現を示し、タンパク質がフォールドされ、可溶性であることを示している。ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲは、その６×Ｈｉｓタグにより固定化金属アフィニティクロマトグラフィーカラムに結合させ、続いてイミダゾール勾配によって溶出し（Ｂ）、誘導されたタンパク質バンドを含有することが示された合わせた濃縮画分のＳＤＳ－ＰＡＧＥ（Ｃ）によって決定された純タンパク質を得ることができる。ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲは、タンパク質マーカーレーン（Ｍ）によって予測されたように、ポリアクリルアミドゲルを通って遊走せず、明らかに高い分子量で流れるが、その同一性は、（Ｄ）エレクトロスプレーイオン化マススペクトロメトリーによって確認された。

【図５】ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲを発現する大腸菌とｃＪｕｎ　ｂＺＩＰによって転写ブロックされたＴＲＥ－ｍＤＨＦＲ発現を示す大腸菌の間の選択性をもたらすために必要とされるＴＭＰ濃度の最適化。指定したタンパク質を発現する、制御された数の大腸菌細胞を、様々なＴＭＰ濃度で選択培地上にプレートした。４μＭ　ＴＭＰは、ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲのみのプレートとＴＲＥ－ｍＤＨＦＲ＋ｃＪｕｎ　ｂＺＩＰのプレートの間でのコロニー数に最適な差をもたらす。

【図６】細菌ＤＨＦＲはＴＭＰによって阻害され、その活性はＴＲＥ－ｍＤＨＦＲ発現の誘導によって置き換えられる。ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲのみのためのプラスミドを含有する大腸菌細胞は、ＴＢＳアッセイの設計原理に従って、異なるアガー培地上で差次的に増殖する。Ｍ９アガー（１）では、コロニーの菌叢は自由な細菌増殖として産生され；培地にＴＭＰを添加すると（２）、細菌ＤＨＦＲは阻害され、細胞は増殖できず；ＩＰＴＧのさらなる添加（３）は、ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲの発現をもたらし、ある程度まで細胞生存を回復する。

【図７】ＷＴ－ｍＤＨＦＲとＴＲＥ－ｍＤＨＦＲの両方が、広範なＤＨＦＲ阻害剤ＭＴＸによって阻害される。３４０ｎｍでの吸光度の変化を測定し、基質ＤＨＦありまたはなしでの、ＷＴ－ｍＤＨＦＲおよびＴＲＥ－ｍＤＨＦＲによるＮＡＤＰＨの代謝回転率を決定した。ＭＴＸの存在下で繰り返された反応も示し、予想されたように反応の明確な阻害を示し、ＤＨＦＲ活性を示す。

【図８Ａ】機能的に活性なｃＪｕｎ阻害剤を駆動するＴｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｂｌｏｃｋ　Ｓｕｒｖｉｖａｌ（ＴＢＳ）アッセイ。（Ａ）ＴＢＳの設計および操作を示す概略図である。（Ｂ）指定したタンパク質を発現する、制御された数の大腸菌を、選択培地上にプレートし、増殖速度は、コロニー形成単位を数えることによって算出した。（１）ＷＴ－ｍＤＨＦＲ発現は、ｅｃＤＨＦＲを置き換えることができ、ＴＭＰによって阻害されず、顕著な増殖をもたらす。（２）ｃＪｕｎ　ｂＺＩＰがさらに発現される場合、コロニー数への小さな効果が観察される。（３）ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲは、予想されたようにＷＴよりも少ないコロニー数で、阻害されたｅｃＤＨＦＲを置き換えることができる。（４）ｃＪｕｎ　ＬＺドメイン（ＤＢＤを欠損する）は、ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲ転写およびコロ

ニー形成に影響しないが、（５）ｃＪｕｎ　ｂＺＩＰドメイン（ＤＢＤを有する）はＴＲＥ部位に結合し、ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲの転写をブロックして細菌生存の減少をもたらす。（６）ｃＦｏｓ　ＬＺおよび（７）ＦｏｓＷは、公知のｃＪｕｎ結合剤であるが、それらは、ＴＲＥ　ＤＮＡからｃＪｕｎ　ｂＺＩＰを効果的に解離することができない。しかしながら、（８）Ａ－ＦｏｓＷおよびＴＢＳ由来ヒット（９）ＨｉｎｇｅＷは、ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲ転写ブロックを除去し、細胞生存を回復する。棒グラフは、３回の反復実験の平均を表す。エラーは、１標準偏差として示す。ｔ検定からの選択されたＰ値は、図Ｓ７に報告した棒グラフ内の全ての可能な比較のための値により示す（＊Ｐ≦０．０５；＊＊Ｐ≦０．０１；＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１）。段階希釈を使用して、必要な場合、コロニー数を定量した。代表的なプレート画像およびＴＲＥ－ｍＤＨＦＲ転写への効果を示す概略図も示す。

【図８Ｂ】機能的に活性なｃＪｕｎ阻害剤を駆動するＴｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｂｌｏｃｋ　Ｓｕｒｖｉｖａｌ（ＴＢＳ）アッセイ。（Ａ）ＴＢＳの設計および操作を示す概略図である。（Ｂ）指定したタンパク質を発現する、制御された数の大腸菌を、選択培地上にプレートし、増殖速度は、コロニー形成単位を数えることによって算出した。（１）ＷＴ－ｍＤＨＦＲ発現は、ｅｃＤＨＦＲを置き換えることができ、ＴＭＰによって阻害されず、顕著な増殖をもたらす。（２）ｃＪｕｎ　ｂＺＩＰがさらに発現される場合、コロニー数への小さな効果が観察される。（３）ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲは、予想されたようにＷＴよりも少ないコロニー数で、阻害されたｅｃＤＨＦＲを置き換えることができる。（４）ｃＪｕｎ　ＬＺドメイン（ＤＢＤを欠損する）は、ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲ転写およびコロニー形成に影響しないが、（５）ｃＪｕｎ　ｂＺＩＰドメイン（ＤＢＤを有する）はＴＲＥ部位に結合し、ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲの転写をブロックして細菌生存の減少をもたらす。（６）ｃＦｏｓ　ＬＺおよび（７）ＦｏｓＷは、公知のｃＪｕｎ結合剤であるが、それらは、ＴＲＥ　ＤＮＡからｃＪｕｎ　ｂＺＩＰを効果的に解離することができない。しかしながら、（８）Ａ－ＦｏｓＷおよびＴＢＳ由来ヒット（９）ＨｉｎｇｅＷは、ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲ転写ブロックを除去し、細胞生存を回復する。棒グラフは、３回の反復実験の平均を表す。エラーは、１標準偏差として示す。ｔ検定からの選択されたＰ値は、図Ｓ７に報告した棒グラフ内の全ての可能な比較のための値により示す（＊Ｐ≦０．０５；＊＊Ｐ≦０．０１；＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１）。段階希釈を使用して、必要な場合、コロニー数を定量した。代表的なプレート画像およびＴＲＥ－ｍＤＨＦＲ転写への効果を示す概略図も示す。

【図９】標的およびアンタゴニストペプチド配列、ならびにＴＢＳライブラリー設計。ｃＪｕｎ標的配列が示され、関連するオフターゲットｃＦｏｓと比較した。ｃＪｕｎ結合の最適化を促進するため、Ａ－ＦｏｓＷ配列の１０残基区間（ｅ４～ｇ５）内の９残基が、ライブラリー内のバリエーションのために選択され、酸性、極性および疎水性オプションを提供し、１３１，０７２メンバーのライブラリーを生じる。ＴＢＳを使用するスクリーニングは、「ＨｉｎｇｅＷ」配列を産生した。ＤＢＤおよび酸性鎖領域は、それぞれ青または赤で示し、ウィナーペプチドの選択されたライブラリーオプションは緑でハイライトした。残基は、ヘプタド番号および所与のヘプタドリピート内の位置によって名付けられた。

【図１０】ＴＢＳ選択圧は、アッセイウィニングシーケンスとしてＨｉｎｇｅＷの選択に対するＤＮＡプールシーケンシングのライブラリーメンバーの提示をシフトする。最初の選択プレート（９コロニーをシーケンスした）、第１の継代（６コロニーをシーケンスした）および最初のウィニングシーケンス（ＨｉｎｇｅＷ；ＤＮＡプールおよび５コロニーに存在する唯一のシーケンス）のアミノ酸の相対量を示すシーケンスロゴ。

【図１１Ａ】ＴＢＳウィナーペプチドＨｉｎｇｅＷは、Ａ－ＦｏｓＷより優先的にｃＪｕｎに結合する。ＣＤスペクトル（２０℃）は、（Ａ）ＨｉｎｇｅＷまたは（Ｂ）Ａ－ＦｏｓＷのいずれかへのｃＪｕｎの結合を示す。両場合において、ヘテロ二量体スペクトルは、成分ペプチドの平均と比較したα－ヘリックス特徴の増加を示す。しかしながら、効果は、ＨｉｎｇｅＷでより大きく、ペプチドのヘリックス性のより大きな増加を示している

。同様に、（Ｃ）ＨｉｎｇｅＷまたは（Ｄ）Ａ－ＦｏｓＷのいずれかに結合したｃＪｕｎの熱変成は、成分ペプチド変性プロファイルの平均から右にシフトする。ＨｉｎｇｅＷ／ｃＪｕｎは、ＨｉｎｇｅＷホモ二量体の低いＴｍによりＡ－ＦｏｓＷ／ｃＪｕｎよりも結合の大きなΔＴｍを示す（矢印によって示す）。ＣＤ二量体交換スペクトルは、（Ｅ）ＨｉｎｇｅＷが、ＨｉｎｇｅＷへのｃＪｕｎの優先結合によりＡ－ＦｏｓＷと交換するため、ＨｉｎｇｅＷがＡ－ＦｏｓＷ／ｃＪｕｎヘテロ二量体と混合される場合、ヘリックス性が増加すること、および（Ｆ）Ａ－ＦｏｓＷがＨｉｎｇｅＷ／ｃＪｕｎヘテロ二量体と混合される場合、平均からのシフトが観察されず、二量体集団の変化を示さないことを示す。矢印は、１９０および２２２ｎｍでの平均からのシフトをハイライトするように示す。全ての実験において、全試料ペプチド濃度は、当モル濃度の各成分ペプチドを使用して１０μＭに固定され、濃度依存的効果を除外した。

【図１１Ｂ】ＴＢＳウィナーペプチドＨｉｎｇｅＷは、Ａ－ＦｏｓＷより優先的にｃＪｕｎに結合する。ＣＤスペクトル（２０℃）は、（Ａ）ＨｉｎｇｅＷまたは（Ｂ）Ａ－ＦｏｓＷのいずれかへのｃＪｕｎの結合を示す。両場合において、ヘテロ二量体スペクトルは、成分ペプチドの平均と比較したα－ヘリックス特徴の増加を示す。しかしながら、効果は、ＨｉｎｇｅＷでより大きく、ペプチドのヘリックス性のより大きな増加を示している。同様に、（Ｃ）ＨｉｎｇｅＷまたは（Ｄ）Ａ－ＦｏｓＷのいずれかに結合したｃＪｕｎの熱変成は、成分ペプチド変性プロファイルの平均から右にシフトする。ＨｉｎｇｅＷ／ｃＪｕｎは、ＨｉｎｇｅＷホモ二量体の低いＴｍによりＡ－ＦｏｓＷ／ｃＪｕｎよりも結合の大きなΔＴｍを示す（矢印によって示す）。ＣＤ二量体交換スペクトルは、（Ｅ）ＨｉｎｇｅＷが、ＨｉｎｇｅＷへのｃＪｕｎの優先結合によりＡ－ＦｏｓＷと交換するため、ＨｉｎｇｅＷがＡ－ＦｏｓＷ／ｃＪｕｎヘテロ二量体と混合される場合、ヘリックス性が増加すること、および（Ｆ）Ａ－ＦｏｓＷがＨｉｎｇｅＷ／ｃＪｕｎヘテロ二量体と混合される場合、平均からのシフトが観察されず、二量体集団の変化を示さないことを示す。矢印は、１９０および２２２ｎｍでの平均からのシフトをハイライトするように示す。全ての実験において、全試料ペプチド濃度は、当モル濃度の各成分ペプチドを使用して１０μＭに固定され、濃度依存的効果を除外した。

【図１１Ｃ】ＴＢＳウィナーペプチドＨｉｎｇｅＷは、Ａ－ＦｏｓＷより優先的にｃＪｕｎに結合する。ＣＤスペクトル（２０℃）は、（Ａ）ＨｉｎｇｅＷまたは（Ｂ）Ａ－ＦｏｓＷのいずれかへのｃＪｕｎの結合を示す。両場合において、ヘテロ二量体スペクトルは、成分ペプチドの平均と比較したα－ヘリックス特徴の増加を示す。しかしながら、効果は、ＨｉｎｇｅＷでより大きく、ペプチドのヘリックス性のより大きな増加を示している。同様に、（Ｃ）ＨｉｎｇｅＷまたは（Ｄ）Ａ－ＦｏｓＷのいずれかに結合したｃＪｕｎの熱変成は、成分ペプチド変性プロファイルの平均から右にシフトする。ＨｉｎｇｅＷ／ｃＪｕｎは、ＨｉｎｇｅＷホモ二量体の低いＴｍによりＡ－ＦｏｓＷ／ｃＪｕｎよりも結合の大きなΔＴｍを示す（矢印によって示す）。ＣＤ二量体交換スペクトルは、（Ｅ）ＨｉｎｇｅＷが、ＨｉｎｇｅＷへのｃＪｕｎの優先結合によりＡ－ＦｏｓＷと交換するため、ＨｉｎｇｅＷがＡ－ＦｏｓＷ／ｃＪｕｎヘテロ二量体と混合される場合、ヘリックス性が増加すること、および（Ｆ）Ａ－ＦｏｓＷがＨｉｎｇｅＷ／ｃＪｕｎヘテロ二量体と混合される場合、平均からのシフトが観察されず、二量体集団の変化を示さないことを示す。矢印は、１９０および２２２ｎｍでの平均からのシフトをハイライトするように示す。全ての実験において、全試料ペプチド濃度は、当モル濃度の各成分ペプチドを使用して１０μＭに固定され、濃度依存的効果を除外した。

【図１１Ｄ】ＴＢＳウィナーペプチドＨｉｎｇｅＷは、Ａ－ＦｏｓＷより優先的にｃＪｕｎに結合する。ＣＤスペクトル（２０℃）は、（Ａ）ＨｉｎｇｅＷまたは（Ｂ）Ａ－ＦｏｓＷのいずれかへのｃＪｕｎの結合を示す。両場合において、ヘテロ二量体スペクトルは、成分ペプチドの平均と比較したα－ヘリックス特徴の増加を示す。しかしながら、効果は、ＨｉｎｇｅＷでより大きく、ペプチドのヘリックス性のより大きな増加を示している。同様に、（Ｃ）ＨｉｎｇｅＷまたは（Ｄ）Ａ－ＦｏｓＷのいずれかに結合したｃＪｕｎの熱変成は、成分ペプチド変性プロファイルの平均から右にシフトする。ＨｉｎｇｅＷ／

ｃＪｕｎは、ＨｉｎｇｅＷホモ二量体の低いＴｍによりＡ－ＦｏｓＷ／ｃＪｕｎよりも結合の大きなΔＴｍを示す（矢印によって示す）。ＣＤ二量体交換スペクトルは、（Ｅ）ＨｉｎｇｅＷが、ＨｉｎｇｅＷへのｃＪｕｎの優先結合によりＡ－ＦｏｓＷと交換するため、ＨｉｎｇｅＷがＡ－ＦｏｓＷ／ｃＪｕｎヘテロ二量体と混合される場合、ヘリックス性が増加すること、および（Ｆ）Ａ－ＦｏｓＷがＨｉｎｇｅＷ／ｃＪｕｎヘテロ二量体と混合される場合、平均からのシフトが観察されず、二量体集団の変化を示さないことを示す。矢印は、１９０および２２２ｎｍでの平均からのシフトをハイライトするように示す。全ての実験において、全試料ペプチド濃度は、当モル濃度の各成分ペプチドを使用して１０μＭに固定され、濃度依存的効果を除外した。

【図１１Ｅ】ＴＢＳウィナーペプチドＨｉｎｇｅＷは、Ａ－ＦｏｓＷより優先的にｃＪｕｎに結合する。ＣＤスペクトル（２０℃）は、（Ａ）ＨｉｎｇｅＷまたは（Ｂ）Ａ－ＦｏｓＷのいずれかへのｃＪｕｎの結合を示す。両場合において、ヘテロ二量体スペクトルは、成分ペプチドの平均と比較したα－ヘリックス特徴の増加を示す。しかしながら、効果は、ＨｉｎｇｅＷでより大きく、ペプチドのヘリックス性のより大きな増加を示している。同様に、（Ｃ）ＨｉｎｇｅＷまたは（Ｄ）Ａ－ＦｏｓＷのいずれかに結合したｃＪｕｎの熱変成は、成分ペプチド変性プロファイルの平均から右にシフトする。ＨｉｎｇｅＷ／ｃＪｕｎは、ＨｉｎｇｅＷホモ二量体の低いＴｍによりＡ－ＦｏｓＷ／ｃＪｕｎよりも結合の大きなΔＴｍを示す（矢印によって示す）。ＣＤ二量体交換スペクトルは、（Ｅ）ＨｉｎｇｅＷが、ＨｉｎｇｅＷへのｃＪｕｎの優先結合によりＡ－ＦｏｓＷと交換するため、ＨｉｎｇｅＷがＡ－ＦｏｓＷ／ｃＪｕｎヘテロ二量体と混合される場合、ヘリックス性が増加すること、および（Ｆ）Ａ－ＦｏｓＷがＨｉｎｇｅＷ／ｃＪｕｎヘテロ二量体と混合される場合、平均からのシフトが観察されず、二量体集団の変化を示さないことを示す。矢印は、１９０および２２２ｎｍでの平均からのシフトをハイライトするように示す。全ての実験において、全試料ペプチド濃度は、当モル濃度の各成分ペプチドを使用して１０μＭに固定され、濃度依存的効果を除外した。

【図１１Ｆ】ＴＢＳウィナーペプチドＨｉｎｇｅＷは、Ａ－ＦｏｓＷより優先的にｃＪｕｎに結合する。ＣＤスペクトル（２０℃）は、（Ａ）ＨｉｎｇｅＷまたは（Ｂ）Ａ－ＦｏｓＷのいずれかへのｃＪｕｎの結合を示す。両場合において、ヘテロ二量体スペクトルは、成分ペプチドの平均と比較したα－ヘリックス特徴の増加を示す。しかしながら、効果は、ＨｉｎｇｅＷでより大きく、ペプチドのヘリックス性のより大きな増加を示している。同様に、（Ｃ）ＨｉｎｇｅＷまたは（Ｄ）Ａ－ＦｏｓＷのいずれかに結合したｃＪｕｎの熱変成は、成分ペプチド変性プロファイルの平均から右にシフトする。ＨｉｎｇｅＷ／ｃＪｕｎは、ＨｉｎｇｅＷホモ二量体の低いＴｍによりＡ－ＦｏｓＷ／ｃＪｕｎよりも結合の大きなΔＴｍを示す（矢印によって示す）。ＣＤ二量体交換スペクトルは、（Ｅ）ＨｉｎｇｅＷが、ＨｉｎｇｅＷへのｃＪｕｎの優先結合によりＡ－ＦｏｓＷと交換するため、ＨｉｎｇｅＷがＡ－ＦｏｓＷ／ｃＪｕｎヘテロ二量体と混合される場合、ヘリックス性が増加すること、および（Ｆ）Ａ－ＦｏｓＷがＨｉｎｇｅＷ／ｃＪｕｎヘテロ二量体と混合される場合、平均からのシフトが観察されず、二量体集団の変化を示さないことを示す。矢印は、１９０および２２２ｎｍでの平均からのシフトをハイライトするように示す。全ての実験において、全試料ペプチド濃度は、当モル濃度の各成分ペプチドを使用して１０μＭに固定され、濃度依存的効果を除外した。

【図１２】ｃＪｕｎ　ｂＺＩＰとのＦｏｓＷの相互作用を示すＣＤ熱変性プロファイル。ＦｏｓＷ／ｃＪｕｎ　ｂＺＩＰヘテロ二量体の熱変性プロファイルは、２つの成分ペプチド曲線の平均からシフトされる。これは、結合相互作用を示す、ヘリックス性およびＴｍ値（ヘテロ二量体では５４℃）の増加を示す。

【図１３】ＴＢＳウィナーペプチドＨｉｎｇｅＷは、ｃＦｏｓと相互作用しない。測定したヘテロ二量体スペクトル／熱変性曲線を個々の成分スペクトルの平均とオーバーレイした場合、ＨｉｎｇｅＷとｃＦｏｓの間に相互作用がないことを示すＣＤスペクトルおよび熱変性曲線。

【図１４Ａ】等温滴定熱量測定データは、Ａ－ＦｏｓＷ／ｃＪｕｎと比較してＨｉｎｇｅ

Ｗ／ｃＪｕｎの６倍高い親和性を示す。（Ａ）ＨｉｎｇｅＷおよび（Ｂ）Ａ－ＦｏｓＷに結合するｃＪｕｎのＩＴＣ解析プロファイルは、上のグラフで滴定による実力補正プロットを示し、下のグラフで統合データ点および単一部位モデルフィット（ＭｉｃｒｏＣａｌＯＲＩＧＩＮソフトウェア）を示す。

【図１４Ｂ】等温滴定熱量測定データは、Ａ－ＦｏｓＷ／ｃＪｕｎと比較してＨｉｎｇｅＷ／ｃＪｕｎの６倍高い親和性を示す。（Ａ）ＨｉｎｇｅＷおよび（Ｂ）Ａ－ＦｏｓＷに結合するｃＪｕｎのＩＴＣ解析プロファイルは、上のグラフで滴定による実力補正プロットを示し、下のグラフで統合データ点および単一部位モデルフィット（ＭｉｃｒｏＣａｌＯＲＩＧＩＮソフトウェア）を示す。

【図１５Ａ】ＨｉｎｇｅＷは、Ａ－ＦｏｓＷよりも効果的にｃＪｕｎ／ＴＲＥ　ＤＮＡ相互作用をアンタゴナイズする。（Ａ）ＨｉｎｇｅＷが非機能性ヘテロ二量体にｃＪｕｎを隔離するため、試料へのＨｉｎｇｅＷの滴定により逆転される、ｃＪｕｎの付加時の～２８１ｎｍでのＴＲＥ　ＤＮＡピークにおいてシフトを示すＣＤスペクトル。（Ｂ）結合から遊離のＴＲＥまでの相対ピークシフトが、全ての濃度でＨｉｎｇｅＷのより大きなｃＪｕｎ／ＴＲＥ　ＤＮＡ阻害を示すＨｉｎｇｅＷおよびＡ－ＦｏｓＷの濃度を変えるためにプロットする。ｃＪｕｎの添加時に（Ｃ）未結合のＴＲＥ　ＤＮＡバンドシフトおよび（Ｄ）ＨｉｎｇｅＷまたは（Ｅ）Ａ－ＦｏｓＷのいずれかの滴定時の未結合のＤＮＡバンド強度のその後の回復を示すＥＭＳＡ。（Ｆ）ＣＤとＥＭＳＡの両方で、データは３回の独立した実験から平均され、プロットしたエラーバーは１標準偏差を示す。

【図１５Ｂ】ＨｉｎｇｅＷは、Ａ－ＦｏｓＷよりも効果的にｃＪｕｎ／ＴＲＥ　ＤＮＡ相互作用をアンタゴナイズする。（Ａ）ＨｉｎｇｅＷが非機能性ヘテロ二量体にｃＪｕｎを隔離するため、試料へのＨｉｎｇｅＷの滴定により逆転される、ｃＪｕｎの付加時の～２８１ｎｍでのＴＲＥ　ＤＮＡピークにおいてシフトを示すＣＤスペクトル。（Ｂ）結合から遊離のＴＲＥまでの相対ピークシフトが、全ての濃度でＨｉｎｇｅＷのより大きなｃＪｕｎ／ＴＲＥ　ＤＮＡ阻害を示すＨｉｎｇｅＷおよびＡ－ＦｏｓＷの濃度を変えるためにプロットする。ｃＪｕｎの添加時に（Ｃ）未結合のＴＲＥ　ＤＮＡバンドシフトおよび（Ｄ）ＨｉｎｇｅＷまたは（Ｅ）Ａ－ＦｏｓＷのいずれかの滴定時の未結合のＤＮＡバンド強度のその後の回復を示すＥＭＳＡ。（Ｆ）ＣＤとＥＭＳＡの両方で、データは３回の独立した実験から平均され、プロットしたエラーバーは１標準偏差を示す。

【図１５ＣＤＥ】ＨｉｎｇｅＷは、Ａ－ＦｏｓＷよりも効果的にｃＪｕｎ／ＴＲＥ　ＤＮＡ相互作用をアンタゴナイズする。（Ａ）ＨｉｎｇｅＷが非機能性ヘテロ二量体にｃＪｕｎを隔離するため、試料へのＨｉｎｇｅＷの滴定により逆転される、ｃＪｕｎの付加時の～２８１ｎｍでのＴＲＥ　ＤＮＡピークにおいてシフトを示すＣＤスペクトル。（Ｂ）結合から遊離のＴＲＥまでの相対ピークシフトが、全ての濃度でＨｉｎｇｅＷのより大きなｃＪｕｎ／ＴＲＥ　ＤＮＡ阻害を示すＨｉｎｇｅＷおよびＡ－ＦｏｓＷの濃度を変えるためにプロットする。ｃＪｕｎの添加時に（Ｃ）未結合のＴＲＥ　ＤＮＡバンドシフトおよび（Ｄ）ＨｉｎｇｅＷまたは（Ｅ）Ａ－ＦｏｓＷのいずれかの滴定時の未結合のＤＮＡバンド強度のその後の回復を示すＥＭＳＡ。（Ｆ）ＣＤとＥＭＳＡの両方で、データは３回の独立した実験から平均され、プロットしたエラーバーは１標準偏差を示す。

【図１５Ｆ】ＨｉｎｇｅＷは、Ａ－ＦｏｓＷよりも効果的にｃＪｕｎ／ＴＲＥ　ＤＮＡ相互作用をアンタゴナイズする。（Ａ）ＨｉｎｇｅＷが非機能性ヘテロ二量体にｃＪｕｎを隔離するため、試料へのＨｉｎｇｅＷの滴定により逆転される、ｃＪｕｎの付加時の～２８１ｎｍでのＴＲＥ　ＤＮＡピークにおいてシフトを示すＣＤスペクトル。（Ｂ）結合から遊離のＴＲＥまでの相対ピークシフトが、全ての濃度でＨｉｎｇｅＷのより大きなｃＪｕｎ／ＴＲＥ　ＤＮＡ阻害を示すＨｉｎｇｅＷおよびＡ－ＦｏｓＷの濃度を変えるためにプロットする。ｃＪｕｎの添加時に（Ｃ）未結合のＴＲＥ　ＤＮＡバンドシフトおよび（Ｄ）ＨｉｎｇｅＷまたは（Ｅ）Ａ－ＦｏｓＷのいずれかの滴定時の未結合のＤＮＡバンド強度のその後の回復を示すＥＭＳＡ。（Ｆ）ＣＤとＥＭＳＡの両方で、データは３回の独立した実験から平均され、プロットしたエラーバーは１標準偏差を示す。

【図１６】ｃＪｕｎ結合ＤＮＡへのＦｏｓＷの添加時のＤＮＡスペクトルにおけるシフト

を示すＣＤアンタゴニズムデータ。ｃＪｕｎ結合ＴＲＥ　ＤＮＡピークから遊離のＴＲＥＤＮＡピークまでの相対シフトは、ＦｏｓＷが順に添加される場合、２８１ｎｍでモニターする。データは、３回の独立した実験から平均した。

【図１７】ＨｉｎｇＷおよびＡ－ＦｏｓＷは、ＴＲＥ　ＤＮＡと相互作用しない。ＴＲＥＤＮＡとＨｉｎｇｅＷまたはＡ－ＦｏｓＷのいずれかの間に相互作用がないことを示すＣＤスペクトル。タンパク質は、この波長範囲で吸収せず、観察されたＣＤシグナルは、ＤＮＡ構造によって生じ、いずれかのタンパク質の添加時に乱されない。

【図１８Ａ】ＨｉｎｇｅＷの段階的Ｎ末端トランケーションは、ｃ－Ｊｕｎ結合およびアンタゴニズムを減少させる。（Ａ）段階的にトランケートしたペプチド（５μＭ）／ｃ－Ｊｕｎ（５μＭ）ヘテロ二量体試料の熱変成プロファイル。（Ｂ）ＤＮＡ特異的ピークにおけるシフトをモニタリングすることにより産生され、ｃＪｕｎ誘導ＤＮＡ結合の直接読み出しを提供するＣＤアンタゴニズムデータ。

【図１８Ｂ】ＨｉｎｇｅＷの段階的Ｎ末端トランケーションは、ｃ－Ｊｕｎ結合およびアンタゴニズムを減少させる。（Ａ）段階的にトランケートしたペプチド（５μＭ）／ｃ－Ｊｕｎ（５μＭ）ヘテロ二量体試料の熱変成プロファイル。（Ｂ）ＤＮＡ特異的ピークにおけるシフトをモニタリングすることにより産生され、ｃＪｕｎ誘導ＤＮＡ結合の直接読み出しを提供するＣＤアンタゴニズムデータ。

【図１９】T_m値は、IC_{50}値と広く相関する。ペプチド－ｃＪｕｎヘテロ二量体（すなわち、二元複合体の形成）T_mが増加すると、直接相関が、低IC_{50}値によって示すように、改善されたｃＪｕｎ／ＴＲＥ　ＤＮＡアンタゴニズム（三元複合体の形成がブロックされるＤＮＡ結合のアンタゴニズム）によって観察される。

【図２０】熱力学パラメーターｃＪｕｎペプチド相互作用を示すＩＴＣデータ。

【図２１】ラクタム化は、血清安定性の増強をもたらす。ＬＣ－ＭＳによって検出されたペプチドの量は、開始点と比較してプロットされ、最高の安定性を示す二重にラクタム化された２４により、直鎖ペプチドがラクタム化よりも早く分解することを示す。

【図２２Ａ】ペプチドのヘリックス性、ｃ－Ｊｕｎ標的結合およびｃ－Ｊｕｎ／ＴＲＥＤＮＡアンタゴニズムを決定するＣＤによって定量されたペプチド最適化。選択されたペプチドの生物物理学的特徴は、模範データおよび最適化プロセスによって観察された効果を例示するために示す。（Ａ）Ｎ末端のトランケートからヘリックス性の増加、Ｃ末端のトランケートからヘリックス性の減少およびラクタム化によるヘリックス性の増加を示す選択されたペプチド（１０μＭ）のスペクトル。（Ｂ）選択されたアンタゴニスト（５μＭ）／ｃＪｕｎ（５μＭ）ヘテロ二量体試料の熱変成プロファイル。（Ｃ）ＨｉｎｇｅＷが非機能性ヘテロ二量体にｃＪｕｎを隔離するため、試料へのＨｉｎｇｅＷの滴定によって回復されるｃＪｕｎの添加時に、～２８１ｎｍでのＴＲＥ　ＤＮＡピークにおけるシフトを示すＣＤスペクトル。（Ｄ）結合から遊離のＴＲＥまでの相対ピークシフトは、様々なペプチド濃度でプロットされる。

【図２２Ｂ】ペプチドのヘリックス性、ｃ－Ｊｕｎ標的結合およびｃ－Ｊｕｎ／ＴＲＥＤＮＡアンタゴニズムを決定するＣＤによって定量されたペプチド最適化。選択されたペプチドの生物物理学的特徴は、模範データおよび最適化プロセスによって観察された効果を例示するために示す。（Ａ）Ｎ末端のトランケートからヘリックス性の増加、Ｃ末端のトランケートからヘリックス性の減少およびラクタム化によるヘリックス性の増加を示す選択されたペプチド（１０μＭ）のスペクトル。（Ｂ）選択されたアンタゴニスト（５μＭ）／ｃＪｕｎ（５μＭ）ヘテロ二量体試料の熱変成プロファイル。（Ｃ）ＨｉｎｇｅＷが非機能性ヘテロ二量体にｃＪｕｎを隔離するため、試料へのＨｉｎｇｅＷの滴定によって回復されるｃＪｕｎの添加時に、～２８１ｎｍでのＴＲＥ　ＤＮＡピークにおけるシフトを示すＣＤスペクトル。（Ｄ）結合から遊離のＴＲＥまでの相対ピークシフトは、様々なペプチド濃度でプロットされる。

【図２２Ｃ】ペプチドのヘリックス性、ｃ－Ｊｕｎ標的結合およびｃ－Ｊｕｎ／ＴＲＥＤＮＡアンタゴニズムを決定するＣＤによって定量されたペプチド最適化。選択されたペプチドの生物物理学的特徴は、模範データおよび最適化プロセスによって観察された効果

を例示するために示す。（Ａ）Ｎ末端のトランケートからヘリックス性の増加、Ｃ末端のトランケートからヘリックス性の減少およびラクタム化によるヘリックス性の増加を示す選択されたペプチド（１０μＭ）のスペクトル。（Ｂ）選択されたアンタゴニスト（５μＭ）／ｃＪｕｎ（５μＭ）ヘテロ二量体試料の熱変成プロファイル。（Ｃ）ＨｉｎｇｅＷが非機能性ヘテロ二量体にｃＪｕｎを隔離するため、試料へのＨｉｎｇｅＷの滴定によって回復されるｃＪｕｎの添加時に、～２８１ｎｍでのＴＲＥ　ＤＮＡピークにおけるシフトを示すＣＤスペクトル。（Ｄ）結合から遊離のＴＲＥまでの相対ピークシフトは、様々なペプチド濃度でプロットされる。

【図２２Ｄ】ペプチドのヘリックス性、ｃ－Ｊｕｎ標的結合およびｃ－Ｊｕｎ／ＴＲＥ　ＤＮＡアンタゴニズムを決定するＣＤによって定量されたペプチド最適化。選択されたペプチドの生物物理学的特徴は、模範データおよび最適化プロセスによって観察された効果を例示するために示す。（Ａ）Ｎ末端のトランケートからヘリックス性の増加、Ｃ末端のトランケートからヘリックス性の減少およびラクタム化によるヘリックス性の増加を示す選択されたペプチド（１０μＭ）のスペクトル。（Ｂ）選択されたアンタゴニスト（５μＭ）／ｃＪｕｎ（５μＭ）ヘテロ二量体試料の熱変成プロファイル。（Ｃ）ＨｉｎｇｅＷが非機能性ヘテロ二量体にｃＪｕｎを隔離するため、試料へのＨｉｎｇｅＷの滴定によって回復されるｃＪｕｎの添加時に、～２８１ｎｍでのＴＲＥ　ＤＮＡピークにおけるシフトを示すＣＤスペクトル。（Ｄ）結合から遊離のＴＲＥまでの相対ピークシフトは、様々なペプチド濃度でプロットされる。

【図２３】ビスアルキル化されたＨｉｎｇｅＷペプチドバリアントの最適化。試験した環状化（ｍＤＢＭＢＷ環状化および０Ｗ環状化）対直鎖Ｈｉｎｇｅ Ｗ（ｍＤＢＭＢＷ直鎖および０Ｗ直鎖）バリアントのｃＪｕｎ誘導ＤＮＡ結合の直接読み出しを提供する、結合から遊離のＴＲＥまでのシフトをモニタリングすることにより産生されたＣＤアンタゴニズムデータ。

【発明を実施するための形態】

【００３５】

本発明の態様および実施形態は、ここで添付の図面を参照して議論される。さらなる態様および実施形態が、当業者に明らかであろう。本文で言及した全ての文章は、参照により本明細書に組み込まれる。

【００３６】

本明細書に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、典型的には、Ｖ［Ｘ$_1$］ＥＥ［Ｘ$_2$］［Ｘ$_3$］ＬＥ［Ｘ$_4$］Ｅのヒンジ領域、より好ましくはＬＶ［Ｘ$_1$］ＥＥ［Ｘ$_2$］［Ｘ$_3$］ＬＥ［Ｘ$_4$］Ｅ（配列番号１）のアミノ酸配列を有する伸長したヒンジ領域；および伸長したヒンジ領域のＣ末端側のロイシンジッパー（ＬＺ）領域を含み、ここで、Ｘ$_1$はＶ、Ｄ、Ｋ、Ｃ、またはＲであり、Ｘ$_2$はＫ、Ｄ、ＣまたはＲであり、Ｘ$_3$はＶ、Ｄ、Ｃ、Ｋ、またはＲであり、Ｘ$_4$はＥ、Ｄ、Ｃ、ＫまたはＲから選択される。ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、本明細書において、‘ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチドとも呼ばれる。

【００３７】

伸長したヒンジ領域

本明細書において、用語「ヒンジ領域」は、１０残基のアミノ酸区間を意味することが意図される。区間内のアミノ酸残基は、酸性（Ｄ／Ｅ）および疎水性残基（Ｖ）であってもよく、場合により、Ｋ残基が存在してもよい。ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストの「ヒンジ領域」は、ｃ－ＪｕｎのＤＢＤドメインとＬＺドメインの両方の「ヒンジ」形成部分に相当するためそのように呼ばれ、したがってｃ－Ｊｕｎのこれらの両ドメインと相互作用することができる。ヒンジ領域の存在は、ｃ－Ｊｕｎを結合する、ならびにそのＤＮＡ結合活性をアンタゴナイズする能力を有するペプチドを提供する。ヒンジ領域の優性負電荷は、ｃ－Ｊｕｎ　ＤＮＡ結合ドメイン（ＤＢＤ）内の正電荷との好ましい相互作用を生じるとも考えられる。

【００３８】

伸長したヒンジ領域は、そのＮ末端部分にヒンジ領域ならびにＬ残基を含む。伸長した

ヒンジ領域は、ＬＶ［Ｘ１］ＥＥ［Ｘ２］［Ｘ３］ＬＥ［Ｘ３］Ｅ（配列番号１）のアミノ酸配列を有し、ここで、Ｘ１はＶ、Ｄ、Ｋ、Ｃ、およびＲから選択され、Ｘ２はＤ、Ｋ、ＣおよびＲから選択され、Ｘ３はＶ、Ｄ、Ｃ、Ｋ、およびＲから選択され、Ｘ４はＥ、Ｄ、Ｃ、ＫおよびＲから選択されうる。一部の実施形態では、Ｘ１はＶ、Ｄ、Ｋ、およびＣから選択され、Ｘ２はＫ、Ｄ、およびＣから選択され、Ｘ３はＶ、Ｄ、またはＣから選択され、Ｘ４はＥ、Ｄ、Ｃ、またはＲから選択される。追加の負に荷電されたアミノ酸残基が、ｃ－Ｊｕｎの正に荷電したＤＢＤとの相互作用を好むと考えられる。本明細書に記載の伸長したヒンジ領域配列のバリアントも検討され、バリアントは、１、２または３アミノ酸改変を含有する。

【００３９】

一部の実施形態では、Ｘ１はＶであり、および／またはＸ３はＶである。一部の実施形態では、Ｘ２はＤであり、Ｘ４はＥである。例えば、伸長したヒンジ領域は、ＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥ（配列番号３１）のアミノ酸配列を含みうる。

【００４０】

他の実施形態では、Ｘ２はＫであり、Ｘ４はＤである。例えば、伸長したヒンジ領域は、ＬＶＶＥＥＫＶＬＥＤＥ（配列番号３２）のアミノ酸配列を含みうる。そのようなアミノ酸配列を使用して、例えば、アンタゴニストのヒンジ領域のｂ－ｆヘプタド位に、ｉからｉ＋４へのＫ－Ｄラクタム架橋を導入することができる。

【００４１】

他の実施形態では、Ｘ１はＫであり、Ｘ３はＤである。例えば、伸長したヒンジ領域は、ＬＶＫＥＥＤＤＬＥＥＥ（配列番号３３）のアミノ酸配列を含みうる。そのようなアミノ酸配列を使用して、例えば、アンタゴニストのヒンジ領域のｆ－ｃヘプタド位に、ｉからｉ＋４へのＫ－Ｄラクタム架橋を導入することができる。

【００４２】

他の実施形態では、Ｘ２はＣであり、Ｘ４はＣである。例えば、伸長したヒンジ領域は、ＬＶＶＥＥＣＶＬＥＣＥ（配列番号３４）のアミノ酸配列を含みうる。そのようなアミノ酸配列を使用して、例えば、アンタゴニストのヒンジ領域のｂ－ｆヘプタド位に、ｉからｉ＋４へのアルキル架橋結合を導入することができる。

【００４３】

他の実施形態では、Ｘ１はＣであり、Ｘ３はＣである。例えば、伸長したヒンジ領域は、ＬＶＣＥＥＤＣＬＥＥＥ（配列番号３５）のアミノ酸配列を含みうる。そのようなアミノ酸配列を使用して、例えば、アンタゴニストのヒンジ領域のｆ－ｃヘプタド位に、ｉからｉ＋４へのアルキル架橋結合を導入することができる。

【００４４】

他の実施形態では、Ｘ１はＣであり、Ｘ４はＣである。例えば、伸長したヒンジ領域は、ＬＶＣＥＥＤＶＬＥＣＥ（配列番号３６）のアミノ酸配列を含みうる。そのようなアミノ酸配列を使用して、例えば、アンタゴニストのヒンジ領域のｆ－ｆヘプタド位に、ｉからｉ＋７へのアルキル架橋結合を導入することができる。

【００４５】

一部の実施形態では、Ｘ１、Ｘ２、Ｘ３、およびＸ４の１つまたは複数は、ＲまたはＫである。一実施形態では、Ｘ４はＲまたはＫである。例えば、伸長したヒンジ領域は、ＬＶＶＥＥＫＶＬＥＲＥ（配列番号７１）のアミノ酸配列を含みうる。以下に説明したように、溶媒曝露位置にアルギニンまたはリジンを導入することは、ペプチドの細胞透過性を増加させうる。

【００４６】

酸性鎖

本発明により、伸長したヒンジ領域は、ＥＡ［Ｘ５］［Ｘ６］（配列番号２）のアミノ酸配列を有するＮ末端酸性鎖をさらに含んでもよく、ここでＸ５はＥ、ＫおよびＣから選択され、Ｘ６はＥ、ＤおよびＣから選択される。一部の実施形態では、Ｘ６はＥおよびＤから選択される（例えば、Ｘ６はＥである）。

【００４７】
Ｎ末端酸性鎖は、静電反発力を産生し、有利には、ホモ二量体化するペプチドの傾向を減少させ、それにより、ペプチドアンタゴニストをｃ－Ｊｕｎとのヘテロ二量体化により利用可能にすると考えられる。酸性鎖のＮ末端ドメインにわたる負電荷は、ｃ－Ｊｕｎ ＤＢＤの正電荷とよく作用する。
【００４８】
一部の実施形態では、X_1（伸長したヒンジ領域中）はＤであり、X_5（酸性鎖中）はＫである。そのようなアミノ酸配列を使用して、例えば、アンタゴニストの酸性鎖（ヘプタド位値ｂ）およびヒンジ領域（ヘプタド位置ｆ）にわたる、ｉからｉ＋４へのＫ－Ｄラクタム架橋を導入することができる。
【００４９】
一部の実施形態では、X_1（伸長したヒンジ領域中）はＣであり、X_5（酸性鎖中）はＣである。そのようなアミノ酸配列を使用して、例えば、アンタゴニストの酸性鎖（ヘプタド位置ｂ）およびヒンジ領域（ヘプタド位置ｆ）にわたる、ｉからｉ＋４へのアルキル架橋結合を導入することができる。
【００５０】
本発明により、酸性鎖は、ＥＡＥＥ（配列番号３）のアミノ酸配列を有しうる。このアミノ酸配列は、ヘリックス性を誘導し、分子の双極子を安定化すると考えられる。ＥＡＥＥ配列のさらなる利点は、その２つの中心残基ＡＥが、ｃＪｕｎ上のＤＮＡとの相互作用に相当する位置で生じ、それによりｃ－ＪｕｎとＤＮＡの間に直接ブロックを形成することである。
【００５１】
ＬＺ領域
本発明のアンタゴニストのＬＺ領域は、ヒンジ領域のＣ末端に位置し、ｃ－Ｊｕｎのロイシンジッパーと相互作用することができる。
【００５２】
本発明により、ＬＺ領域は、
ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＥＤＬＱＫＱ（配列番号４）；
ＩＥＱＬＥＥＫＮＫＡＬＫＤＥＩＥＤＬＱＫＱ（配列番号５）；
ＩＫＱＬＥＤＲＮＹＡＬＲＫＥＩＥＤＬＱＫＱ（配列番号６）；
ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＫＤＬＱＤＱ（配列番号７）；
ＩＥＱＬＥＥＫＮＫＡＬＫＤＥＩＥＤＬＹ（配列番号８）；および
ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＥＤＬＱ（配列番号９）、
またはこれらのバリアントからなる群から選択されるアミノ酸配列を含みうるかまたはこれらからなりうる。バリアントは、１つまたは複数のアミノ酸改変を含みうる。例えば、バリアントは、１、２、３、４、または５アミノ酸改変を含みうる。例えば、バリアントは、１、２または３アミノ酸改変を含む。
【００５３】
一部の実施形態では、ＬＺ領域は、ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＫＤＬＱＤＱ（配列番号７）、または１、２、もしくは３改変を含むバリアントのアミノ酸配列を含むかまたはこれらからなる。一部の実施形態では、バリアントの配列番号７の１６位（ヘプタドのｂ位）および２０位（同じヘプタドのｆ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、それぞれＫおよびＤアミノ酸残基である（すなわち、アミノ酸改変（複数可）は、配列番号７の１６および２０に相当する位置以外の位置である）。
【００５４】
一部の実施形態では、ＬＺ領域は、ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＣＤＬＱＣＱ（配列番号２７）、または１、２、もしくは３改変を含むバリアントのアミノ酸配列を含むかまたはこれらからなる。一部の実施形態では、バリアントの配列番号２７の１６位（ヘプタドのｂ位）および２０位（同じヘプタドのｆ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、両方ともＣアミノ酸残基である（すなわち、アミノ酸改変（複数可）は、配列番号２７の１

６および２０に相当する位置以外の位置である）。
【００５５】
一部の実施形態では、ＬＺ領域は：
ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲ［X_7］Ｅ［X_8］Ｋ［X_9］Ｌ［X_{10}］Ｄ［X_{11}］（配列番号２９）または
ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲ［X_7］Ｅ［X_8］Ｃ［X_9］Ｌ［X_{10}］Ｃ［X_{11}］（配列番号３０）
｛ここで、
［X_7］はＫ、Ｌ、Ｓ、Ｗ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｍ、Ｔ、Ｖ、Ａ、Ｅ、またはＧであり；
［X_8］はＩ、Ｖ、またはＬであり；
［X_9］および［X_{10}］は任意のアミノ酸残基であり；
［X_{11}］はＱ、Ｅ、またはＫである｝
を含む。
【００５６】
一部の実施形態では、ＬＺ領域は：
ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＳＥＩＣＳＬＱＣＱ（配列番号６６）；または
ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＣＥＬＳＣＱ（配列番号６７）；または
ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＡＥＩＣＮＬＳＣＱ（配列番号６８）；または
ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＴＥＩＣＳＬＭＣＫ（配列番号６９）；または
ＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＡＥＩＣＳＬＱＣＱ（配列番号７０）
を含む。
【００５７】
そのようなＬＺ領域は、以下により詳細に説明するように、ビスアルキル化に好適である。
一部の実施形態では、ＬＺ領域は、ＬＺ領域のヘプタドのｂ、ｃ、および／またはｆ位に１つまたは複数のリジン（複数可）および／またはアルギニン（複数可）を含む。一部の実施形態では、リジン（複数可）またはアルギニン（複数可）は、架橋結合を導入するために使用される位置以外の位置に位置する（例えば、ラクタム架橋またはビスアルキル化）。以下により詳細に記載するように、αヘリックスペプチドの溶媒曝露表面への正に荷電したアミノ酸の導入は、細胞透過性を改善しうる。
【００５８】
したがって、一部の実施形態では、ＬＺ領域は、ＩＲＲＬＥＲＲＮＲＡＬＲＫＥＩＫＤＬＱＤＱ（配列番号７４）、または１、２、もしくは３改変を含むバリアントのアミノ酸配列を含むかまたはこれらからなる。一部の実施形態では、バリアントの配列番号７４の１６位（ヘプタドのｂ位）および２０位（同じヘプタドのｆ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、それぞれＫおよびＤアミノ酸残基である（すなわち、アミノ酸改変（複数可）は、配列番号７４の１６および２０に相当する位置以外の位置である）。一部の実施形態では、バリアントの配列番号７４の２位（ヘプタドのｂ位）および３位（同じヘプタドのｃ位）および９位（ヘプタドのｂ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、ＫまたはＲである（場合によりＲ）（すなわち、アミノ酸改変（複数可）は、配列番号７４の２、３および９に相当する位置以外の位置である）。一部の実施形態では、アミノ酸改変（複数可）は、配列番号７４の２、３、９、１６および２０に相当する位置以外の位置である。
【００５９】
他の実施形態では、ＬＺ領域は、ＩＥＲＬＥＲＲＮＹＲＬＲＲＥＩＫＤＬＱＤＱ（配列番号７５）、または１、２、もしくは３改変を含むバリアントのアミノ酸配列を含むかまたはこれらからなる。一部の実施形態では、バリアントの配列番号７５の１６位（ヘプタドのｂ位）および２０位（同じヘプタドのｆ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、それぞれＫおよびＤアミノ酸残基である（すなわち、アミノ酸改変（複数可）は、配列番号７５の１６および２０に相当する位置以外の位置である）。一部の実施形態では、バリアントの配列番号７５の３位（ヘプタドのｃ位）、１０位（ヘプタドのｃ位）および１３位（

ヘプタドのｆ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、ＫまたはＲである（場合によりＲ）（すなわち、アミノ酸改変（複数可）は、配列番号７５の３、１０および１３に相当する位置以外の位置である）。一部の実施形態では、アミノ酸改変（複数可）は、配列番号７５の３、１０、１３、１６および２０位に相当する位置以外の位置である。

【００６０】

アンタゴニストおよび特性

本明細書に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、ペプチド性であり、ＤまたはＬ形態でありうる。本明細書において使用される「ペプチド性」は、ペプチド結合によって連結されたアミノ酸の直鎖から構成されるかまたはそれを含む化合物を含み、任意のペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質であってもよい。ペプチドアンタゴニストを形成するアミノ酸残基は、ＤもしくはＬ形態アミノ酸残基、または両方の混合物から構成されてもよい。本明細書では、ペプチド化合物は、典型的にはペプチドと呼ばれる。

【００６１】

本明細書に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、他のポリペプチドおよび／または細胞成分など、夾雑物がないという意味で、単離されうる。

本明細書に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、遊離形態、または任意の薬理学的に許容される塩形態、例えば酸性塩、金属塩、アルカリ土類金属塩、またはアミン塩の形態でありうる。

【００６２】

ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、１０アミノ酸残基長と１００アミノ酸残基長の間でありうる。ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、７０アミノ酸長未満、好ましくは６０アミノ酸長未満、より好ましくは５５アミノ酸長未満、さらにより好ましくは５０アミノ酸長未満、さらにより好ましくは４５アミノ酸長未満、さらにより好ましくは４０アミノ酸長未満でありうる。ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、３０アミノ酸残基長と７０アミノ酸残基長の間、３０アミノ酸残基長と６０アミノ酸残基長の間、３０アミノ酸残基長と５０アミノ酸残基長の間、または３０アミノ酸残基長と４０アミノ酸残基長の間でありうる。例えば、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７アミノ酸の長さを有しうる。ある特定の実施形態では、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、３６アミノ酸の長さを有する。

【００６３】

ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、ＨｉｎｇｅＷペプチド、またはそのバリアントでありうる。ＨｉｎｇｅＷペプチドは、ＬＥＱＲＡＥＥＬＡＲＥＮＥＥＬＥＫＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＥＤＬＱＫＱＬＥＫＬ（配列番号１２）のアミノ酸配列を含む。

【００６４】

ＨｉｎｇｅＷペプチドは、以下の１つまたは複数をさらに含みうる：Ｎ末端のＭＡＳ、Ｃ末端のＧＡＰ、およびＣ末端の６×Ｈｉｓタグ（ＨＨＨＨＨＨ）（配列番号５３）。本明細書に記載するように、ＨｉｎｇｅＷペプチドは、高親和性で標的ｃ－Ｊｕｎタンパク質に結合し、ｃ－ＪｕｎのＤＮＡ結合機能をアンタゴナイズすることが実証され、したがってｃ－Ｊｕｎの機能的アンタゴニストであることが実証された。

【００６５】

ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、ＨｉｎｇｅＷペプチドのトランケート形態、またはそのバリアントでありうる。本明細書に記載するように、様々なトランケートＨｉｎｇｅＷペプチドが開発され、ＨｉｎｇｅＷの機能的アンタゴニストであることが実証された。これらのトランケート形態の機能的アンタゴニズムは、ＨｉｎｇｅＷペプチドと比較して減少されるが、トランケートペプチドは、全長ＨｉｎｇｅＷペプチドと比較してより薬物様特徴を示すと考えられ、これらのトランケート形態が、ｃ－Ｊｕｎ機能をアンタゴナイズするための有効な治療候補も提示することも示している。

【００６６】

本明細書において使用する場合、ｃ－Ｊｕｎの「機能的アンタゴニスト」は、ｃ－Ｊｕｎに結合することができ、そのＤＮＡ結合活性を阻害するペプチド化合物である。機能的アンタゴニストペプチドを同定する方法は、実施例１に記載のＴｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ｂｌｏｃｋ Ｓｕｒｖｉｖａｌ（ＴＢＳ）アッセイを含む。簡潔に言うと、ＴＢＳでは、必須遺伝子ジヒドロ葉酸還元酵素（ＤＨＦＲ）のコード領域を変異してＴＲＥ部位を導入し、大腸菌内のこの遺伝子へのｃ－Ｊｕｎの導入が細胞増殖を抑止する転写ブロックをもたらす。ＴＲＥ部位に結合したｃ－Ｊｕｎ分子は、必須遺伝子を転写するＲＮＡポリメラーゼを立体的に防ぎ、これは、有効なｃ－Ｊｕｎ／ＴＲＥアンタゴニストの導入時にのみ回復されうる。結果として、特定の細胞の生存は、ペプチドライブラリーメンバーの能力によって制御され、ｃ－Ｊｕｎの転写ブロックを除去し、したがって、ＤＨＦＲ活性を回復する。したがって、ＴＢＳは、治療的に価値のある配列の同定を促進する。ＴＢＳアッセイのさらなる詳細は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、ＷＯ２０２０１２８０１５に提供される。

【００６７】

ｃ－Ｊｕｎのアンタゴニズムを決定する他の方法は、実施例２に記載するように、円二色性（ＣＤ）アッセイを含む。簡潔に言うと、このアッセイは、ペプチドおよびＴＲＥ－ＤＮＡ構築物（ＧＴＣＡＧＴＣＡＧＴＧＡＣＴＣＡＡＴＣＧＧＴＣＡ）（配列番号５１）を含有する試料を調製するステップ、および２６５～３２０ｎｍの間のシグナルを測定するステップを含む。ＴＲＥ－ＤＮＡ構築物は、～２８１ｎｍで正のＣＤピークを産生し、その強度はｃ－Ｊｕｎ結合時に減少する。ペプチドがｃ－Ｊｕｎ ＤＮＡ結合活性をアンタゴナイズすることができる場合、ペプチドの濃度の増加は、遊離のＴＲＥ－ＤＮＡピークへとピークをシフトし戻すであろう。したがって、ピークシフトは、ｃ－Ｊｕｎ ＤＮＡ結合をアンタゴナイズするペプチドの能力を定量するために使用されうる。この方法は、ヒル式へと滴定データをフィットすることによってIC_{50}値の算出を可能にする。

【００６８】

一部の実施形態では、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、ｃ－ＪｕｎのＤＮＡ結合活性を阻害するＨｉｎｇｅＷの能力の１０倍以内に、ｃ－ＪｕｎのＤＮＡ結合活性を阻害することができる（例えば、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、ＨｉｎｇｅＷのために決定したものの１０倍以内であるｃ－ＪｕｎのＤＮＡ結合活性を阻害する能力が減少する）。一部の実施形態では、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、ｃ－ＪｕｎのＤＮＡ結合活性を阻害するＨｉｎｇｅＷの能力の９倍以内、好ましくは８倍以内、より好ましくは７倍以内、さらにより好ましくは６倍以内、さらにより好ましくは５倍以内にｃ－ＪｕｎのＤＮＡ結合活性を阻害することができる。ＤＮＡ結合活性を阻害するｃ－ＪｕｎアンタゴニストおよびＨｉｎｇｅＷの能力は、ＴＢＳアッセイを使用して（例えば、コロニーの数を定量することにより）または本明細書に記載の円二色性アッセイを使用してIC_{50}を決定することにより測定されうる。場合により、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、架橋結合された場合この活性を有しうる。ペプチドを架橋結合する方法は、以下により詳細に記載される。

【００６９】

一部の実施形態では、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、以下のアミノ酸配列：
ＬＥＱＲＡＥＥＬＡＲＥＮＥＥＬＥＫＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＥＤＬＱＫＱＬＥＫＬ（配列番号１２）；
ＬＡＲＥＮＥＥＬＥＫＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＥＤＬＱＫＱＬＥＫＬ（配列番号１３）；
ＬＥＫＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＥＤＬＱＫＱＬＥＫＬ（配列番号１４）；
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＥＤＬＱＫＱＬＥＫＬ（配列番号１５）；
ＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＫＮＫＡＬＫＤＥＩＥＤＬＱＫＱＬＥＫＬＹ（配列番号１６）；
ＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＥＤＬＱＫＱＬＥＤＬ（配列番

号１７）；
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＥＤＬＱＫＱ（配列番号１８）；
ＫＥＡＥＤＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＫＤＬＱＤＱ（配列番号１９）；
ＥＡＫＥＬＶＤＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＥＤＬＱＫＱ（配列番号２０）；
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＫＶＬＥＤＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＥＤＬＱＫＱ（配列番号２１）；
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＫＱＬＥＤＲＮＹＡＬＲＫＥＩＥＤＬＱＫＱ（配列番号２２）；
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＫＮＫＡＬＫＤＥＩＥＤＬＱＫＱＹ（配列番号２３）；
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＫＤＬＱＤＱ（配列番号１０）；
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＫＶＬＥＤＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＫＤＬＱＤＱ（配列番号１１）；
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＥＤＬ（配列番号２４）；
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＫＮＫＡＬＫＤＥＩＥＤＬＹ（配列番号２５）；
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＥＤＬＱ（配列番号２６）；
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＣＤＬＱＣＱ（配列番号２８）；
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＳＥＩＣＳＬＱＣＱ（配列番号３７）；
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＣＥＬＳＣＱ（配列番号３８）；
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＡＥＩＣＮＬＳＣＱ（配列番号３９）；
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＴＥＩＣＳＬＭＣＫ（配列番号４０）；
またはＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＡＥＩＣＳＬＱＣＱ（配列番号４１）；
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＫＶＬＥＲＥＩＲＲＬＥＲＲＮＲＡＬＲＫＥＩＫＤＬＱＤＱ（配列番号７２）；または
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＫＶＬＥＤＥＩＥＲＬＥＲＲＮＹＲＬＲＲＥＩＫＤＬＱＤＱ（配列番号７３）、
または１、２もしくは３アミノ酸改変を含むこれらのバリアントのうちのいずれか１つを含むかこれらからなり、場合により、１、２または３アミノ酸改変はＬＺ領域存在する。

【００７０】

本明細書に記載されるように、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストアミノ酸配列は、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストへと共有結合性のｉからｉ＋４への架橋剤（複数可）またはｉからｉ＋７への架橋剤（複数可）を導入するために改変されうる。共有結合性のｉからｉ＋４へのアミノ酸架橋剤（複数可）は、Ｋ－Ｄラクタム架橋（複数可）、または２つのＣ残基の間に形成されたアルキル架橋結合（システインアルキル化）でありうる。好ましくは、ｉからｉ＋４へのアミノ酸残基架橋結合は、ヘリックスの結合表面の破壊を防ぐために、溶媒曝露されるｂ－ｆ（１つのヘプタド内）またはｆ－ｃ（２つのヘプタドにわたる）ヘプタド位に導入される。本明細書では、ヘプタド番号は、ヘプタドリピート内の特定のアミノ酸

残基の位置を指し、７アミノ酸の反復パターンからなる構造モチーフである。ヘプタドリピートの位置は、小文字ａからｇ、典型的にはａｂｃｄｅｆｇによって一般に示される。以下の表５は、ヘプタド番号がどのようにＨｉｎｇｅＷアミノ酸配列に相当するか示す。

【００７１】

したがって、本明細書では、アミノ酸配列ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＥＤＬＱＫＱ（配列番号１８）の改変バージョンを含むｃ－Ｊｕｎアンタゴニストを提供し、改変は、以下：

（ｉ）配列番号１８の３位（ヘプタドのｂ位）および７位（同じヘプタドのｆ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、それぞれＫおよびＤアミノ酸残基であるか、または両方ともＣアミノ酸残基である；

（ｉｉ）配列番号１８の１０位（ヘプタドのｂ位）および１４位（同じヘプタドのｆ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、それぞれＫおよびＤアミノ酸残基であるか、または両方ともＣアミノ酸残基である；

（ｉｉｉ）配列番号１８の１７位（ヘプタドのｂ位）および２１位（同じヘプタドのｆ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、それぞれＫおよびＤアミノ酸残基であるか、または両方ともＣアミノ酸残基である；

（ｉｖ）配列番号１８の２４位（ヘプタドのｂ位）および２８位（同じヘプタドのｆ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、それぞれＫおよびＤアミノ酸残基であるか、または両方ともＣアミノ酸残基である；ならびに

（ｖ）配列番号１８の３１位（ヘプタドのｂ位）および３５位（同じヘプタドのｆ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、それぞれＫおよびＤアミノ酸残基であるか、または両方ともＣアミノ酸残基である；

の１つまたは複数（例えば、１つまたは２つ）、または、記載した位置の外側（すなわち、各ヘプタドのｂおよびｆ位の外側）に１、２、３または４アミノ酸改変を含むこれらのバリアントを含む。

【００７２】

本明細書では、アミノ酸配列ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＥＤＬＱＫＱ（配列番号１８）の改変バージョンを含むｃ－Ｊｕｎアンタゴニストも提供し、改変は、以下：

（ｉ）配列番号１８の７位（ヘプタドのｆ位）および１１位（続くヘプタドのｃ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、それぞれＫおよびＤアミノ酸残基であるか、または両方ともＣアミノ酸残基である；

（ｉｉ）配列番号１８の１４位（ヘプタドのｆ位）および１８位（続くヘプタドのｃ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、それぞれＫおよびＤアミノ酸残基であるか、または両方ともＣアミノ酸残基である；

（ｉｉｉ）配列番号１８の２１位（ヘプタドのｆ位）および２５位（次のヘプタドのｃ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、それぞれＫおよびＤアミノ酸残基であるか、または両方ともＣアミノ酸残基である；ならびに

（ｉｖ）配列番号１８の２８位（ヘプタドのｆ位）および３２位（続くヘプタドのｃ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、それぞれＫおよびＤアミノ酸残基であるか、または両方ともＣアミノ酸残基である；

の１つまたは複数（例えば、１つまたは２つ）、または、記載した位置の外側（すなわち、１つのヘプタドのｆ位および続くヘプタドのｃ位の外側）に１、２、３または４アミノ酸改変を含むこれらのバリアントを含む。

【００７３】

アミノ酸配列がｃ－Ｊｕｎアンタゴニストへとｉからｉ＋７への架橋剤（複数可）を導入するために改変されたｃ－Ｊｕｎアンタゴニストも提供する。共有結合性のｉからｉ＋７へのアミノ酸架橋剤（複数可）は、２つのＣ残基の間に形成されたアルキル架橋結合（システインアルキル化）でありうる。好ましくは、ｉからｉ＋７へのアミノ酸残基架橋結合は、溶媒曝露されるｂ－ｂ、ｃ－ｃまたはｆ－ｆ（２つのヘプタドにわたる）ヘプタド

位に導入される。
【００７４】
したがって、本明細書では、アミノ酸配列ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＥＤＬＱＫＱ（配列番号１８）の改変バージョンを含むｃ－Ｊｕｎアンタゴニストを提供し、改変は、以下：
（ｉ）配列番号１８の３位（ヘプタドのｂ位）および１０位（続くヘプタドのｂ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、両方ともＣアミノ酸残基である；
（ｉｉ）配列番号１８の１０位（ヘプタドのｂ位）および１７位（続くヘプタドのｂ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、両方ともＣアミノ酸残基である；
（ｉｉｉ）配列番号７の１７位（ヘプタドのｂ位）および２４位（続くヘプタドのｂ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、両方ともＣアミノ酸残基である；
（ｉｖ）配列番号７の２４位（ヘプタドのｂ位）および３１位（続くヘプタドのｂ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、両方ともＣアミノ酸残基である；
（ｖ）配列番号１８の４位（ヘプタドのｃ位）および１１位（続くヘプタドのｃ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、両方ともＣアミノ酸残基である；
（ｖｉ）配列番号１８の１１位（ヘプタドのｃ位）および１８位（続くヘプタドのｃ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、両方ともＣアミノ酸残基である；
（ｖｉｉ）配列番号１８の１８位（ヘプタドのｃ位）および２５位（続くヘプタドのｃ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、両方ともＣアミノ酸残基である；
（ｖｉｉｉ）配列番号１８の２５位（ヘプタドのｃ位）および３２位（続くヘプタドのｃ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、両方ともＣアミノ酸残基である；
（ｉｘ）配列番号１８の７位（ヘプタドのｆ位）および１４位（続くヘプタドのｆ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、両方ともＣアミノ酸残基である；
（ｘ）配列番号１８の１４位（ヘプタドのｆ位）および２１位（続くヘプタドのｆ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、両方ともＣアミノ酸残基である；
（ｘｉ）配列番号１８の２１位（ヘプタドのｆ位）および２８位（続くヘプタドのｆ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、両方ともＣアミノ酸残基である；ならびに
（ｘｉｉ）配列番号１８の２８位（ヘプタドのｆ位）および３５位（続くヘプタドのｆ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、両方ともＣアミノ酸残基である；
の１つまたは複数（例えば、１つまたは２つ）、または、記載した位置の外側（すなわち、したがって、ｂ、ｃまたはｆ位の外側）に１、２、３または４アミノ酸改変を含むこれらのバリアントを含む。
【００７５】
好ましい実施形態では、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＥＤＬＱＫＱＬＥＫＬ（配列番号１５）；
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＥＤＬＱＫＱ（配列番号１８）；
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＫＤＬＱＤＱ（配列番号１０）；
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＫＶＬＥＤＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＫＤＬＱＤＱ（配列番号１１）；または
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＣＤＬＱＣＱ（配列番号２８）、
または、１、２もしくは３アミノ酸改変を含むこれらのバリアントのアミノ酸配列を含むかこれらからなり、場合により、１、２または３アミノ酸改変はＬＺ領域に存在する。
【００７６】
より好ましい実施形態では、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＫＤＬＱＤＱ（配列番号１０）；

ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＫＶＬＥＤＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＫＤＬＱＤＱ（配列番号１１）；または
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＣＤＬＱＣＱ（配列番号２８）、
または、１、２もしくは３アミノ酸改変を含むこれらのバリアントのアミノ酸配列を含むかこれらからなり、場合により、１、２または３アミノ酸改変はＬＺ領域に存在する。
【００７７】
例えば、ｃ－ＪｕｎアンタゴニストがＫ－Ｄラクタム架橋を含む実施形態では、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは：
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＫＤＬＱＤＱ（配列番号１０）
または、１、２もしくは３アミノ酸改変を含むそのバリアントのアミノ酸配列を含むかこれらからなり、場合により、１、２または３アミノ酸改変はＬＺ領域に存在し、さらに場合により、バリアントの配列番号１０の３１位（ヘプタドのｂ位）および３５位（ヘプタドのｆ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、それぞれＫおよびＤアミノ酸残基である。
【００７８】
別の例として、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストが２つのＫ－Ｄラクタム架橋を含む実施形態では、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＫＶＬＥＤＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＫＤＬＱＤＱ（配列番号１１）
または、１、２もしくは３アミノ酸改変を含むそのバリアントのアミノ酸配列を含むかこれらからなり、場合により、１、２または３アミノ酸改変はＬＺ領域に存在し、
さらに場合により、バリアントの配列番号１１の１０位（第１のヘプタドのｂ位）および１４位（第１のヘプタドのｆ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、それぞれＫおよびＤアミノ酸残基であり、バリアントの配列番号１１の３１位（第２のヘプタドのｂ位）および３５位（第２のヘプタドのｆ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、それぞれＫおよびＤアミノ酸残基である。
【００７９】
別の例として、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストがアルキル架橋結合を含む実施形態では、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＣＤＬＱＣＱ（配列番号２８）
または、１、２もしくは３アミノ酸改変を含むそのバリアントのアミノ酸配列を含むかこれらからなり、場合により、１、２または３アミノ酸改変はＬＺ領域に存在し、さらに場合により、バリアントの配列番号２８の３１位（ヘプタドのｂ位）および３５位（同じヘプタドのｆ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、両方ともＣアミノ酸残基である。
【００８０】
別の例として、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストがアルキル架橋結合を含む実施形態では、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは：
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＳＥＩＣＳＬＱＣＱ（配列番号３７）；または
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＣＥＬＳＣＱ（配列番号３８）；または
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＡＥＩＣＮＬＳＣＱ（配列番号３９）；または
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＴＥＩＣＳＬＭＣＫ（配列番号４０）；または
ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＡＥＩＣＳＬＱＣＱ（配列番号４１）
または、１、２もしくは３アミノ酸改変を含むこれらのバリアントのアミノ酸配列を含む

かこれらからなり、場合により、アミノ酸改変はＬＺ領域に存在する。
【００８１】
アミノ酸改変は、挿入、置換、または欠失であってもよい。一部の実施形態では、アミノ酸改変は、任意の他のアミノ酸残基へのアミノ酸残基の置換である。置換されたアミノ酸残基は、ＤまたはＬ形態であってもよく、天然に存在するアミノ酸残基または天然に存在しないアミノ酸残基であってもよい。
【００８２】
天然に存在する残基は、共通の側鎖特性に基づき、クラスに分けられうる：
１）非極性、脂肪性（疎水性）：グリシン（Ｇ）、メチオニン（Ｍ）、アラニン（Ａ）、バリン（Ｖ）、ロイシン（Ｌ）、イソロイシン（Ｉ）；
２）極性、非電荷：システイン（Ｃ）、セリン（Ｓ）、スレオニン（Ｔ）、アスパラギン（Ｎ）、グルタミン（Ｑ）、プロリン（Ｐ）；
３）酸性（負電荷）；アスパラギン酸（Ｄ）、グルタミン酸（Ｅ）；
４）塩基性（正電荷）；ヒスチジン（Ｈ）、リジン（Ｋ）、アルギニンＩ；
５）芳香族；トリプトファン（Ｗ）、チロシン（Ｙ）、フェニルアラニン（Ｆ）。
【００８３】
アミノ酸置換は、保存アミノ酸置換でありうる。保存アミノ酸置換は、これらのクラスの１つのメンバーの同じクラスの別のメンバーとの交換を含みうる。例えば、保存アミノ酸置換は、酸性アミノ酸アスパラギン酸（Ｄ）の酸性アミノ酸グルタミン酸（Ｅ）の置換でありうる。
【００８４】
アミノ酸置換（例えば、保存アミノ酸置換）は、典型的には、生物系での合成によるよりも化学ペプチド合成によって組み込まれる、天然に存在しないアミノ酸残基を包含しうる。好適な非自然アミノ酸は、３－シクロヘキシルアラニン（Ｃｈａ）、ノルロイシン（ＮＬｅ）およびオルニチン（Ｏｒｎ）を含む。非自然アミノ酸の他の例は、シトルリン（Ｃｉｔ）、ヒドロキシプロリン（Ｈｙｐ）、３－ニトロチロシン、ニトロアルギニンナフチルアラニン（Ｎａｌ）、Ａｂｕ、ＤＡＢ、メチオニンスルホキシドおよびメチオニンスルホンを含む。
【００８５】
一部の実施形態では、アミノ酸改変は、ペプチドの疎水性および荷電表面パッチの導入をもたらす。疎水性および荷電表面パッチは、Ｐｅｒｒｙ ｅｔ ａｌ．，２０１８の例に記載されるように、疎水性および／または正に荷電したアミノ酸残基（例えば少なくとも３連続残基）のクラスターを挿入することによって導入されうる。例えば、本明細書に記載のアミノ酸改変は、リジンまたはロイシンのいずれかである少なくとも３連続アミノ酸残基を含有するｃ－Ｊｕｎアンタゴニストを産生しうる（例えば、伸長したヒンジ領域および／またはロイシン領域）。
【００８６】
架橋結合されるｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、任意のアミノ酸改変（例えば、置換）が、典型的には、架橋結合に使用されている関連位置の外側に位置する。すなわち、ｂ－ｆ（１つのヘプタド中）アミノ酸残基架橋結合を含むアンタゴニストは、アミノ酸改変（複数可）がそのヘプタド内のａ、ｃ、ｄ、ｅまたはｇ位でありうる。同様に、ｆ－ｃ（２つのヘプタドにわたる）アミノ酸残基架橋結合を含むアンタゴニストは、アミノ酸改変（複数可）が第１のヘプタド内のａ、ｂ、ｃ、ｄ、またはｅ位および第２のヘプタド内のａ、ｂ、ｄ、ｅ、ｆまたはｇ位のいずれかでありうる。
【００８７】
αヘリックスペプチドの溶媒曝露された表面への正に荷電したアミノ酸の導入が、細胞透過性を改善することは、当技術分野で公知である（例えば、Ｓｍｉｔｈ ｅｔ ａｌ．，２００８およびＰｅｒｒｙ ｅｔ ａｌ．，２０１８を参照）。これは、Ｓｍｉｔｈ ｅｔ ａｌ．，２００８に記載されるように、細胞透過性を促進することが公知のアルギニン置換パターンを生成するために特定の位置でのアルギニン残基の導入によって

達成されうる。

【００８８】

したがって、一部の実施形態では、本明細書に記載のペプチドは、１つまたは複数のアルギニンまたはリジン置換を含む。一部の実施形態では、伸長したヒンジ領域および／またはＬＺ領域は、１つまたは複数のアルギニンまたはリジン改変を含み、すなわち、アルギニンまたはリジン置換パターンは本明細書に記載のペプチドに導入されうる。一部の実施形態では、これらのアルギニン改変は、ヘプタドｂ、ｃ、および／またはｆ位、すなわち、α－ヘリックスペプチドの溶媒曝露された表面上に位置する。

【００８９】

一部の実施形態では、本明細書に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチドは、配列番号１１に記載のアミノ酸配列の改変バージョンを含み、改変は、以下：

（ｉ）１４位（ヘプタドのｆ位）、１７位（ヘプタドのｂ位）、１８位（ヘプタドのｃ位）、２４位（ヘプタドのｂ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、ＫまたはＲ残基（場合によりＲ）である。例えば、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチドは、アミノ酸配列ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＫＶＬＥＲＥＩＲＲＬＥＲＲＮＲＡＬＲＫＥＩＫＤＬＱＤＱ（配列番号７２）を有しうる；または

（ｉｉ）１８位（ヘプタドのｃ位）、２５位（ヘプタドのｃ位）、２８位（ヘプタドのｆ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、ＫまたはＲ残基（場合によりＲ）である。例えば、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、アミノ酸配列ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＫＶＬＥＤＥＩＥＲＬＥＲＲＮＹＲＬＲＲＥＩＫＤＬＱＤＱ（配列番号７３）を有しうる；

の１つまたは複数（例えば、１つまたは２つ）、または記載した位置の外側に１、２、３または４アミノ酸改変を含むこれらのバリアントを含む。場合により、バリアントの配列番号７２または７３の３１位（ヘプタドのｂ位）および３５位（ヘプタドのｆ位）に相当する位置のアミノ酸残基は、それぞれＫおよびＤアミノ酸残基である（すなわち、アミノ酸改変（複数可）は、配列番号７２の１４、１７、１８、３１および３５位に相当する位置以外の位置、または配列番号７３の１８、２５、２８、３１および３５位に相当する位置以外の位置である）。

【００９０】

あるいはまたはさらに、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、配列番号１２～２６の１つに特定の程度の配列同一性を有するアミノ酸配列を有しうる。特定の程度の配列同一性は、少なくとも６０％から１００％の配列同一性でありうる。より好ましくは、特定の程度の配列同一性は、少なくとも６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一性のうちの１つでありうる。

【００９１】

アンタゴニストの産生

本明細書に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチドは、当技術分野で標準である合成または組換え技術を使用して提供されうる。都合良く、本明細書に記載のｃ－Ｊｕｎペプチドは、固相合成によって産生されうる。ペプチドは、典型的には、Ｃ末端からＮ末端への段階的な固相合成によって合成される。最初のステップでは、Ｎ保護アミノ酸は、そのカルボニル基を介して不溶性固体支持体へと共有結合される。アミノ酸を保護するＮの好適な基は、９－フルオロメチルオキシカルボニル基（Ｆｍｏｃ）およびｔ－ブチルオキシカルボニル（Ｂｏｃ）を含む。Ｎ保護アミノ酸の共有結合後、Ｎ保護基は除去および脱保護され、結合したアミノ酸のNH_2基は次のＮ保護アミノ酸のカルボン酸基と反応され、固相へと共有結合される２アミノ酸を含む新生ペプチドを生成する。このプロセスは、完全なペプチド配列が固相上に構築されるまで繰り返される。一部の実施形態では、保護基を用い、アミノ酸の側鎖の官能基の新しいＮ保護アミノ酸との反応を防止しうる。これらの側鎖保護基は、ペプチドの合成を通して存在し、最終脱保護ステップで除去されうる。

【００９２】

ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチドを産生する方法は、固相または液相ペプチド合成に

よって配列番号１を含むペプチドを合成するステップを含みうる。
固相ペプチド合成の方法は、当技術分野で確立されている（例えば、Ｃｏｉｎ ｅｔ ａｌ Ｎａｔｕｒｅ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ２，３２４７－３２５６（２００７）Ｓｔａｗｉｋｏｗｓｋｉ（２００２）Ｃｕｒｒ Ｐｒｏｔｏｃ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉ．２００２ Ｕｎｉｔ－１８．１．ｏｉ：１０．１００２／０４７１１４０８６４．ｐｓ１８０１ｓ２６；Ｃｈａｎ ａｎｄ Ｗｈｉｔｅ；Ｆｍｏｃ Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ － Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ．Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，２０００；Ｓｔｅｗａｒｔ，Ｊ．Ｍ．；Ｙｏｕｎｇ，Ｊ．Ｄ．Ｓｏｌｉｄ－Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（２ｎｄ ｅｄ．），Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ，１９８４；Ａｔｈｅｒｔｏｎ，Ｅ．；Ｓｈｅｐｐａｒｄ，Ｒ．Ｃ．，Ｓｏｌｉｄ－Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ．Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ：Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ Ｃｉｔｙ，１９８９；Ｍ．Ｂｏｄａｎｚｓｋｙ ａｎｄ Ａ．Ｂｏｄａｎｚｓｋｙ，Ｔｈｅ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ Ｖｅｒｌａｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８４）；Ｊ．Ｈ．Ｊｏｎｅｓ，Ｔｈｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ．Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｏｘｆｏｒｄ １９９１；ｉｎ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ ４３０Ａ Ｕｓｅｒ’ｓ Ｍａｎｕａｌ，ＡＢＩ Ｉｎｃ．，Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ；Ｇ．Ａ．Ｇｒａｎｔ，（Ｅｄ．）Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ，Ａ Ｕｓｅｒ’ｓ Ｇｕｉｄｅ．Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ＆ Ｃｏ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ １９９２，ａｎｄ Ｇ．Ｂ．Ｆｉｅｌｄｓ，（Ｅｄ．）Ｓｏｌｉｄ－Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ Ｖｏｌ．２８９）．Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ ａｎｄ Ｌｏｎｄｏｎ １９９７）；Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ，Ｊ．Ａｍｅｒ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．８５：２１４９－５４（１９６３）を参照）。液相ペプチド合成の方法も、当技術分野で確立されている（米国特許第５５１６８９１号）。

【００９３】

本明細書に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチドは、組換え発現を使用して産生されうる。ペプチドを産生する組換え技術は、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．，Ｒｕｓｓｅｌ，Ｄ．Ｗ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ．３ ｅｄ．２００１，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓに記載されるように、当技術分野で標準である。ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチドは、例えば、ＭＡＳ残基によってＮ末端で、ＧＡＰ残基によってＣ末端でキャップされうる。本明細書に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチドは、さらにＨｉｓ－タグ（例えば、６×Ｈｉｓ－タグ）付けされてもよい。

【００９４】

ｃ－Ｊｕｎ

本明細書に記載のアンタゴニストペプチドは、ｃ－Ｊｕｎをアンタゴナイズする。ｃ－Ｊｕｎは、分化、増殖、および生存を含む多くの細胞プロセスに関与する（Ｓｈａｕｌｉａｎ ｅｔ ａｌ．，２００１；Ｅｆｅｒｌ ｅｔ ａｌ．，２００３；Ｅｃｋｅｒｔ ｅｔ ａｌ．，２０１３；Ａｌａｎｉ ｅｔ ａｌ．，１９９１）。ヒトｃ－Ｊｕｎは、当技術分野で十分に特徴付けられており、例えば、（ＵｎｉＰｒｏｔ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｐ０５４１２，ｖｅｒｓｉｏｎ ２．）のアミノ酸配列を有しうる。

【００９５】

ペプチド架橋結合剤

ＰＰＩを担うタンパク質の表面上に存在する残基は、アルファ－ヘリックス、ベーター

シートおよびベーターターンなどの、タンパク質二次構造モチーフと会合している。注目すべきは、アルファーヘリックスは、タンパク質複合体の全ての二次構造のおよそ６０％を含むと考えられることである（Ｊｏｃｈｉｍ ａｎｄ Ａｒｏｒａ， ２０１０）。したがって、アルファーヘリックスは、その６０％がヘリックスの一表面に結合する、多くの重要な治療関連ＰＰＩ界面を媒介することが示されている（Ｒａｊ ｅｔ ａｌ．， ２０１３）。アルファーヘリックスは、所与のアミノ酸のカルボニル基（Ｃ＝Ｏ）と３または４残基離れたアミノ酸のアミノ基（ＮＨ）の間に水素結合を含有する。

【００９６】

架橋結合剤を使用してペプチドをヘリックス構造に制約することは、プロテアーゼ耐性の増強、細胞内の安定性、細胞取込みの増加、生物物理学的特性の増強を含む利点を付与し、野生型ペプチド配列と比較して高い能力でそれらの標的に結合すると予想されることが報告されている（Ａｚｚａｒｉｔｏ ｅｔ ａｌ． ２０１３）。結果として、制約されたアルファーヘリックスを含有するペプチド（「ヘリックス制約ペプチド」とも呼ばれる）は、ＰＰＩ阻害剤の同定のために大きく注目されている（Ｒｏｂｅｒｔｓｏｎ ａｎｄ Ｓｐｒｉｎｇ， ２０１８）。

【００９７】

したがって、一部の実施形態では、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチド化合物は、ヘリックス制約ペプチドである。

用語「ヘリックス制約ペプチド」は、安定なアルファーヘリックスを産生するために、２つのアミノ酸間に分子間架橋結合を生じる少なくとも１つの化学改変を有するペプチドを意味することが意図される。通常、架橋結合は、１つまたは２つのヘリックスターンの長さにわたって伸長する（すなわち、約３～３．６または約７アミノ酸）。したがって、ｉおよびｉ＋３、ｉ＋４、およびｉ＋７のうちの１つに位置するアミノ酸は、架橋結合の理想的な候補である。したがって、例えば、ペプチドは、配列．．．Ｎ１、Ｎ２、Ｎ３、Ｎ４、Ｎ５、Ｎ６、Ｎ７、Ｎ８、Ｎ９．．．を有し、アミノ酸Ｎは、各位置のために独立して選択され、Ｎ１とＮ４の間、またはＮ１とＮ５の間、またはＮ１とＮ８の間の架橋結合は有用であり、Ｎ２とＮ５の間、またはＮ２とＮ６の間、またはＮ２とＮ９の間等の架橋結合も同様である。複数の架橋結合（例えば、２、３、４またはそれ以上）の使用も検討される。したがって、本明細書で使用する場合、ヘリックス制約ペプチドは、２つのアミノ酸残基の間に少なくとも１つの架橋剤を含む。

【００９８】

化学改変は、炭化水素ステープルなどの分子テザーを組み込む化学改変、およびジスルフィド結合の形成を促進する化学改変を含む。架橋結合は、２つの残基を共に連結する、イオン性、共有結合性または水素結合であってもよく、好ましくは、架橋結合は共有結合である。

【００９９】

安定化したアルファーヘリックスの存在は、例えば、本明細書の実施例のように、Ｊｏｅｔ ａｌ．（２０１２）に記載の、アルファーヘリックスの円二色性分光法などの方法を使用して決定されうる。円二色性は、ヘリックス性の増加、すなわち線状から環状を測定するために使用される。２つのシステイン残基間など、２つのチオール基間のジスルフィド結合の形成によって架橋結合が生じる状況では、安定なアルファーヘリックスの存在は、試料中のチオールが遊離であるかまたはコンジュゲートされているか決定するアッセイを使用しても決定されうる。例えば、遊離のチオールは、エルマン試薬（５，５’－ジチオビス（２－ニトロ安息香酸；ＤＮＴＢ）（Ｓｉｇｍａ））との反応を介して、および４１２ｎｍでの吸光度をモニターすることによりアッセイされうる。

【０１００】

アミノ酸間に架橋結合を誘導する方法は、周知であり、ペプチド骨格の間、例えば、天然のアルファーヘリックスのようにカルボニル基とアミノ基の間、ならびにペプチドの側鎖の間に架橋結合を誘導する方法を含む。

【０１０１】

架橋剤は、ジスルフィド結合（例えば、Ｌｅｄｕｃ　ｅｔ　ａｌ．（２００３）に記載）、水素結合代理（例えば、Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２００５）に記載）、閉環メタセシス（例えば、Ｗａｌｅｎｓｋｙ　ｅｔ　ａｌ．（２００４）に記載）、α－ハロアセトアミド誘導体を使用するシステインアルキル化（例えば、Ｗｏｏｌｌｅｙ（２００５）に記載）またはハロゲン化ビアリール（例えば、Ｍｕｐｐｉｄｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０１１）に記載）、ラクタム環（例えば、Ｆｕｊｉｍｏｔｏ　ｅｔ　ａｌ．（２００８）に記載）、ヒドラジン結合（例えば、Ｃａｂｅｚａｓ　＆　Ｓａｔｔｅｒｔｈｗａｉｔ（１９９９）に記載）、オキシム結合（例えば、Ｈａｎｅｙ　ｅｔ　ａｌ．（２０１１）に記載）、金属キレート剤（例えば、Ｒｕａｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９０）に記載）、および「クリック」ケミストリー（例えば、Ｈｏｌｌａｎｄ－Ｎｅｌｌ　＆　Ｍｅｌｄａｌ（２０１１）に記載）を含む。

【０１０２】

架橋剤は、システイン残基を架橋結合するために使用されうる。したがって、ペプチドは、そのアミノ酸配列のｉおよびｉ＋４位、またはｉおよびｉ＋７位にシステイン（Ｃ）を含みうる。Ｊｏ　ｅｔ　ａｌ．（２０１２）に記載のように、ｉおよびｉ＋４位のシステイン残基の導入は、このスペーシングが２つのチオエーテル残基をアルファ－ヘリックスの近くに運ぶため、有用である。ｉおよびｉ＋４位にシステイン（Ｃ）を含有するペプチド内のアルファ－ヘリックスを安定化するために好適な架橋結合剤は、Ｊｏ　ｅｔ　ａｌ（２０１２）に記載される。例えば、架橋結合剤は、臭化アルキル、よう化アルキル、臭化ベンジル、臭化アリール、マレイミド、および求電子ジフルオロベンゼンからなる群から選択される架橋剤でありうる。好適な架橋剤は、システインを架橋結合する当技術分野で公知である（例えば、Ｆａｉｒｌｉｅ　＆　Ｄａｎｔａｓ　ｄｅ　Ａｒａｕｊｏ，２０１６　ａｎｄ　Ｊｏ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２を参照）。

【０１０３】

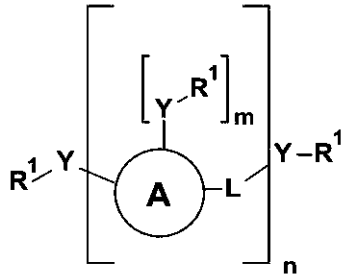
一部の実施形態では、架橋結合剤は、ｍ－キシレンベース、ｏ－キシレンベース、またはｐ－キシレンベースの臭化ベンジル、より好ましくは、ｍ－キシレンベースの臭化ベンジルである。

【０１０４】

一部の実施形態では、架橋剤は、式１：

【０１０５】

【化１】



式1

【０１０６】

［式中、

ｎは、１～３から選択される整数であり；

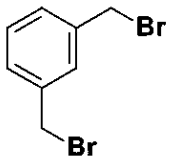
ｍは、０～２から選択される整数であり；

Ａは、Ｃ２～６－アルケニレン、Ｃ５～１２－アリーレンおよびＣ５～１２－ヘテロアリーレンから選択され；

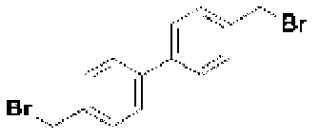
Ｙは、共有結合、Ｃ１～６－アルキレンまたは－Ｎ（Ｈ）Ｃ（＝Ｏ）ＣＨ２－であり；

Ｒ１は、Ｃｌ、Ｂｒ、Ｉ、またはＦから選択され；ならびに

各Ｌは、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ≡Ｃ－、－Ｎ≡Ｎ－、Ｃ$_{1～6}$アルキレンおよび共有結合から独立して選択される］
の化合物である。
【０１０７】
Ｒ^{1}基は、システインとの反応のための反応基（例えば、脱離基）を提供する。Ａ基は、２つの誘導体化可能なアミノ酸残基を介して架橋結合される場合に必要な、ペプチドを構造的に制約するために好適な構造を有するリンカーを提供する。例えば、Ａ基は、２つの誘導体化可能なアミノ酸残基を連結するために好適な形状へと構造的に制約されうる。一部の実施形態では、Ｒ^{1}はＢｒである。一部の実施形態では、Ａは、Ｃ$_{5～12}$－アリーレンおよびＣ$_{5～12}$－ヘテロアリーレンから選択される。一部の実施形態では、ｍは０である。一部の実施形態では、Ｙはメチレンである。一部の実施形態では、Ｌは共有結合である。
【０１０８】
一部の好ましい実施形態では、架橋結合剤は、以下の化学式：
【０１０９】
【化２】



【０１１０】
を有する１，３－ジブロモメチルベンゼン（ＤＢＭＢ）である。
ＤＢＭＢを使用して、ペプチドのアミノ酸配列のｉおよびｉ＋３またはｉおよびｉ＋４で誘導体化可能なアミノ酸残基と反応させることができる。
【０１１１】
一部の好ましい実施形態では、架橋結合剤は、以下の化学式：
【０１１２】
【化３】



【０１１３】
を有する４，４’－ビスブロモメチル－ビフェニル（Ｂｐｙ）である。
Ｂｐｙを使用して、ペプチドのアミノ酸配列のｉおよびｉ＋７で誘導体化可能なアミノ酸残基と反応させることができる。
【０１１４】
ペプチドのシステイン残基の架橋結合は、Ｔｉｍｍｅｒｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００５またはＷＯ２０２１／２６００７４に記載のものなど、公知の方法を使用して実行されうる。簡潔に言うと、この方法は、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）および炭酸水素アンモニウムの存在下でペプチドと架橋剤（例えば、ＤＢＭＢ）とを反応させるステップを含んでもよく、暗中で４～５時間、ｐＨ８．０および室温で反応させた。方法は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｃｅｌｌｕｌｏで実行されうる。ｉｎ　ｃｅｌｌｕｌｏ法は、組換えペプチドを含有する細胞（例えば、大腸菌細胞などの細菌細胞、またはヒト細胞などの真核細胞）を提供するステップ、架橋剤（例えば、細胞培養培地の一部として）と細胞を接触させるステップ、および架橋剤の存在下で細胞を培養するステップを含みうる。架橋剤は、１μＭと１ｍＭの間（例えば、１０μＭと１００μＭの

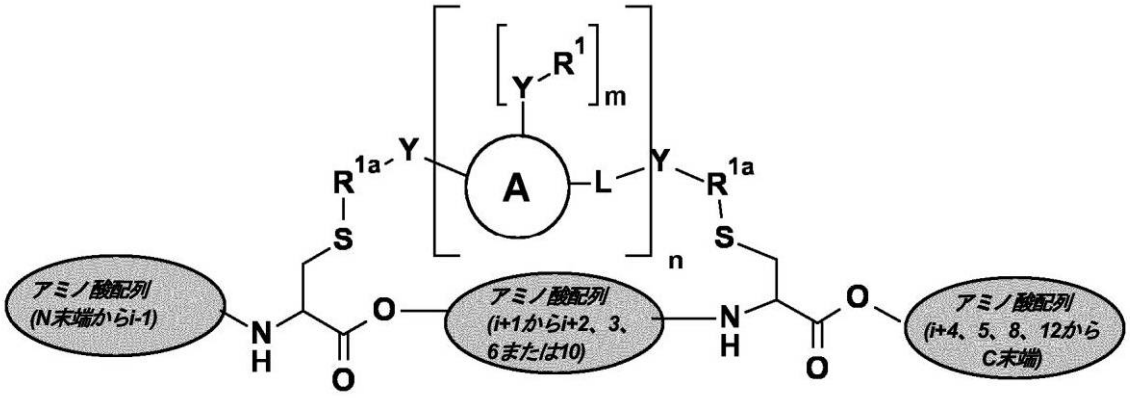
間）の濃度で、少なくとも２０分間の期間（例えば、２０分と１０時間の間）存在してもよい。好適なｉｎ　ｃｅｌｌｕｌｏ架橋結合法のさらなる詳細は、例えば、ＷＯ２０２１／２６００７４に提供される。

【０１１５】

架橋剤は、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストが、構造：

【０１１６】

【化４】



【０１１７】

を含みうるように、少なくとも一対のシステインと架橋結合するチオエーテルを形成する。

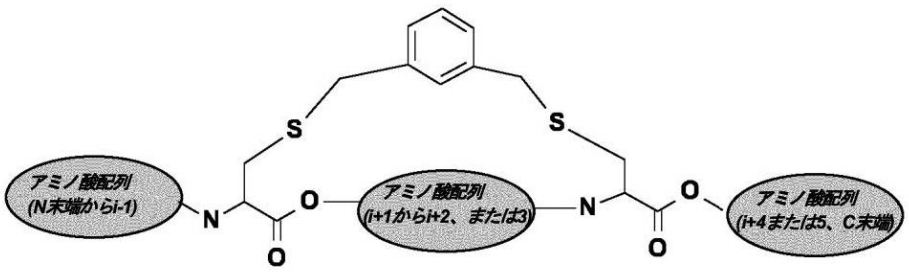
Ｙ、Ｌ、Ｒ１、ｎ、ｍおよびＡは、式１に規定される通りである。Ｒ１ａは、結合または式１の適切なＲ１基由来のＣＨ２－ＣＨ２－リンカーを表す。

【０１１８】

２つのＣ残基の間に形成されたアルキル架橋結合がＤＢＭＢによって形成される実施形態では、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、構造：

【０１１９】

【化５】



【０１２０】

を含みうる。

架橋剤は、ペプチドのリジン（Ｋ）およびアスパラギン酸（Ｄ）を架橋結合するために使用されうる。したがって、ペプチドは、そのアミノ酸配列のｉおよびｉ＋４位にリジン（Ｋ）およびアスパラギン酸（Ｄ）を含みうる。すなわち、ｉ位はリジン（Ｋ）であり、ｉ＋４位はアスパラギン酸（Ｄ）であるか、またはｉ位はアスパラギン酸（Ｄ）であり、ｉ＋４位はリジン（Ｋ）である。例えば、１つのヘプタドのｂ位はＫであり、ｆ位はＤでありうるか、または１つのヘプタドのｆ位はＫであり、続くヘプタドのｃ位はＤでありうる。

【０１２１】

ラクタム化は、プロテアーゼが一般にβ鎖を認識するため、さらなる立体ブロックを提供し、骨格への接近を避ける制約（Ｔｙｎｄａｌｌ　ＪＤ　ｅｔ　ａｌ．，　２００５）

による生体内安定性、ならびに潜在的な生物学的利用能および制約の親油性による膜透過性の点から有用である。ペプチドのラクタム架橋は、グルタミン酸（Ｅ）またはアスパラギン酸（Ｄ）、典型的にはアスパラギン酸（Ｄ）の側鎖とアミド結合を形成するリジン（Ｋ）の側鎖を指す。Ｋ－Ｄラクタム化を実行する方法は、本明細書の実施例、および、例えばＡｒａｕｊｏ　ｅｔ　ａｌ．　（２０１４）に記載される。

【０１２２】

上記のように、架橋結合は、ペプチドのアミノ酸配列のｉおよびｉ＋３位、ｉおよびｉ＋４位、またはｉおよびｉ＋７位のアミノ酸間に形成されうる。一部の実施形態では、架橋結合は、これらの位置に位置するシステイン（Ｃ）残基間である。他の実施形態では、架橋結合は、これらの位置のリジン（Ｋ）とアスパラギン酸（Ｄ）残基の間である。好ましくは、架橋結合は、ｉおよびｉ＋４位のアミノ酸間に形成される。

【０１２３】

核酸

本明細書では、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチドをコードする核酸は、任意の核酸（ＤＮＡまたはＲＮＡ）でありうる。

【０１２４】

コンジュゲート

一部の実施形態では、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストは、場合によりリンカーにより、別の部分、例えば脂肪酸または他の脂質、ポリマー、または別のペプチド配列（例えば、細胞透過性ペプチド（ＣＰＰ））へとコンジュゲートされうる。そのようなコンジュゲートは、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストの機能的アンタゴニスト特性を保持し、非コンジュゲートのｃ－Ｊｕｎアンタゴニストと比較して、１つまたは複数の改善された特性、例えば、安定性、ｉｎ　ｖｉｖｏ半減期、または効力、または細胞透過性を有しうる。部分は、ＮもしくはＣ末端、またはペプチドの任意の他の部位によってｃ－Ｊｕｎアンタゴニストへとコンジュゲートされうる。

【０１２５】

一部の実施形態では、ペプチドは、細胞透過性ペプチド（ＣＰＰ）へとコンジュゲートされうる。ＣＰＰは、哺乳動物細胞の細胞膜を透過する、および膜を通して多くの型および分子量の化合物を輸送することができるペプチドのクラスである。ＣＰＰが、他のタンパク質に化学的に連結または融合される場合、生じるポリペプチドは細胞に侵入することができる。ＣＰＰへの結合は、直接であってもよいか（例えば、融合タンパク質の一部として）、またはリンカー（例えば、短鎖ペプチドリンカー）を介してもよい。ＣＰＰは、一般に、３０アミノ酸未満のペプチドであり、天然もしくは非天然タンパク質またはキメラ配列由来である。ＣＰＰの例は、ｔａｔ（ＰＧＲＫＫＲＲＱＲＲＰＰＱ）（配列番号５４）、ペネトラチン（ＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ）（配列番号５５）、トランスポータン（ＧＷＴＬＮＳＡＧＹＬＬＧＫＩＮＬＫＡＬＡＡＬＡＫＫＩＬ）（配列番号５６）、ＶＰ－２２（ＤＡＡＴＡＴＲＧＲＳＡＡＳＲＰＴＥＲＰＲＡＰＡＲＳＡＳＲＰＲＲＰＶＤ）（配列番号５７）、Ｐｅｐ－１（ＫＥＴＷＷＥＴＷＷＴＥＷＳＱＰＫＫＫＲＫＶ）（配列番号５８）、ＭＡＰ（ＫＡＬＡＫＡＬＡＫＡＬＡ）（配列番号５９）、ＳＡＰ（ＶＲＬＰＰＰＶＲＬＰＰＰＶＲＬＰＰＰ）（配列番号６０）、オリゴアルギニン（ＲＲＲＲＲＲＲＲ（配列番号６１）またはＲＲＲＲＲＲＲＲＲ（配列番号６２））、カルシトニン（ＬＧＴＹＴＱＤＦＮＫＴＦＰＱＴＡＩＧＶＧＡＰ）（配列番号６３）、ＳｙｎＢ（ＲＧＧＲＬＳＹＳＲＲＲＦＳＴＳＴＧＲ（配列番号６４））、およびＰｖｅｃ（ＬＬＩＩＬＲＲＩＲＫＱＡＨＡＨＳＫ（配列番号６５））を含む。これらおよび他の好適なＣＰＰは、Ｈｅｉｔｚ　ｅｔ　ａｌ．　２００９に記載される。

【０１２６】

一部の実施形態では、ペプチドは、脂質にコンジュゲートされうる。ペプチドライゲーションは、ペプチド治療の薬物動態、薬力学および細胞透過性を改変する有効な戦略であり、いくつかの治療ペプチドにより成功したことが分かっている。コレステロールならびにＣ８－カプリル酸、Ｃ１２－ラウリン酸、およびＣ１６－パルミチン酸などの様々な鎖

長の脂肪酸は、エステル、エーテル、アミドまたはカルバメート結合を介してペプチド阻害剤へと共有結合される脂質モチーフとして利用されることが多い。ペプチドライゲーションの例は、Ｋｏｗａｌｃｚｙｋ　ｅｔ　ａｌ．　２０１７に記載される。

【０１２７】

医薬組成物

本発明のｃ－Ｊｕｎの機能的に活性なアンタゴニストは、治療設定においてｃ－Ｊｕｎの阻害に有用でありうる。したがって、本発明のｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチドは、医薬組成物に製剤化されうる。

【０１２８】

医薬組成物は、１つまたは複数の活性剤（例えば、本明細書に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチドまたはコンジュゲート）および１つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤を含む製剤である。医薬組成物は、治療効果を引き出すことができうる。

【０１２９】

医薬組成物は、本発明のｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチドまたはコンジュゲート、および薬学的に許容される賦形剤または担体を含みうる。

医薬組成物を作成する方法は、上記のｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチドまたはコンジュゲートを、薬学的に許容される賦形剤と混合するステップを含みうる。

【０１３０】

用語「薬学的に許容される」は、獣医学または医学的判断の範囲内で、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症のない、対象（例えば、ヒトまたは他の哺乳動物）の組織との接触における使用に好適であり、妥当なリスク対効果比に見合った化合物、物質、組成物、および／または剤形に関する。各担体、賦形剤等もまた、製剤の他の成分と対応しているという意味で「許容される」でなければならない。

【０１３１】

好適な賦形剤および担体は、限定はされないが、水、生理食塩水、緩衝食塩水、リン酸緩衝液、アルコール／水溶液、乳剤または懸濁液を含む。他の従来用いられる希釈剤、アジュバント、および賦形剤は、従来技術に従って添加されうる。そのような担体は、エタノール、ポリオール、およびそれらの好適な混合物、植物油、および注射可能な有機エステルを含みうる。緩衝液およびｐＨ調整剤が用いられてもよく、限定はされないが、有機酸または塩基から調製される塩を含む。代表的な緩衝液は、限定はされないが、有機酸塩、例えば、クエン酸（例えば、クエン酸塩）、アスコルビン酸、グルコン酸、炭酸、酒石酸、コハク酸、酢酸、フタル酸の塩、トリス、トリメチルアミン塩酸塩、またはリン酸緩衝液を含む。非経口用担体は、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロース、トレハロース、スクロース、乳酸リンゲル液、または不揮発性油を含みうる。静脈内用担体は、液体および栄養補充液、リンゲルデキストロースに基づくものなどの電解質補充液等を含みうる。保存剤および他の添加物、例えば抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤（例えば、ＥＧＴＡ；ＥＤＴＡ）、不活性ガス等もまた医薬担体中で提供されてもよい。本明細書に記載の医薬組成物は、担体の選択によって制限されない。上記の成分からの、適切なｐＨ、等調性、安定性および他の従来の特徴を有するこれらの薬学的に許容される組成物の調製は、当業者の範囲内である。

【０１３２】

好適な担体、賦形剤等は、標準的な薬学テキスト、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　ａｎｄ　Ｔｈｅ　Ｈａｎｄｂｏｏｋ　ｏｆ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｅｘｃｉｐｉｅｎｔｓ，　４ｔｈ　ｅｄｉｔ．，　ｅｄｓ．　Ｒ．　Ｃ．　Ｒｏｗｅ　ｅｔ　ａｌ，　ＡＰｈＡ　Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎｓ，　２００３に見出されうる。

【０１３３】

用語「担体」は、希釈剤、結合剤、滑剤および崩壊剤を指す。当業者は、そのような医薬担体およびそのような担体を使用して医薬組成物を化合する方法に精通している。

医薬組成物は、便利に単位剤形で提示されてもよく、薬学の分野で周知の任意の方法に

よって調製されてもよい。そのような方法は、１つまたは複数のアクセサリー成分を構成しうる上記の担体または賦形剤との会合へとペプチドを結合するステップを含む。一般に、製剤は、活性化合物の液体担体もしくは微細固体担体または両方との会合への一様なおよび本質的な結合によって調製される。

【０１３４】

本明細書に記載の医薬組成物は、投与の経路に応じて、様々な形態で産生されてもよい。医薬組成物は、例えば、液体、粉末、エアゾール、錠剤、カプセル、腸溶錠もしくはカプセル、または坐薬の形態で対象への投与のために調製されうる。医薬組成物は、懸濁液、溶液、油性または水性媒体中のエマルジョン、ペースト、および埋込み型の持続放出または生分解性製剤の形態であってもよい。持続放出または移植のための組成物は、薬学的に許容されるポリマー性または疎水性物質、例えば、エマルジョン、イオン交換樹脂、難溶性ポリマー、または難溶性塩を含みうる。医薬組成物は、注入可能な使用に好適な滅菌水溶液または分散液の形態で作成されてもよく、または凍結乾燥技術を使用して凍結乾燥形態で作成されてもよい。凍結乾燥した医薬組成物は、典型的には、約４℃で維持され、アジュバントを含むかまたは含まない、安定液、例えば、生理食塩水もしくはＨＥＰＥＳ中で再構築されうる。医薬組成物は、懸濁液またはエマルジョンの形態で作成されてもよい。

【０１３５】

医薬組成物は、単位用量または複数用量を密閉した容器、例えば、アンプルおよびバイアル中で提示されてもよく、滅菌液体担体、例えば使用直前の注射用水の添加のみを必要とする凍結乾燥（凍結乾燥）状態で保存されてもよい。

【０１３６】

医薬組成物は、任意の従来の投与経路によって対象へと投与されてもよい。一部の実施形態では、投与は、経口を含む全身経路によるか、またはより好ましくは非経口経路による。例えば、医薬組成物は、静脈、腹腔内または皮下注射によって投与されてもよい。

【０１３７】

疾患の処置

ｃ－Ｊｕｎは、分化、増殖、および生存などの多くの細胞プロセスにおいて役割を果たし、この転写因子の調節異常は、したがって、広範なヒト疾患をもたらしうる。したがって、本明細書に記載のｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチド、核酸、コンジュゲート、または医薬組成物は、動物またはヒトの体、例えばそれを必要とする個体におけるｃ－Ｊｕｎ媒介性疾患の処置の方法での使用のためであってもよい。

【０１３８】

ｃ－Ｊｕｎ媒介性疾患を有する個体は、当技術分野で公知の臨床基準に従ってｃ－Ｊｕｎ媒介性障害の診断に十分である、少なくとも１つの同定可能な徴候、症状、または検査所見を示しうる。そのような臨床基準の例は、医薬のテキスト、例えば、Ｈａｒｒｉｓｏｎ’ｓ Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｉｎｔｅｒｎａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，１５ｔｈ Ｅｄ．，Ｆａｕｃｉ ＡＳ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，ＭｃＧｒａｗ－Ｈｉｌｌ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，２００１に見出されうる。一部の実施形態では、個体は、ｃ－Ｊｕｎ媒介性障害を有すると先に同定または診断されてもよく、または本発明の方法は、個体におけるｃ－Ｊｕｎ媒介性障害の存在を同定または診断するステップ、ｃ－Ｊｕｎ媒介性障害を予後診断するステップ、または個体におけるｃ－Ｊｕｎ媒介性障害の発症のリスクを評価するステップを含みうる。

【０１３９】

処置は、一部の所望の治療効果、例えば、ｃ－Ｊｕｎ媒介性疾患の進行の阻害または遅延が達成され、進行速度の低下、進行速度の停止、ｃ－Ｊｕｎ媒介性疾患の緩和、ｃ－Ｊｕｎ媒介性疾患の治療または寛解（部分的または全部）、ｃ－Ｊｕｎ媒介性疾患の１つまたは複数の症状および／または徴候の防止、遅延、軽減または阻止、または処置の非存在下で予測される以上の対象もしくは患者の生存の延長を含む、ヒトまたは動物（例えば、獣医適用）の任意の処置および治療であってもよい。

【０１４０】
予防対策としての処置（すなわち、予防）も含まれる（例えば、個体における状態発症のリスクを低減する；その発症を遅延する；または発症後のその重症度を軽減する、個体における状態の発症前の処置）。例えば、がんなどのｃ－Ｊｕｎ媒介性疾患に罹患しやすいかまたはその発症もしくは再発のリスクがある個体が、本明細書に記載のように処置されうる。そのような処置は、ｃ－Ｊｕｎ媒介性疾患、または個体における１つもしくは複数のそれらの症状の発症または再発を防止または遅延しうる。
【０１４１】
ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチドは、以下の疾患：がん、糖尿病、心血管疾患、自己免疫疾患、関節障害（例えば、関節炎）、および神経変性疾患のうちのいずれか１つの処置の方法で使用されうる。
【０１４２】
「がん」は、以下：急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、副腎皮質がん、肛門がん、膀胱がん、血液がん、骨がん、脳腫瘍、乳がん、女性生殖器系のがん、男性性器系のがん、中枢神経系リンパ腫、子宮頸がん、小児横紋筋肉腫、小児肉腫、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、結腸直腸がん、結腸がん、子宮内膜がん、子宮内膜肉腫、食道がん、眼がん、胆嚢がん、胃がん、消化管がん、ヘアリー細胞白血病、頭頸部がん、肝細胞がん、ホジキン病、下咽頭がん、カポジ肉腫、腎臓がん、咽頭がん、白血病、白血病、肝臓がん、肺がん、悪性線維性組織球腫、悪性胸腺腫、黒色腫、中皮腫、多発性骨髄腫、骨髄腫、鼻腔および副鼻腔がん、鼻咽腔がん、神経系がん、神経芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫、口腔がん、口腔咽頭がん、骨肉腫、卵巣がん、膵臓がん、副甲状腺がん、陰茎がん、咽頭がん、下垂体腫瘍、形質細胞腫、原発性ＣＮＳリンパ腫、前立腺がん、直腸がん、呼吸器系、網膜芽腫、唾液腺がん、皮膚がん、小腸がん、軟組織肉腫、胃がん、胃がん、精巣がん、甲状腺がん、泌尿器系がん、子宮肉腫、膣がん、血管系、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症およびウィルムス腫瘍のうちのいずれか１つまたは複数を含みうる。
【０１４３】
がんは、特定の型であってもよい。がんの型の例は、星状細胞腫、がん腫（例えば、腺癌、肝細胞癌、髄様癌、乳頭癌、扁平上皮がん）、神経膠腫、リンパ腫、髄芽腫、黒色腫、骨髄腫、髄膜腫、神経芽細胞腫、肉腫（例えば、血管肉腫、軟骨肉腫（ｃｈｒｏｎｄｒｏｓａｒｃｏｍａ）、骨肉腫）を含む。
【０１４４】
一部の実施形態では、個体は、最初のがん処置後に微小残存病変（ＭＲＤ）を有しうる。
がん処置は、がん完全寛解を含むがん増殖を阻害すること、および／またはがん転移を阻害することを含みうる。がん増殖は、一般に、より発生した形態へのがん内の変化を示す多くの指標のうちのいずれか１つを指す。したがって、がん増殖の阻害を測定する指標は、がん細胞生存の減少、腫瘍容積または形態学の減少（例えば、コンピューター断層撮影法（ＣＴ）、超音波検査、または他の画像検査法を使用して決定される）、腫瘍増殖の遅延、腫瘍血管系の破壊、遅延型皮膚過敏反応テストの性能の改善、Ｔ細胞の活性の増加、および腫瘍特異的抗原のレベルの減少を含む。
【０１４５】
一部の実施形態では、ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストペプチドは、がんの転移の阻害または減少に有用でありうる。例えば、がんを有する個体における転移を減少させ、または阻害する方法は、治療有効量のｃ－Ｊｕｎペプチドを個体に投与するステップを含む。
【０１４６】
上記の処置に好適な個体は、哺乳動物、例えば齧歯類（例えば、ギニアピッグ、ハムスター、ラット、マウス）、ネズミ科（例えば、マウス）、イヌ科（例えば、イヌ）、ネコ科（例えば、ネコ）、ウマ科（例えば、ウマ）、霊長類、サル（ｓｉｍｉａｎ）（例えば、サルまたは類人猿（ａｐｅ））、サル（例えば、マーモセット、ヒヒ）、類人猿（例え

ば、ゴリラ、チンパンジー、オランウータン、テナガザル）、またはヒトでありうる。

【０１４７】

一部の好ましい実施形態では、個体はヒトである。他の好ましい実施形態では、非ヒト哺乳動物、特に、ヒトにおける治療効果を実証するモデルとして従来使用される哺乳動物（例えば、マウス、霊長類、ブタ、イヌ、またはウサギ動物）が用いられてもよい。

【０１４８】

本発明に記載の方法が実施されてもよく、または産物はｉｎ　ｖｉｔｒｏ、ｅｘ　ｖｉｖｏ、もしくはｉｎ　ｖｉｖｏで存在してもよい。用語「ｉｎ　ｖｉｔｒｏ」は、研究室条件または培養中での物質、生物学的基質、細胞および／または組織による実験を包含することを意図するが、用語「ｉｎ　ｖｉｖｏ」は、無傷の多細胞生物による実験および手順を包含することを意図する。「ｅｘ　ｖｉｖｏ」は、生物体の外側、例えばヒトまたは動物の身体の外側に存在するかまたは生じるものを指し、生物体から採取した組織（例えば、全臓器）または細胞でありうる。

【０１４９】

方法がｉｎ　ｖｉｔｒｏで実施される場合、それはハイスループットスクリーニングアッセイを含みうる。方法で使用した試験化合物は、合成コンビナトリアルペプチドライブラリーから得られうるか、または合成ペプチドまたはペプチボ模倣分子でありうる。

【０１５０】

それらの特定の形態または開示した機能を実施するための手段に関して示される前述の説明、または以下の特許請求の範囲、または添付の図面に開示の特徴、または開示した結果を得るための方法もしくはプロセスは、必要に応じて、別々に、またはそのような特徴の任意の組合せで、それらの多様な形態の本発明を実現するために利用されうる。

【０１５１】

本発明は、上記の例示的な実施形態と併せて記載されるが、本開示により、多くの等価な改変およびバリエーションが当業者には明らかである。したがって、上記を記載する本発明の例示的な実施形態は、例示的であり、限定ではないと考えられる。記載した実施形態に対する様々な変更が、本発明の精神および範囲から逸脱すること無く行われうる。

【０１５２】

疑問を避けるために、本明細書において提供する任意の理論説明が、読み手の理解を改善する目的のために提供される。本発明者らは、任意のこれらの理論的説明によって縛られることを望まない。

【０１５３】

本明細書において使用する任意のセクション見出しは、構成目的のためだけであり、記載した主題を限定すると理解されない。

後の特許請求の範囲を含む、本明細書を通して、文脈が他に必要としない限り、用語「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」および「含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）」、ならびに「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」、「含んでいる（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、および「含んでいる（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」などのバリエーションは、記載した整数またはステップまたは整数もしくはステップの群の包括を含むが、任意の他の整数またはステップまたは整数もしくはステップの群の除外を含まないと理解されるであろう。

【０１５４】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用する場合、単数形「１つの（ａ）」「１つの（ａｎ）」および「その（ｔｈｅ）」は、文脈が他に明確に示さない限り、複数の参照を含む。範囲は、「約」１つの特定の値から、および／または「約」別の特定の値までとして、本明細書において示されてもよい。そのような範囲が示される場合、別の実施形態は、１つの特定の値から、および／または他の特定の値までを含む。同様に、先行詞「約」の使用により、およそとして値が示される場合、特定の値が別の実施形態を形成することが理解されるであろう。数値に関して、用語「約」は、任意選択であり、例えば＋／－１０％を意味する。

【０１５５】

配 列

【０１５６】

【表１－１】

配列番号	説明	配列
1	伸長したヒンジ領域	LV[X_1]EE[X_2][X_3]LE[X_4]E X_1は、V、D、K、CおよびRから選択され、 X_2は、D、K、CおよびR,から選択され、 X_3は、V、D、C、KおよびRから選択され、 X_4は、E、D、C、KおよびRから選択される。
2	N末端酸性鎖	EA[X_5][X_6] X_5は、E、KまたはCから選択される、および X_6は、EまたはDから選択される。
3	N末端酸性鎖	EAEE
4	LZ領域	IEQLEERNYALRKEIEDLQKQ
5	LZ領域	IEQLEEKNKALKDEIEDLQKQ
6	LZ領域	IKQLEDRNYALRKEIEDLQKQ
7	LZ領域	IEQLEERNYALRKEIKDLQDQ
8	LZ領域	IEQLEEKNKALKDEIEDLY
9	LZ領域	IEQLEERNYALRKEIEDLQ
10	HingeWペプチドバリアント22/23	EAEELVVEEDVLEEEIEQLEERNYALRKEIKDLQDQ
11	HingeWペプチドバリアント24 (HW30)	EAEELVVEEKVLEDEIEQLEERNYALRKEIKDLQDQ
12	HingeWバリアント	LEQRAEELARENEELEKEAEELVVEEDVLEEEIEQLEERNYALRKEIEDLQKQLEKL
13	HingeWペプチドバリアント2	LARENEELEKEAEELVVEEDVLEEEIEQLEERNYALRKEIEDLQKQLEKL
14	HingeWペプチドバリアント3	LEKEAEELVVEEDVLEEEIEQLEERNYALRKEIEDLQKQLEKL
15	HingeWバリアントペプチド4	EAEELVVEEDVLEEEIEQLEERNYALRKEIEDLQKQLEKL
16	HingeWバリアントペプチド7/8	LVVEEDVLEEEIEQLEEKNKALKDEIEDLQKQLEKLY
17	HingeWバリアントペプチド9/10	LVVEEDVLEEEIEQLEERNYALRKEIEDLQKQLEDL
18	HingeWバリアントペプチド11	EAEELVVEEDVLEEEIEQLEERNYALRKEIEDLQKQ
19	HingeWバリアントペプチド12/13	KEAEDLVVEEDVLEEEIEQLEERNYALRKEIKDLQDQ
20	HingeWバリアントペプチド14/15	EAKELVDEEDVLEEEIEQLEERNYALRKEIEDLQKQ
21	HingeWバリアントペプチド16/17	EAEELVVEEKVLEDEIEQLEERNYALRKEIEDLQKQ
22	HingeWバリアントペプチド18/19	EAEELVVEEDVLEEEIKQLEDRNYALRKEIEDLQKQ
23	HingeWバリアントペプチド20/21	EAEELVVEEDVLEEEIEQLEEKNKALKDEIEDLQKQY

【０１５７】

【表１－２】

24	HingeWバリアントペプチド25	EAEELVVEEDVLEEEIEQLEERNYALRKEIEDL
25	HingeWバリアントペプチド26/27	EAEELVVEEDVLEEEIEQLEEKNKALKDEIEDLY
26	HingeWバリアントペプチド28/29	EAEELVVEEDVLEEEIEQLEERNYALRKEIEDLQ
27	LZ領域	IEQLEERNYALRKEICDLQCQ
28	HingeWバリアントペプチド	EAEELVVEEDVLEEEIEQLEERNYALRKEICDLQCQ
29	LZ領域	IEQLEERNYALR[X_7]E[X_8]K[X_9]L[X_{10}]D[X_{11}] ここで、[X_7]はK、L、S、W、P、Q、R、M、T、V、A、E、またはGであり; [X_8]は、I、V、またはLであり; [X_9]および[X_{10}]は、任意のアミノ酸残基であり; [X_{11}]はQ、E、またはKである。
30	LZ領域	IEQLEERNYALR[X_7]E[X_8]C[X_9]L[X_{10}]C[X_{11}] ここで、[X_7]は、K、L、S、W、P、Q、R、M、T、V、A、E、またはGであり; [X_8]は、I、V、またはLであり; [X_9]および[X_{10}]は、任意のアミノ酸残基であり; [X_{11}]は、Q、E、またはKである。
31	伸長したヒンジ領域	LVVEEDVLEEE
32	伸長したヒンジ領域	LVVEEKVLEDE
33	伸長したヒンジ領域	LVKEEDDLEEE
34	伸長したヒンジ領域	LVVEECVLECE
35	伸長したヒンジ領域	LVCEEDCLEEE
36	伸長したヒンジ領域	LVCEEDVLECE
37	HingeWバリアント0W	EAEELVVEEDVLEEEIEQLEERNYALRSEICSLQCQ
38	Hinge WバリアントオルトDBMBW	EAEELVVEEDVLEEEIEQLEERNYALRKEICELSCQ
39	HingeWバリアントメタDBMBW	EAEELVVEEDVLEEEIEQLEERNYALRAEICNLSCQ
40	HingeWバリアントパラDBMBW	EAEELVVEEDVLEEEIEQLEERNYALRTEI**C**SLM**C**K
41	tddDBMBW	EAEELVVEEDVLEEEIEQLEERNYALRAEICSLQCQ
42	cJun LZ	MASIARLEEKVKTLKAQNYELASTANMLREQVAQLGAPHHHHHH
43	cJun bZIP	RIKAERKRMRNRIAASKCRKRKLERIARLEEKVKTLKAQNYELASTANMLREQVAQLGAP
44	cFos LZ	MASTDTLQAETDQLEDEKYALQTEIANLLKEKEKLGAPHHHHHH

【０１５８】

【表１－３】

45	cFos bZIP	EEKRRIRRERNKMAAAKCRNRRRELTDTLQAETDQLEDEKYAL QTEIANLLKEKEKLGAP
46	FosW	MASLDELQAEIEQLEERNYALRKEIEDLQKQLEKLGAPHHHHHH
47	A-FosW	MASLEQRAEELARENEELEKEAEELEQELDELQAEIEQLEERNY ALRKEIEDLQKQLEKLGAPHHHHHH
48	HingeW	MASLEQRAEELARENEELEKEAEELVVEEDVLEEEIEQLEERNY ALRKEIEDLQKQLEKLGAPHHHHHH
49	cJun-Hinge-Lib-F プライマー	GAAGAGCTCSWGSWGSWGSWGSWTSWGCTGSWGGMAS WGATTGAACAGCTGGAAGAACGCAACTATGCC
50	cJun-Hinge-Lib_R プライマー	TGAGGCGCGCCCAGTTTCTCCAGCTGTTTCTGGAGGTCTTC GATCTCTTTGCGCAAGGCATAGTTGCGTTC
51	TREプライマー	GTCAGTCAGTGACTCAATCGGTCA
52	非-TREプライマー	CCTGCGTAGTTCCATAAGGATAGC
53	His-タグ	HHHHHH
54	tat	PGRKKRRQRRPPQ
55	ペネトラチン	RQIKIWFQNRRMKWKK
56	トランスポータン	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL
57	VP-22	DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRRPVD
58	Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV
59	MAP	KALAKALAKALA
60	SAP	VRLPPPVRLPPPVRLPPP
61	オリゴアルギニン	RRRRRRRR
62	オリゴアルギニン	RRRRRRRRR
63	カルシトニン	LGTYTQDFNKTFPQTAIGVGAP
64	SynB	RGGRLSYSRRRFSTSTGR
65	Pvec	LLIILRRRIRKQAHAHSK
66	LZ領域0W	IEQLEERNYALRSEICSLQCQ
67	LZ領域 オルトDBMBW	IEQLEERNYALRKEICELSCQ
68	LZ領域 メタDBMBW	IEQLEERNYALRAEICNLSCQ
69	LZ領域 パラDBMBW	IEQLEERNYALRTEICSLMCK
70	LZ領域 tdd DBMBW	IEQLEERNYALRAEICSLQCQ
71	伸長したヒンジ領域	LVVEEKVLERE
72	c-Junアンタゴニストペプチドバリアント	EAEELVVEEKVLEREIRRLERRNRALRKEIKDLQDQ
73	c-Junアンタゴニストペプチドバリアント	EAEELVVEEKVLEDEIERLERRNYRLRREIKDLQDQ
74	改変LZ領域	IRRLERRNRALRKEIKDLQDQ
75	改変LZ領域	IERLERRNYRLRREI**K**DLQ**D**Q

【実施例】

【０１５９】

特定の態様および実施形態は、実施例により、および上記の図面を参照して、ここに示す。

実施例１　－　機能的ペプチドアンタゴニストの同定

多くの合理的設計手法、ライブラリースクリーニング、および選択系が存在し、所与のＴＦターゲットに結合することができる分子の同定の成功をもたらしたが、標的結合が機能の消失へとつながることを確実にする重要な挑戦が残っている（Ｂｒｅｎｎａｎ　ｅｔ　ａｌ．，　２０２０；Ｂａｘｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１４）。様々な方法により、広いＬＺ結合界面を標的化するペプチドベースのｃ－Ｊｕｎアンタゴニストが産生されてきた（Ｂｏｙｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，　２００２；Ｍａｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，　２００６；Ｋａｐｌａｎ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１４；Ｂａｘｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１

７；Ｌａｔｈｂｒｉｄｇｅ ｅｔ ａｌ．， ２０１８）。しかしながら、ｃ－Ｊｕｎ ＤＢＤが未結合のままであり、ＴＲＥ ＤＮＡに結合することができるため、ＬＺ結合が機能的なアンタゴニズムへとつながるかどうか予測することは困難である（Ｓｅｌｄｅｅｎ ｅｔ ａｌ．， ２００８；Ｓｚａｌｏｋｉ Ｎ ｅｔ ａｌ．， ２０１５）。合理的に設計されたペプチドは、ｃ－Ｊｕｎ ＤＢＤを標的化することが示されたが、ＬＺアンタゴニストよりも低い効力を示し、ＡＰ－１ファミリーＤＢＤにわたる高い配列類似性により特異性に関する懸念がある（Ｔｓｕｃｈｉｄａ ｅｔ ａｌ ２００４）。同様に、ＴＲＥ ＤＮＡを標的化する広範なＳＭが開発されたが（Ｄａｉ ｅｔ ａｌ．， ２００４；Ｆａｎｊｕｌ ｅｔ ａｌ．， １９９４）、これらも効力が低く、オフターゲット効果を産生する可能性がある。これは、一部のｂＺＩＰ／ＤＮＡ組合せは抗癌性転帰を促進することが公知であるが、複数のＴＦが、典型的には任意の所与のＤＮＡエレメントに結合するためである（Ｅｆｅｒｌ ｅｔ ａｌ．， ２００３；Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚ－Ｍａｒｔｉｎｅｚ ＪＡ ｅｔ ａｌ．， ２０１７）。これらの方法の否定的側面の可能性を回避する１つの手法は、選択的であるが高親和性の相互作用により全長ｃ－Ｊｕｎ ｂＺＩＰドメインを標的化し、同時に、ＤＮＡ結合とＬＺ二量体化の両方をブロックする、より長いペプチドを利用することである。Ｏｌｉｖｅらは、この手法により、野生型（ＷＴ）ｃＦｏｓ ＬＺ（ｃ－Ｊｕｎとヘテロ二量体化することが公知）および合理的に設計されたＧｌｕ－リッチ酸性鎖（図１）を組み合わせた、Ａ－Ｆｏｓを産生した（Ｏｌｉｖｅ ｅｔ ａｌ．， １９９７）。Ａ－Ｆｏｓ設計原理は、ＬＺ相互作用がＮ末端側で伸び、酸性鎖の推定のｄ位へのＬｅｕ残基の組込みにより促進されたＤＢＤ酸性鎖相互作用を生じることを前提とする。細胞内Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ｂｌｏｃｋ Ｓｕｒｖｉｖａｌ（ＴＢＳ）ライブラリースクリーニングアッセイが、機能的ＴＦアンタゴニストを検索するために開発および検証され、ＴＦ活性が消失した場合にのみ細胞生存が生じる。さらに、細菌増殖速度は、アンタゴニスト効率と相関し、ＴＦアンタゴニスト間の比較および競合を可能にする。ここで、本発明者らは、機能的ｃ－Ｊｕｎアンタゴニズムの ＴＢＳプラットフォーム内でそれらがスクリーニングされうることを実証する、大きなペプチドライブラリー（１３１，０２７メンバー）を使用する手法を示す。選択したペプチドは、ホモ二量体安定性の減少によって特に促進される、標的結合およびｃ－Ｊｕｎ／ＴＲＥ ＤＮＡアンタゴニズムにおける親ペプチドからの明確な改善を示す広範な生物物理学的手法を使用して評価される。以下の方法を使用した：

１．１ 方法

プラスミド構築物およびタンパク質産生：ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲ（図２）およびＷＴ－ｍＤＨＦＲ ＤＮＡ構築物は、ｐＱＥ１６派生プラスミドｐＥＳ３００ｄへとサブクローニングされ；ｃ－Ｊｕｎ ＬＺおよびｃ－Ｊｕｎ ｂＺＩＰ ＤＮＡ構築物は、ｐＱＥ１６派生プラスミドｐＥＳ２３０ｄへとサブクローニングされ；および、ｃＦｏｓ ＬＺおよびＡ－ＦｏｓＷ ＤＮＡ構築物は、ｐＥＴ２４ａへとサブクローニングされた。ヒトｃ－Ｊｕｎ ｂＺＩＰドメインは、Ａｒｇ^{252}からＬｅｕ^{308}にわたり、ＬＺドメインは、Ｉｌｅ^{277}からＬｅｕ^{308}にわたる。ヒトｃＦｏｓ ｂＺＩＰドメインは、Ｇｌｕ^{137}からＬｅｕ^{193}にわたり、ＬＺドメインは、Ｔｈｒ^{162}からＬｅｕ^{193}にわたる。Ａ－ＦｏｓＷは以下の配列：ＬＥＱＲＡＥＥＬＡＲＥＮＥＥＬＥＫＥＡＥＥＬＥＱＥＬＤＥＬＱＡＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＥＤＬＱＫＱＬＥＫＬ（太字は、ＦｏｓＷ配列）を有する。６×Ｈｉｓタグ付けのみであるＷＴまたはＴＲＥ－ｍＤＨＦＲ構築物以外、全ての構築物は、Ｎ末端でＡＳ残基により、Ｃ末端でＧＡＰ残基によりキャップされ、６×Ｈｉｓタグ付けもされる。配列の全リストは表１に提供する。

【０１６０】

【表２】

ペプチド	配列
cJun LZ	MASIARLEEKVKTLKAQNYELASTANMLREQVAQLGAPHHHHHH (配列番号42)
cJun bZIP	RIKAERKRMRNRIAASKCRKRKLERIARLEEKVKTLKAQNYELASTANMLREQVAQLGAP (配列番号43)
cFos LZ	MASTDTLQAETDQLEDEKYALQTEIANLLKEKEKLGAPHHHHHH (配列番号44)
cFos bZIP	EEKRRIRRERNKMAAAKCRNRRRELTDTLQAETDQLEDEKYALQTEIANLLKEKEKLGAP (配列番号45)
FosW	MASLDELQAEIEQLEERNYALRKEIEDLQKQLEKLGAPHHHHHH (配列番号46)
A-FosW	MASLEQRAEELARENEELEKEAEELEQELDELQAEIEQLEERNYALRKEIEDLQKQLEKLGAPHHHHHH (配列番号47)
HingeW	MASLEQRAEELARENEELEKEAEELVVEEDVLEEEIEQLEERNYALRKEIEDLQKQLEKLGAPHHHHH (配列番号48)

表 1: 先行技術および Hinge W ペプチド配列

【０１６１】

タンパク質は、ＮｈｅＩおよびＡｓｃＩ部位を使用して、ｐＥＴ２１－Ｈｉｓ－ＳＵＭＯプラスミド（ｃ－Ｊｕｎ　ｂＺＩＰ、ｃＦｏｓ　ｂＺＩＰ）またはｐＥＴ２４ａプラスミド（ＨｉｎｇｅＷ、Ａ－ＦｏｓＷ、ＦｏｓＷ）のいずれかへと、それらのＤＮＡ配列をサブクローニングすることによって精製された。関連プラスミドを含有する大腸菌の終夜培養を使用して、希釈比１：１０００でＬＢ培地へと接種した。この培養は、OD_{600nm}が０．７に達するまで、震盪（３７℃、２００ｒｐｍ）しながらインキュベートした。タンパク質過剰発現は、終夜震盪（２５℃、２００ｒｐｍ）しながらのインキュベーションの前に、ＩＰＴＧ（１ｍＭ）の添加によって誘導された。次いで、細胞は、遠心分離によって培養から回収した。細胞ペレットは、Ｈｉｓｔｒａｐ結合緩衝液（２０ｍＭ　リン酸カリウム、５００ｍＭ　ＮａＣｌ、４０ｍＭ　イミダゾール、５ｍＭ　ＤＴＴ、ｐＨ７．４）中に再懸濁し、ソニケートし、ＨｉｓＴｒａｐ　ＨＰ　５ｍＬプレロードカラムにロードした。カラムは、結合緩衝液：溶出緩衝液（２０ｍＭ　リン酸カリウム緩衝液、５００ｍＭ　ＮａＣｌ、４００ｍＭイミダゾール、５ｍＭ　ＤＴＴ、ｐＨ７．４）勾配でタンパク質試料を溶出する前に、結合緩衝液によって洗浄した。この方法を使用して、ＳＵＭＯ切断ステップでの使用のためのＨｉｓタグＵＬＰ１プロテアーゼの～８０％純度の試料もまた産生した。ＳＵＭＯ－タグタンパク質は、標準緩衝液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ．ＨＣｌ、２ｍＭ　ＤＴＴ、ｐＨ８．０）へと緩衝液交換した。ＳＵＭＯ－タグタンパク質：ＵＬＰ１の１０：１混合物は、３０℃で１６時間インキュベートした。ＳＵＭＯタグ構築物は、ＳＵＭＯのＮ末端にＨｉｓタグ付され、切断反応は結合緩衝液中で５分の１に希釈し、次いでＨｉｓＴｒａｐカラムを通過させ、切断されたＳＵＭＯタグおよびＨｉｓタグＵＬＰ１を除去した。ＨｉｓＴｒａｐフロースルーは、最終的に、水：アセトニトリル勾配（０．１％　ＴＦＡ）を使用して、Ｊｕｐｉｔｅｒ　Ｐｒｏｔｅｏカラム（粒子サイズ　４μｍ、孔サイズ　９０Å、２５０×１０ｍｍ；Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ）を備えたＲＰ－ＨＰＬＣを使用することによって純度＞９８％まで精製した。ＳＵＭＯタグのないペプチドは、Ｈｉｓｔｒａｐ溶出およびＨＰＬＣ精製後に濃縮した。ペプチド純度および同一性は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびエレクトロスプレーイオン化質量分析によって評価した。

【０１６２】

ＤＨＦＲ活性アッセイ：比色分析キット（Ｓｉｇｍａ　ＣＤ０３４０）を使用して、精製したＤＦＨＲ酵素の活性を測定した。ＷＴまたはＴＲＥ－ｍＤＨＦＲ（反応中１００ｎＭ）およびＮＡＤＰＨ（反応中６０μＭ）を、アッセイ緩衝液のみ、またはＤＨＦＲ阻害剤ＴＭＰもしくはＭｔｘ（反応中１μＭ）と混合した。反応は、ＤＨＦ（反応中５０μＭ＋ＤＨＦを含まないブランク反応）の添加によって開始し、試料の３４０ｎｍでの吸光度を、Ｖａｒｉａｎ　Ｃａｒｙ　５０　ＵＶ－Ｖｉｓスペクトロフォトメーターを使用して

測定した。比活性は、以下の式を使用して算出した。

【０１６３】

【数１】

$$比活性 = \frac{(\Delta OD/min_{試料} - \Delta OD/min_{ブランク})}{12.3 \times mg タンパク質}$$

【０１６４】

ライブラリー構築およびＴＢＳアッセイ：ライブラリーインサートは、所望の位置に縮重コドンを有する合成したプライマー（Ｓｉｇｍａ）から、ＰＣＲ　ｆｉｌｌ　ｉｎ反応を使用して産生され、正確な残基オプションを産生した。ライブラリーは、ＳａｃＩおよびＡｓｃＩ部位を使用して、Ａ－ＦｏｓＷを含有するｐＥＴ２４ａプラスミドへとサブクローニングした。使用したプライマーは、ｃＪｕｎ－Ｈｉｎｇｅ－Ｌｉｂ－Ｆ：５’－ＧＡＡＧＡＧＣＴＣＳＷＧＳＷＧＳＷＧＳＷＧＳＷＴＳＷＧＣＴＧＳＷＧＧＭＡＳＷＧＡＴＴＧＡＡＣＡＧＣＴＧＧＡＡＧＡＡＣＧＣＡＡＣＴＡＴＧＣＣ－３’（配列番号４９）およびｃＪｕｎ－Ｈｉｎｇｅ－Ｌｉｂ－Ｒ：５’－ＴＧＡＧＧＣＧＣＧＣＣＣＡＧＴＴＴＣＴＣＣＡＧＣＴＧＴＴＴＣＴＧＧＡＧＧＴＣＴＴＣＧＡＴＣＴＣＴＴＴＧＣＧＣＡＡＧＧＣＡＴＡＧＴＴＧＣＧＴＴＣ－３’（配列番号５０）であった。ライブラリーＤＮＡは、ＮＥＢ－１０ベータエレクトロコンピテント大腸菌細胞へと形質転換した。以下の式

【０１６５】

【数２】

$$E = 100 \times (1 - \frac{1}{n})^m$$

【０１６６】

［式中、Ｅはライブラリー欠損のパーセンテージであり、ｍは回収したコロニーの数であり、ｎはライブラリーサイズである。］を使用して、単一コロニーの数により、ライブラリーカバー度を決定した。これは、回収した２１５５０００ライブラリーコロニーから、Ｈｉｎｇｅライブラリーの９９．９％がカバーされたことを示した。ライブラリーＤＮＡの質は、ＤＮＡプールと多くの単一コロニーの両方をシーケンスすることにより評価し、プールの正確な位置に縮重コドンを示し、単一コロニーからの多様なライブラリーメンバーを示した。ライブラリーＤＮＡのプールは、ｐＥＳ３００ｄ－ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲおよびｐＥＳ２３０ｄ－ｃＪｕｎ　ｂＺＩＰをすでに含有するＢＬ２１　Ｇｏｌｄ細胞へと形質転換された。

【０１６７】

選択圧は、必要なプラスミドを維持するアンピシリン、カナマイシンおよびクロラムフェニコールと一緒にＴＭＰ（２～４μＭ）、およびタンパク質発現を誘導するＩＰＴＧ（１ｍＭ）を含むＭ９ミネラル培地中で細菌を増殖することによって適用する。ライブラリー形質転換体は、選択アガープレート（２μＭ　ＴＭＰ）へとまずプレートし、７２～９６時間、３７℃で増殖させた。最適化実験（図５）は、４μＭ　ＴＭＰが選択に最適であることを示すが、低ストリンジェンシーを選択の前にまず使用し、後工程で増加させる。この第一段階の選択からのコロニーをプールし、開始ＯＤ$_{600}$　０．０５の液体培養中で段階的に増殖させ、ＯＤ$_{600}$が０．６に達するまで、２００ｒｐｍで震盪しながら３７℃で増殖させた。ＴＭＰ濃度は、次の継代で最適な４μＭに増加される前に、最初の液体培養継代では２μＭであった。最も有効な機能的アンタゴニストを含有する細菌は、増殖優位性を提供する高レベルのＴＲＥ－ｍＤＨＦＲを産生すると考えられ、これらは培養で優位を占めるであろう。各継代ステップにおいて、培養の試料をＬＢアガー（抗生物質を補足し、プラスミドを維持する）にプレートし、個々のコロニーを選択およびシーケンスし、ＤＮＡプールもシーケンスした。これは、勝者のシーケンスが選択される間、ライ

ブラリーメンバーの出現をモニターすることを可能にする。アッセイ評価実験は、改変したアッセイ方法を利用し、それにより培養株（表２）のグリセロールストックからの終夜培養がOD_{600}＝０．５に希釈され、５０μＬが選択Ｍ９最小培地アガープレートにプレートされた。

【０１６８】

【表３】

	pES300d	pES230d	pET24a
1	WT-mDHFR	スクランブル (cJun bZIP)	スクランブル (A-FosW)
2	WT-mDHFR	cJun bZIP	スクランブル (A-FosW)
3	TRE-mDHFR	スクランブル (cJun bZIP)	スクランブル (A-FosW)
4	TRE-mDHFR	cJun LZ	スクランブル (A-FosW)
5	TRE-mDHFR	cJun bZIP	スクランブル (A-FosW)
6	TRE-mDHFR	cJun bZIP	cFos LZ
7	TRE-mDHFR	cJun bZIP	FosW
8	TRE-mDHFR	cJun bZIP	A-FosW
9	TRE-mDHFR	cJun bZIP	HingeW

表 2: 各プラスミドから発現されたインサートを示す*大腸菌*対照株の TBS アッセイ評価。増殖実験のための株は、不要なプラスミド中のスクランブルタンパク質配列を使用して、等しい抗生物質圧を確実にするようにマッチしたプラスミドである。

【０１６９】

円二色性（ＣＤ）：１ｍｍ経路長のＣＤセル中、２００μＬの試料によるＣＤ測定のため、Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｐｈｏｔｏｐｈｙｓｉｃｓ社製Ｃｈｉｒａｓｃａｎを使用した。タンパク質／ＤＮＡ試料を、ｐＨ７．４の、１５０ｍＭリン酸カリウム、１５０ｍＭフッ化カリウム、および５ｍＭ　ＴＣＥＰ中に懸濁し、測定前に３０分間平衡化した。全スペクトルにつき、１９０ｎｍと２６０ｎｍの間（ＤＮＡ結合実験では２６５～３２０ｎｍ）の３回のスキャンは１ｎｍのバンド幅で回収し、０．５s^{-1}の速度でデータをサンプルした。これらのスキャンを平均し、モル残基楕円率（ＭＲＥ）に変換した。熱変成実験は、１℃増加で１～９０℃の勾配にわたり２２２ｎｍでの楕円率を測定することにより実施した。２０℃での融解後スキャンは、融解前スキャンの１０％以内にオーバーレイした場合、転移が可逆的であることを確認した。生じる熱変成曲線は、ＭＲＥへと変換され、ギブズ－ヘルムホルツ式の改変に由来する二状態モデルにフィットさせ、融解温度（T_m）を決定した（Ｍａｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，　２００７）。

【０１７０】

等温滴定熱量測定（ＩＴＣ）：ペプチドは、ｐＨ７．４の、１０ｍＭリン酸カリウム、１５０ｍＭフッ化カリウム、および５ｍＭ　ＴＣＥＰからなるＩＴＣ緩衝液中で試験した。ＭｉｃｒｏＣａｌ　ＶＰ－ＩＴＣ装置（Ｍａｌｖｅｒｎ）を使用して、１０μＭでのアンタゴニストペプチド（ＨｉｎｇｅＷまたはＡ－ＦｏｓＷ）の１０μＬ注入液を、１μＭのｃＪｕｎを含有する細胞へと注入した。ＭｉｃｒｏＣａｌ　Ｏｒｉｇｉｎソフトウェアを使用して、添加時の熱変化を記録および解析した。対照実験は、ＩＴＣ緩衝液のみを含有するセルへのアンタゴニストペプチド試料の注入を含み、差し引かれる希釈の熱を決定した。生じる結合データを、ｏｎｅ　ｓｉｔｅ結合モデルにフィットし、結合のエンタルピー変化（ΔＨ）および平衡結合定数（K_D）を抽出し、そこから結合の自由エネルギー変化（ΔＧ）および結合のエントロピー変化（ΔＳ）を算出した（Ｗｉｓｅｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，　１９８９）。熱力学パラメーターは、２つの独立した実験の平均として示され、エラーは一標準偏差として与えられた。

【０１７１】

電気泳動移動度シフト解析（ＥＭＳＡ）：以下の二本鎖オリゴヌクレオチド配列を使用した。ＴＲＥ：５’－ＧＴＣＡＧＴＣＡＧＴＧＡＣＴＣＡＡＴＣＧＧＴＣＡ（配列番号５１）、対照非ＴＲＥ：５’－ＣＣＴＧＣＧＴＡＧＴＴＣＣＡＴＡＡＧＧＡＴＡＧＣ（配列

番号５２）（Ｓｉｇｍａ）。ＤＮＡの相補性一本鎖を購入し（Ｓｉｇｍａ）、１：１比で混合し、次いで室温までゆっくりと冷却してＤＮＡ二重鎖を形成する前に２０分間９５℃に加熱した。電気泳動のためのタンパク質／ＤＮＡ試料は、０．５ｘＴＢＥ緩衝液（１０ｍＭ　$MgCl_2$を補足した）中の１．３％アガロースゲルに流す前に、結合緩衝液（１５０ｍＭ　ＫＣｌ、１ｍＭジチオトレイトール、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、１０ｍＭ　$MgCl_2$、ｐＨ８）中、３０分間４℃でインキュベートした。ＳＹＢＲ（登録商標）Ｇｒｅｅｎ染色は、ＤＮＡを染色するゲルおよびランニング緩衝液に含まれ、ＳＹＰＲＯ（登録商標）Ｒｕｂｙを添加し、３時間インキュベートしてタンパク質を染色する前に、トランスイルミネーターで画像化した。ゲルは、トランスイルミネーターで画像化する前に１時間、１０％メタノール、７％酢酸溶液中で脱染色した。

【０１７２】

１．２　ｃＪｕｎ強制転写ブロックを促進するＴＲＥ含有遺伝子から活性ｍＤＨＦＲの作成

Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｂｌｏｃｋ　Ｓｕｒｖｉｖａｌ（ＴＢＳ）は、読み出しとして細胞生存を利用する細胞内アッセイである。これは、タンパク質－ＤＮＡ相互作用アンタアゴニストがスクリーニングされることを可能にし、外因性マウスジヒドロ葉酸還元酵素（ＤＨＦＲ）への転写ブロックを除去するそれらの能力によって最も活性なものが同定されることを可能にする。この酵素は、ＤＮＡおよびアミノ酸合成に必要とされるプリンの産生に必要であるため、生存に絶対的に必須である。内在性大腸菌ＤＨＦＲ（ｅｃＳＨＦＲ）は、トリメトプリム（ＴＭＰ）によって選択的に阻害され、Ｍ９最小培地中で増殖させた細胞が、それらの生存を外因性マウスＤＨＦＲ（ｍＤＨＦＲ）活性に依存するようになることを意味する（Ｍａｔｔｈｅｗｓ　ｅｔ　ａｌ．，　１９８５）。本発明者らは、コードＤＮＡ配列へと１５のＴＲＥ部位を導入する合理的設計によってｍＤＨＦＲ遺伝子を産生し（図２および３）、発現されたタンパク質（ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲ）への変更を最小にしながら、強いｃＪｕｎ転写ブロックを可能にした。特に、生じるＴＲＥ－ｍＤＨＦＲ構築物は、２つのサイレント突然変異および１３の保存変異によって産生された。設計ガイドとしてＷＴ－ｍＤＨＦＲ結晶構造を使用して（ＰＤＢコード：１Ｕ７２）（Ｃｏｄｙ　ｅｔ　ａｌ．，　２００５）、７，８－ジヒドロ葉酸（ＤＨＦ）基質またはニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（ＮＡＤＰＨ）共因子結合に重要だと思われる残基（例えば、Ａ１０、Ｌ２３、Ｗ２５およびＲ７１）（Ｃｏｄｙ　ｅｔ　ａｌ．　２００５；Ｔｈｉｌｌｅｔ　ｅｔ　ａｌ．　１９８８）は変化させなかった。全ての他のアミノ酸残基の接触可能な表面領域は、‘Ａｃｃｅｓｓｉｂｌｅ　Ｓｕｒｆａｃｅ　Ａｒｅａ　ａｎｄ　Ａｃｃｅｓｓｉｂｉｌｉｔｙ　Ｃａｌｃｕｌａｔｉｏｎ　ｆｏｒ　Ｐｒｏｔｅｉｎ’ツール（ｈｔｔｐ：／／ｃｉｂ．ｃｆ．ｏｃｈａ．ａｃ．ｊｐ／ｂｉｔｏｏｌ／ＡＳＡ／）を使用して算出した。２０　Å２のカットオフスコアを実施し、それ以下の残基は、溶媒曝露から埋もれ、したがって、変更された場合、より破壊を引き起こすようであると考えられた。残りの非必須、表面曝露残基のうち、突然変異は、Ｒ基変化が相対的に保存される場合にのみ許容された。ＴＲＥ部位を組み込むために含まれる正確に許容さる置換は以下の通りであった：Ｆ３２Ｓ、Ｔ４０Ｑ、Ｓ４２Ｄ、Ｇ４６Ｓ、Ｋ６４Ｓ、Ｒ７８Ｑ、Ｑ１０３Ｓ、Ｍ１１２Ｓ、Ｎ１２７Ｔ、Ｒ１３８Ｑ、Ｌ１５４Ｓ、Ｙ１６３ＳおよびＥ１６９Ｑ。

【０１７３】

１．３　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｂｌｏｃｋ　Ｓｕｒｖｉｖａｌアッセイの確立

本発明者らはまず、それが発現し、フォールドし、および触媒活性されることを確認することにより、新規のＴＲＥ－ｍＤＨＦＲ構築物がＴＭＰ阻害ｅｃＤＨＦＲを置き換えることができるかどうか確認することを考えた。これは、ｉ）イソプロピルβ－Ｄ－１－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）誘導時に、タンパク質が可溶性画分内で発現されることを確認する、細胞溶解物のＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析（図４）、ｉｉ）ＴＭＰを補足したＭ９アガーへの、ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲプラスミドを含有する大腸菌のプレート［増殖が観察されず（４μＭ　ＴＭＰ、図５で最適化）、ＩＰＴＧによるＴＲＥ－ｍＤＨＦＲ発現の誘

導時に増殖が回復された（図５および８Ｂ－３）］、およびｉｉｉ）精製された組換えＷＴ－およびＴＲＥ－ｍＤＨＦＲ活性の、ＤＨＦ基質の存在下、３４０ｎｍでのＮＡＤＰＨの減少を追跡することによるモニター（図３）によって達成された。これらの反応から算出された比活性は、ＷＴと比較してＴＲＥ－ｍＤＨＦＲの活性の２４分の１への減少を示した。さらに、ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲは、ＴＭＰの存在下で比活性の～１．８分の１への減少を示したが、ＷＴ－ｍＤＨＦＲは影響されなかった。１３のアミノ酸置換から生じる活性の予測された減少にもかかわらず、ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲは、ＤＨＦを回復し、生存を与える（ｅｃＤＨＦＲは損なわれる）その能力を保持し、ＴＢＳのためのその好適さを確認する。

【０１７４】

ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲは、活性であり、選択条件下（Ｍ９最小培地＋４μＭ　Ｔｍｐ＋１ｍＭ　ＩＰＴＧ）での細胞生存に絶対必要であることを確立したので、次いで本発明者らは、ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲプラスミドを含有する細胞において、ｃＪｕｎ　ｂＺＩＰドメインを発現させたところ、コロニー数の２１分の１への減少がもたらされた（Ｐ≦０．０００１；図８Ｂ－５）。ＷＴ－ｍＤＨＦＲ（すなわち、必要なＴＲＥ結合部位を欠損する）の存在下でのｃＪｕｎ　ｂＺＩＰの発現は、細菌増殖を減少させた（Ｐ≦０．０５、図８Ｂ－１対８Ｂ－２）。これは、おそらく、過剰発現したｃＪｕｎのプラスミドＤＮＡへの非特異的結合による。しかしながら、転写ブロックは、ＴＲＥ部位がない場合の１．３分の１への減少により示されるように、強くＴＲＥ部位特異的である。さらなる対照として、本発明者らは、２５残基のＤＢＤが欠失した、ｃＪｕｎ　ＬＺのみの構築物も導入した。このペプチドは、ＤＮＡ結合を開始することができず、予想通り、細菌コロニー形成に影響しなかった（Ｐ＝０．１、図８Ｂ－４対８Ｂ－３）。合わせると、これは、ｃＪｕｎ　ｂＺＩＰとＴＲＥ部位の間の相互作用とＴＢＳシステム内の細菌増殖の消失を特異的に相関させ、細菌増殖の任意の続く増加が、この相互作用の阻害によることを確証する。

【０１７５】

次に、ｃＪｕｎに結合することが公知のペプチドがシステムに導入され、それらがｃＪｕｎ機能に影響しうるかどうか確立した。すなわち、非機能的ヘテロ二量体としてｃＪｕｎ　ｂＺＩＰを隔離し、したがって、ＤＮＡ結合を防止し、ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲ転写をレスキューする。ここで、本発明者らは、ｃＪｕｎ　ＬＺドメインを標的化する２つのペプチド：ｃＦｏｓ　ＬＺおよびＦｏｓＷ［ｎＭ親和性で、ＤＮＡの非存在下でｃＪｕｎに容易に結合するタンパク質断片相補アッセイ（ＰＣＡ）から同定された最適化配列］を使用した（Ｍａｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，　２００６；Ｗｏｒｒａｌ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１１）。ｃＪｕｎとのそれらの公知の相互作用にもかかわらず、両ペプチドは、ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲ発現および活性の回復に有効ではないことが示され、転写ブロックした細胞からのコロニー数の顕著な増加をもたらさなかった（両ケースでＰ＞０．０５、図８Ｂ－６または８Ｂ－７対８Ｂ－５）。この重要な発見は、ＦｏｓＷがｃＪｕｎ二量体に競合において勝ち、非機能的ヘテロ二量体を形成するが、ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲ内のＴＲＥ部位からＤＮＡ結合ｃＪｕｎを遊離できないことを示す。

【０１７６】

これに対処するため、本発明者らはＯｌｉｖｅらによる研究に変え、ｃＪｕｎのアンタゴニズムは、Ａｃｉｄｉｃ－ｃＦｏｓ（Ａ－Ｆｏｓ）を使用して達成され、それにより合理的設計した酸性鎖をｃＦｏｓ　ＬＺに付加した（Ｏｌｉｖｅ　ｅｔ　ａｌ．，　１９９７）。ＦｏｓＷは、ＤＮＡの非存在下で、ＷＴ　ｃＦｏｓ　ＬＺ配列と比較してｃＪｕｎ　ＬＺへの結合が改善することが示されたため（Ｍａｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，　２００６）、改善されたハイブリッド構築物が合理的に設計された。これは、合理的に設計した酸性鎖をＦｏｓＷ　ＬＺ配列のＮ末端に付加し、Ａ－ＦｏｓＷを生成することにより、２つの先に公開された成分をブレンドした（図９）。このタンパク質は、ペプチドライブラリー設計およびＴＢＳスクリーニングを使用する最適化のための鋳型として作用するように設計された。再保証するように、鋳型ペプチドは、ｃＪｕｎ／ＴＲＥ　ＤＮＡ相互作用をアンタゴナイズすることができ、ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲのみと比較してコロニー数が６０％回

復した（図８Ｂ－８対８Ｂ－５）。重要なことに、上記全ての実験バリエーションは、適切なダミー構築物とマッチしたプラスミドであり、抗生物質ストレスにおける差の可能性を調節した（表３）。ＴＢＳ設計は、図８Ａに要約する。

【０１７７】

【表４】

	2	3	4	5	6	7	8	9
1	4.3E-02	3.2E-06	3.2E-06	3.1E-06	4.6E-05	4.6E-05	4.6E-05	4.6E-05
2		9.3E-06	9.3E-06	9.1E-06	1.1E-04	1.1E-04	1.1E-04	1.1E-04
3			1.4E-01	8.7E-05	4.9E-04	5.8E-04	2.2E-02	3.8E-02
4				2.0E-06	1.6E-05	2.0E-05	7.0E-03	2.4E-02
5					8.1E-01	2.2E-01	1.4E-06	7.2E-07
6						1.1E-02	1.2E-06	3.6E-07
7							1.0E-06	2.6E-07
8								9.5E-03

表3: 試験した大腸菌対照株のコロニー数間の統計的差を示す*P*値の表。暗い赤色のボックスは、*P*≦0.0001を示し、赤いボックスは、*P*≦0.001を示し、オレンジは、*P*≦0.01を示し、黄色は、*P*≦0.05を示し、白は、*P*>0.05を示す。

【０１７８】

１．４　ヒンジライブラリー設計

酸性鎖設計原理は、様々なタンパク質の全長ｂＺＩＰドメインを標的化する、文献中、最も成功した方法である（Ｏｌｉｖｅ　ｅｔ　ａｌ．，　１９９７；Ａｈｎ　ｅｔ　ａｌ．，　１９９８；Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１１）。しかしながら、Ａ－ＦｏｓＷを使用するコロニーの不完全な回復は、転写が、１５のＴＲＥ部位にわたるｃＪｕｎ結合によって部分的に妨げられたままであることを示した。これは、設計鋳型としてＡ－ＦｏｓＷを使用し、ｃＪｕｎ／ＴＲＥ　ＤＮＡアンタゴニズムのさらなる改善に向け、ペプチドライブラリーのスクリーニングのために本発明者らがＴＢＳを用いることを可能にした。ライブラリー設計は、酸性鎖とＬＺドメインにまたがるヒンジ領域内の半無作為化位置を利用した（図９）。ヒンジ領域の最適化は、両ｃＪｕｎ　ＬＺ二量体化を同時に破壊する高親和性結合による、およびＤＢＤ－ＤＮＡ相互作用のより有効なブロックを提供する２つのドメイン間の領域においてスクランブルすることにより、機能的アンタゴニズムの顕著な増加を誘導することが予想された。先の研究は、一般に、ＤＢＤまたはＬＺのいずれかで結合を阻害しようとしたが、本明細書では、本発明者らは、両領域を標的化し、別々にいずれかのドメインを標的化する場合に比べて改善されたアンタゴニストを生成することを目的とした。９つの半無作為化ヒンジ位置のうち、４つのオプションは８位置（ｅ４、ｆ４、ｇ４、ａ４、ｂ４、ｃ４、ｅ５、ｆ５およびｇ５）にわたって含まれた：２つの疎水性（Ｖ／Ｌ）、１つの酸性（ＥまたはＤ）および１つの極性（ＱまたはＨ）。Ａ／Ｅのオプションは、ＬＺ領域のｆ位としてｆ５に含まれ、これらの位置は、直接標的相互作用に含まれると思われず、したがって、これらの残基は、エントロピー事前構築によりＰＰＩを増強する可溶性または高いヘリックス性によるアシストを示した。実験的な制限により、多くの位置により大きなアミノ酸多様性を組み込むことはできないが、これらの選択は、一般的なアミノ酸の優先度を試験することを可能にするであろう。全ての位置において、Ａ－Ｆｏｓの親残基はライブラリーへと組み込まれ、この機能的に活性なベンチマークタンパク質は、スクリーニング内に含まれた。ライブラリーを産生するために使用した遺伝学的方法からの制限は、異なる位置の残基の異なる混合物をもたらす。変更が好ましいと思われず、または所望の平行二量体よりも他のコイルドコイル構造が好まれうるため、この鎖の中央の半無作為化位置のｄ５のＬｅｕは、未変化のままであった。合わせると、これは、１３１０７２メンバーのペプチドライブラリーを産生した（図９）

１．５　ＴＢＳライブラリースクリーニング

ＴＢＳライブラリースクリーニングプロセス中、各細胞が所与のメンバーを発現するように、大腸菌は、プールしたＤＮＡプラスミドライブラリーによって形質転換した。細胞は、Ｍ９選択培地上にプレートし、ＴＢＳ活性ライブラリーメンバーを発現するコロニー

が形成されるまでインキュベートした。これらのコロニーをプールし、選択条件下で繰返し液体培養継代し、互いに対してライブラリーメンバーを競合させ、最もＴＢＳ活性な配列を濃縮する。アッセイの各段階で、ＤＮＡシーケンシングを使用して、培養中のＴＢＳ活性配列の存在、およびＨｉｎｇｅＷと呼ばれる、１つの別のＤＮＡ配列が培養中で検出されるまで、残基が各位置で選択される情報をモニターした（図９）。ｗｉｎｎｉｎｇ ＨｉｎｇｅＷペプチドで選択された残基は、酸性（Ｄ／Ｅ）または疎水性（Ｖ）のいずれかであることが一般に見出された。Ｖ（ｅ４およびｃ４でＥからＶ、ｆ４でＱからＶ）とＥ（ａ４でＬからＥ、ｅ５でＱからＥ、ｆ５でＡからＥ）の両方を有する親Ａ－ＦｏｓＷ配列から逸脱した選択された９つの残基のうち６つが、３つの位置で新しく選択された。競合中、各位置でのライブラリーオプションの比率のシフトは、どのように好ましい特定の残基または残基型が選択進行しうるかの情報を提供する（図１０）。２つの残基は、第１の継代後に選択され、したがって、この相互作用の最適化に特に重要であると考えられた：ｆ４のＶ（親配列ではＱ）およびｇ４のＥ（変化なし）。ｆ５位において、第２の継代の終わりに、いずれかのオプションをわずかに好み、ＥがＡ（親配列ではＡ）より選択され、標的結合への影響が少ないことを示している。Ａ－ＦｏｓＷの配列は、ライブラリー内に含まれるが、親配列よりＨｉｎｇｅＷのＴＢＳ選択嗜好のさらなる確認が液体培養中の直接競合によって行われた。この実験において、Ａ－ＦｏｓＷまたはＨｉｎｇｅＷのいずれかを含有する等しい数のＴＢＳ細胞を、選択Ｍ９培地中で混合し、競合選択にかけた。３回の継代後、ＨｉｎｇｅＷのみがＤＮＡシーケンシングによって観察され、Ａ－ＦｏｓＷ含有細胞が競合に負けた。これは、Ａ－ＦｏｓＷと比較してＨｉｎｇｅＷのコロニー数の１０％増加を示した、ＴＢＳコロニー計数実験でさらに支持され（Ｐ＝０．００９、図８Ｂ－９対８Ｂ－Ｂ）、ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲ単独で観察された理論的に最大コロニー数の６６％まで増加する（図８Ｂ－３）。

【０１７９】

１．６　ＨｉｎｇｅＷはＡ－ＦｏｓＷよりも優先的にｃ－Ｊｕｎに結合する

実験は、次に、ｃＪｕｎ　ｂＺＩＰへのＡ－ＦｏｓＷおよびＴＢＳ最適化ＨｉｎｇｅＷの結合を比較するために行った。ＣＤ分光法を利用して、ホモおよびヘテロ二量体ペプチド試料の大域二次構造を測定し、全体的なαヘリックス性および熱融解温度（Ｔｍ）の情報を提供した。ＨｉｎｇｅＷ／ｃＪｕｎスペクトルは、相互作用がないと予想される２つの成分のスペクトルの平均と比較して、αヘリックス含量が８２％高い（図１１Ａ）。少ないが、Ａ－ＦｏｓＷ／ｃＪｕｎスペクトルから同じ傾向が観察され、α－ヘリックス性は平均より３９％高かった（図１１Ｂ）。ＨｉｎｇｅＷ／ｃＪｕｎの結合時に得たより大きいα－ヘリックス性は、より高い親和性相互作用を意味する。注目すべきは、単離物中のＨｉｎｇｅＷは、Ａ－ＦｏｓＷと比較してヘリックス性が１２．９％少ないことである。ＡＧＡＤＩＲヘリックス傾向計算機を使用して、それぞれＡ－ＦｏｓＷおよびＨｉｎｇｅＷの予測されるヘリックススコア１４．５および１３．２を算出した（Ｍｕｎｏｚ　ｅｔ　ａｌ．　１９９４）。ヘテロ二量体ペプチドのヘリックス性の観察された差は、Ａ－ＦｏｓＷが本質的によりヘリックス性であることにより部分的に説明されうるが、この予測よりも大規模の観察された効果が、ＨｉｎｇｅＷと比較したＡ－ＦｏｓＷのホモ二量体嗜好によって説明されるようである。

【０１８０】

ＨｉｎｇｅＷ／ｃＪｕｎの熱変成解析は、２２２ｎｍでのシグナルの喪失後、ＨｉｎｇｅＷ／ｃＪｕｎヘテロ二量体では７１．２℃のＴｍを示し、２つの成分の変性プロファイルのＴｍから明らかな上昇を示す（図１１Ｃ）。Ａ－ＦｏｓＷ／ｃＪｕｎについて、Ｔｍは、６９．９℃として観察された（図１１Ｄ）。これは、ヘテロ二量体Ｔｍのわずかに１．３℃の上昇を示したが、Ａ－ＦｏｓＷ／ｃＪｕｎの成分ペプチド変性プロファイルと比較して、ＨｉｎｇｅＷ／ｃＪｕｎの決定的により大きなΔＴｍがあった。ＨｉｎｇｅＷホモ二量体の低い熱安定性は、転移の前に観察可能な低いベースラインを生じず、この成分のＴｍ、したがって平均が決定できない。しかしながら、このΔＴｍは、Ａ－ＦｏｓＷ／ｃＪｕｎの２７．５℃と比較して、～４０℃であると推定されうる。ＴＢＳスクリーニン

グは、したがって、標的とのヘテロ二量体化の増加よりも、ホモ二量体化の最適化された減少をもたらした。これは、溶液中、したがって、標的－二量体化受容状態で遊離の単量体としてより多くのアンタゴニストが利用可能であることを確認する。２つの変性プロファイル間の別の差は、Ａ－ＦｏｓＷ／ｃＪｕｎヘテロ二量体の二重転移の存在であり、より小さい最初の転移は～３０℃で生じる。Ｊａｉｎらは、類似の酸性鎖アンタゴニスト／ｂＺＩＰ変性プロファイルにおける二重転移を先に報告し、低い温度転移が、Ｎ末端酸性鎖／ＤＢＤ相互作用のほつれによって生じ、高い温度転移は、ＬＺ領域の解離に対応することを示した（Ｊａｉｎ Ｐ ｅｔ ａｌ．, ２０１７）。重要なことに、これらの２つの新規のアンタゴニストは、ＦｏｓＷよりも有意に高い標的ヘテロ二量体Ｔｍ値を有する（Ｔｍ＝５４℃、図１２）。これは、ＦｏｓＷにはない酸性鎖を含めることからの明確な利点を実証する。重要なことに、ｃＪｕｎとｃＦｏｓの間の配列差により（図９）、ｃＪｕｎ結合の最適化は、ＨｉｎｇｅＷがｃＦｏｓ ｂＺＩＰドメインとの相互作用を示さないことを意味する（図１３）。

【０１８１】

１．７ ｃＪｕｎ結合においてＨｉｎｇｅＷはＡ－ＦｏｓＷに競合において勝る

ｃＪｕｎ結合へのＨｉｎｇｅＷとＡ－ＦｏｓＷの間の直接競合は、ＣＤ二量体交換実験を使用して観察され、１つのアンタゴニスト／ｃＪｕｎ混合物を含有する溶液が他のアンタゴニストと組み合わされ、ｃＪｕｎ二量体化パートナーにおける変化の指標として、α－ヘリックス性の変化の可能性を観察した。この場合、ＨｉｎｇｅＷがあらかじめ形成されたＡ－ＦｏｓＷ／ｃＪｕｎヘテロ二量体と混合されると、平均と比較して、２２２ｎｍで測定した場合、ヘリックス性の１７％増加が観察され、結合の変化を示している（図１１Ｅ）。２つの成分ペプチドスペクトルの平均と比較して、１９０ｎｍでのピークの明確な増加もあった。実験の逆転、およびＡ－ＦｏｓＷのあらかじめ形成されたＨｉｎｇｅＷ／ｃＪｕｎヘテロ二量体との混合は、成分の平均とオーバーレイした測定されたスペクトルを産生し、二量体交換が生じないことを示す（図１１Ｆ）。ＴＢＳ増殖競合データと組み合わせて、二量体交換実験は、競合した場合、Ａ－ＦｏｓＷと比較してＨｉｎｇｅＷへのｃＪｕｎの優先結合を強く示す。

【０１８２】

１．８ 等温滴定熱量測定は、ＨｉｎｇｅＷへの結合親和性の改善を示す

ＨｉｎｇｅＷおよびＡ－ＦｏｓＷとのｃＪｕｎの結合相互作用は、ＩＴＣによってさらに研究され、熱力学パラメーターの情報を提供した。ｃＪｕｎへのＨｉｎｇｅＷの注入から産生されたデータ（図１４Ａ）は、１４．４±３．７ｎＭのＫＤおよび－８５．４±４．５ＫＪ／ｍｏｌのΔＨ（ＴΔＳ＝－３９．２±４．５ＫＪ／ｍｏｌ）により、単一部位結合モデル（Ｎ＝１．０５±０．０５）にフィットした。ｃＪｕｎへのＡ－ＦｏｓＷ結合（図１４Ｂ）も、８８．３±１７．６ｎＭのＫＤおよび－１５２．６±４．１ＫＪ／ｍｏｌのΔＨ（ＴΔＳ＝－１１２．６±４．１ＫＪ／ｍｏｌ）により、単一部位モデル（Ｎ＝１．０４±０．０８）にフィットした。これは、ＨｉｎｇｅＷに対するＡ－ＦｏｓＷのＴＢＳ最適化時に結合親和性の６倍増加を実証しながら、両相互作用の予測される１：１結合化学量論を確認する。両相互作用は、ネガティブエントロピー寄与によってエントロピーにより駆動され、後者は、ＨｉｎｇｅＷ相互作用にとって、前者ほど不利ではない。

【０１８３】

１．９ ＨｉｎｇｅＷは、ｃ－Ｊｕｎ／ＴＲＥ ＤＮＡ相互作用を効果的にアンタゴナイズする。

ＴＲＥ ＤＮＡへのｃＪｕｎの結合は、～２８１ｎｍのＣＤスペクトル中心におけるＤＮＡ吸光度ピークをモニターすることにより観察されうる（Ｊｏｈｎ Ｍ ｅｔ ａｌ．, １９９６）。単離物中のペプチド（ｃＪｕｎ、ＨｉｎｇｅＷまたはＡ－ＦｏｓＷ）は、この波長で吸収せず、この領域におけるスペクトルの全ての変化がＤＮＡ構造のシフトに対応することを意味する。ＴＲＥ ＤＮＡ（５μＭ）へのｃＪｕｎ（２０μＭ）の添加は、ｃＪｕｎがその標的ＴＲＥ部位に結合し、ＤＮＡ構造を変更するため、５５％までこのＤＮＡピークを減少させた（図１５Ａ）。ＤＮＡが放出されると増加するピークにより

、この結合したｃＪｕｎ／ＴＲＥ　ＤＮＡ混合物へのＨｉｎｇｅＷの続く滴定は、ピークシフトを逆転する。５０および１００μＭのＨｉｎｇｅＷ濃度での遊離のＤＮＡスペクトルとシグナルがオーバーレイするまで、これは、用量依存的に生じ、ｃＪｕｎ／ＴＲＥ相互作用の完全なアンタゴニズムを示す。ヒルの式（ＯｒｉｇｉｎＰｒｏ）への相対ピークシフトのプロッティングおよびフィッティングは、１３．４±０．６μＭのＩＣ５０を生じ、１６．０±０．４μＭのＩＣ５０を産生するＡ－ＦｏｓＷアンタゴニズムの同等のデータと比較されうる（図１５Ｂ）。これは、酸性鎖を欠損するＦｏｓＷへの、両場合における顕著な改善を示し、１１９．８±１．１μＭのＩＣ５０を示す（図１６）。対照実験では、ＨｉｎｇｅＷとＡ－ＦｏｓＷの両方が、ＤＮＡとの相互作用がないことが示された（図１７）

機能的アンタゴニズムのさらなる証拠を提供するため、電気泳動移動度シフトアッセイ（ＥＭＳＡ）を用いた。まず、ｃＪｕｎ　ｂＺＩＰ（２０μＭ）をＴＲＥ　ＤＮＡ構築物（２μＭ）と混合し、ＤＮＡ単独と比較して、遊離のＤＮＡバンド強度の顕著な減少を生じる（図１５Ｃ）。この複合体の全体変化によりゲルへの侵入が妨げられたため、結合ｃＪｕｎ／ＴＲＥ　ＤＮＡバンドは観察されなかった。アンタゴニズムは、したがって、遊離のＤＮＡバンドの強度をモニターすることによって最も観察された。遊離のＤＮＡバンド強度の濃度依存的増加は、ｃＪｕｎ／ＴＲＥ　ＤＮＡへのＨｉｎｇｅＷの付加時に観察された（図１５Ｄ）。同じ傾向が、ｃＪｕｎ／ＴＲＥ　ＤＮＡとのＡ－ＦｏｓＷの濃度の増加に観察された（図１５Ｅ）。ＣＤ　ＤＮＡピーク解析とほぼ一致して、データをヒルの式（ＯｒｉｇｉｎＰｒｏ）へとフィットし、ＨｉｎｇｅＷでは９．６±０．８μＭおよびＡ－ＦｏｓＷでは１２．１±１．９μＭのＩＣ５０値を決定することができた。ＣＤ　ＤＮＡピーク解析とほぼ一致して、データをヒルの式（ＯｒｉｇｉｎＰｒｏ）へとフィットし、ＨｉｎｇｅＷでは９．６±０．８μＭおよびＡ－ＦｏｓＷでは１２．１±１．９μＭのＩＣ５０値を決定することができた（図１５Ｆ）。

【０１８４】

ｃ－Ｊｕｎと、合理的に設計されたＡ－Ｆｏｓ鋳型またはＴＢＥライブラリー由来ＨｉｎｇｅＷのいずれかとの間の相互作用の熱力学的パラメーターの要約は以下の表４に提供する：

【０１８５】

【表５】

	20°Cでのヘリックス性の割合 (CD)	T_m (°C) (CD)	成分平均からのΔT_m (CD)	K_D (nM) (ITC)	N (ITC)	ΔG (KJ mol^{-1}) (ITC)	ΔH (KJ mol^{-1}) (ITC)	$T\Delta S$ (KJ mol^{-1}) (ITC)
cJun	14.0%	39.8 ± 1.9	-	-	-	-	-	-
A-FosW	40.1%	45.1 ± 0.9	-	-	-	-	-	-
A-FosW / c-Jun	38.7%	69.9 ± 0.7	27.5	88.3 ± 17.6	1.04 ± 0.08	-40.0± 0.5	-152.6 ± 4.1	-112.6 ± 4.1
HingeW	27.2%	-	-	-	-	-	-	-
HingeW/ c-Jun	34.7%	71.2 ± 1.4	~40	14.4 ± 3.7	1.05 ± 0.05	-46.2 ± 0.6	-85.4 ± 4.5	-39.2 ± 4.5

表 4: c-Jun と、合理的に設計された A-Fos 鋳型または TBS ライブラリー由来 HingeW のいずれかとの間の相互作用の熱力学的パラメーター。エラーは一標準偏差として示す。

【０１８６】

１．１０　結論

高親和性のＰＰＩを駆動するための多くのスクリーニングプラットフォームがあるが、

標的タンパク質の所望の機能喪失をもたらす標的結合を保証するものはない。例としてｃＪｕｎ／ＴＲＥを使用し、本発明者らは、ＴＦ活性を消失することができるペプチドの派生の一般化された手法として使用されうるＴｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ｂｌｏｃｋ Ｓｕｒｖｉｖａｌアッセイを開発した。本発明者らは、「分子ダイアル（ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｄｉａｌ）」を細菌システムへと操作し、それによりｃＪｕｎ／ＴＲＥ ＤＮＡ相互作用は細胞増殖と逆に相関した。このシステムへとｃＪｕｎ／ＴＲＥアンタゴニストを導入することにより、細胞増殖は、分子をダイアルアップする、多くのｃＪｕｎ／ＴＲＥ相互作用を機能的にブロックするアンタゴニストの能力の直接読み出しになる。最も有効な、合理的に設計された酸性アンタゴニストは、次に、親配列として利用され、ＴＢＳプラットフォームにおいてスクリーニングが成功した半無作為化ライブラリーを設計し、ｉｎ ｖｉｔｒｏで検証されたアッセイヒットＨｉｎｇｅＷを産生した。

【０１８７】

ＴＢＳシステムを確立することは、そのＤＮＡ配列への１５のＴＲＥ部位の導入時にその酵素活性を維持し、１３アミノ酸置換をもたらす、変異ＤＨＦＲ遺伝子（ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲ）の産生を必要とした。これは、ＴＲＥ－ｍＤＨＦＲプラスミドＤＮＡ上のＴＲＥ部位へとＴＦが結合する場合、ｃＪｕｎ誘導性転写ブロックを可能にした。生じるＴＲＥ－ｍＤＨＦＲ活性の欠損のため、ｍＤＨＦＲ遺伝子内のＴＦ ＤＢＤとＴＲＥ部位の両方に絶対条件があり、ＴＢＳシステムにおいて特異性を確認する。細菌増殖率の表現型は、単一細胞のシステム封じ込めにより発現されたアンタゴニスト配列の遺伝型と直接連結される。細菌増殖率の表現型は、単一細胞内のシステムの封じ込めによって発現されたアンタゴニスト配列の遺伝型に直接連結される。細菌細胞は、それらの早い増殖率、耐久性、使いやすさ、および低コストにより、このプロセスに理想的である。重要なことに、アッセイに干渉するであろう任意の関連真核生物のＴＦの非存在下で、ＴＲＥ部位と相互作用するｃＪｕｎの直接測定も可能にする。

【０１８８】

ＴＢＳは、ハイスループット遺伝子型－表現型スクリーニングおよびペプチドライブラリーの競合を促進し、結合するが標的活性に影響が少ないか影響がないもの（または全く結合しないもの）から、ｃＪｕｎ ＤＮＡ結合活性の機能喪失を生じるものを単離する。アンタゴニストは、溶液中で遊離の標的に結合するだけでなく、ＤＮＡからＴＦ（これはより安定であることが公知である）を解放するはるかに難しい課題を満たすこともできなければならないことを意味するので、この区別は重要である（Ｓｅｌｄｅｅｎ ｅｔ ａｌ．， ２０１１）。最後に、上記全てが、細胞質の複雑な環境内で行われ、毒性、非特異的、不溶性、またはプロテアーゼ感受性である分子は、後のヒット評価または臨床試験段階でこれを決定するよりも、最初のスクリーニング段階での検討から除外する。これらの因子は、大きく、浅いｃＪｕｎ ｂＺＩＰ表面へと結合する必要がある長いペプチドに特に重要である。こうしたペプチドは、これらの重要な性質を欠損する傾向があるからである。ＴＢＳは、大きなタンパク質融合または疎水性／芳香族タグの任意の要求の完全な除去により、関連アッセイ相互作用に干渉し、読み出しの失敗をもたらしうる関連タンパク質－断片相補性アッセイ、ならびにｉｎ ｖｉｔｒｏスクリーニングプラットフォーム、例えばファージディスプレイまたはリボソームディスプレイを改良する。

【０１８９】

ＴＢＳの主な利点は、Ａ－ＦｏｓＷの複合設計、Ａ－Ｆｏｓ（Ｏｌｉｖｅ ｅｔ ａｌ．， １９９７）とＦｏｓＷ ＰＣＡヒット（Ｍａｓｏｎ ｅｔ ａｌ．， ２００６）の両方からのドメインを含有するハイブリッドによって例示されるように、アッセイヒットが、ＴＦの、それらのコンセンサスＤＮＡ配列への結合を防ぐことが要求されることである。Ａ－ＦｏｓＷでは、ＬＺは、高親和性および選択性でｃＪｕｎ ｂＺＩＰに対するアンタゴニストを標的化し、ｃＪｕｎ ＤＢＤをブロッキングすることにより、ｃＪｕｎ／ＴＲＥ ＤＮＡ相互作用を機能的にアンタゴナイズするステップを助けるために酸性鎖が追加される。ｂＺＩＰタンパク質のＬＺドメインは、ＤＢＤよりも配列多様性を示す傾向があり、特定のＡＰ－１ファミリーメンバーの治療標的化に有用であり、より優れた調

節を提供し、有害事象の可能性が少ない（Ｅｆｅｒｌ　ｅｔ　ａｌ．，　２００３）。設計されたように単一の連続ＬＺ相互作用を形成することにより、Ａ－ＦｏｓＷがｃＪｕｎに結合するかは明確ではないが、ｃＪｕｎのヒンジ領域周辺の結合の増加は、ヘリックス性の増加、したがっていずれかの方向での親和性を増すと予測された。さらに、ヒンジ領域に着目することは、Ｏｌｉｖｅらのオリジナルの研究において支持され、Ａ－Ｆｏｓのこの領域における点突然変異（Ａ－ＦｏｓＷのａ４位のＮ２６Ｌ）は、ｃＪｕｎ結合親和性およびその後のｃＪｕｎ／ＴＲＥアンタゴニズムの著しい増加をもたらした（Ｏｌｉｖｅ　Ｍ　ｅｔ　ａｌ．，　１９９７）。合理的設計による酸性鎖の最適化は、公知の構造および高親和性相互作用をもたらす断定的なツールを有するＬＺドメインの場合のように、ガイダンスのための設計規則の欠如により妨げられた（Ｂｏｙｓｅｎ　ＲＩ　ｅｔ　ａｌ．，　２００２；Ｋａｐｌａｎ　ＪＢ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１４）。さらに、ｃＪｕｎのこの領域内の結合を最適化するために先に使用されたライブラリーベースの手法はない。設計鋳型としてＡ－ＦｏｓＷを使用すること、およびヒンジ領域におけるライブラリーオプションを含めることは、標的ｃＪｕｎタンパク質への１４ｎＭの親和性により、ＨｉｎｇｅＷのＴＢＳ選択を生じる明確な次のステップであった（Ａ－ＦｏｓＷの６倍改善）。ＨｉｎｇｅＷは、Ａ－ＦｏｓＷよりも１つ多い酸性残基を含み、ｃＪｕｎ　ＤＢＤ内の正の電荷と好ましく相互作用するＮ末端ドメイン中に、ドミナントネガティブな電荷を含む、Ｏｌｉｖｅらの方法を支持する。しかしながら、正確な選択パターンは、負に荷電した残基のブロックを単に産生するよりも微妙であった。ＨｉｎｇｅＷの性質は、ＴＢＳライブラリースクリーニング手法の別の利点を示唆し、アンタゴニストの指向性進化は、ホモ二量体化を減少させることにより改善をもたらした。ＴＢＳは、このライブラリースクリーニング手法を使用せずには予測できなかったタンパク質配列を産生することにより、新規の配列空間の調査に非常に有用であった。

【０１９０】

ＴＢＳは、親和性と活性の両方が同時に選択される、半合理的ＰＰＩ設計の新しい可能性を開く。これは、先の研究が、後に機能的活性を欠損することが見出された、潜在的なアンタゴニストを産生しうる、新規のライブラリーと標的の両方に対してＴＢＳ手法を拡大する大きな可能性を提供する。原理的には、手法は、不連続のコンセンサス配列を認識する任意のＤＮＡ結合タンパク質、またはＤＢＤが付加される任意の二量体システムにさえ完全に拡大されうる。方法は、任意のＤＮＡコンセンサス配列がＤＨＦＲ　ＤＮＡ配列へと組み込まれうる、および関連ＴＦの共発現によって転写ブロックされうるため、一般化できると想定されうる。これは、繰り返されるＤＨＦＲ設計プロセスおよび続く試験および各システムの最適化を必要とするが、主要原理は、有効であることが本明細書において示された。外因性分子のスクリーニングは、細胞浸透剤と機能的に活性な阻害剤の両方の同時プロファイリングを可能にする可能性もある。さらに、異なる設計原理および拡大オプションを有するライブラリーは、病原性のＴＦが関係づけられる広範な標的にわたりヒットするペプチドの産生を、かなり保証する。10^6～10^7のライブラリーサイズは、広範なペプチド多様性およびさらなる最適化の開発を可能にしうる標準技術および容易に入手可能な試薬を使用して可能である。広範なＴＦ標的のさらなるＴＢＳスクリーニングは、非遺伝ツールと疾患経路のプローブの両方を産生するが、最適化された機能的アンタゴニストおよび臨床リードの新規の生成の可能性もかなりある。

【０１９１】

実施例２　－　機能的ｃ－Ｊｕｎアンタゴニストの最適化

この実施例は、実施例１のペプチドライブラリースクリーニング由来のヒットの最適化を示し、ｃＪｕｎ二量体化とＤＮＡ結合の両方を同時にブロックする試みにおいて、全長ｃＪｕｎ　ｂＺＩＰドメインを標的化するように設計された。１３０，０００メンバーのペプチドライブラリーのＴＢＳスクリーニングは、ＨｉｎｇｅＷ配列（ＨＷ１）をもたらした。ＨｉｎｇｅＷは、ＤＢＤのみまたはＬＺのみのｃＪｕｎ阻害剤と比較して、ＴＲＥ結合のより有効な機能的アンタゴニズムのための全長ｃＪｕｎ　ｂＺＩＰドメインにわたり結合することができるように開発された。広く、浅いヘリックス結合表面の性質は、Ｈ

ｉｎｇｅなど、より長いペプチドの使用を支持する。しかしながら、配列の全長が、機能的アンタゴニズムを達成するために必要であるかどうかは不明であった。ＨＷ１は、組換えにより産生され、全体に顕著な負電荷を有し、６９アミノ酸長の、キャップされ（Ｎ末端におけるＭＡＳ、Ｃ末端におけるＧＡＰ）、Ｃ末端に６×Ｈｉｓタグされたタンパク質構築物として生物物理学的に特徴付けられた。ペプチドの最適化は、それらの薬物様特徴を改善する目的により実行された。

【０１９２】

２．１　方法

ペプチド合成および精製。全てのペプチドは、標準的なＦｍｏｃ固相法を使用して、ＣｈｅｍＭａｔｒｉｘ　Ｒｉｎｋアミドレジンの、０．１ｍｍｏｌスケールで、Ｌｉｂｅｒｔｙ　Ｂｌｕｅマイクロ波ペプチド合成器（ＣＥＭ）を使用して合成した。カップリングは、ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ、５ｍＬ）中、５×アミノ酸、４．５×ＰｙＢＯＰおよび１０×ジイソプロピルエチルアミンを使用して実施した。脱保護は、ＤＭＦ中、２０％のピペリジンを使用して実施した。ペプチドは、９０℃で５分間、ＤＭＦ中、３×無水酢酸、４．５×ジイソプロピルエチルアミンによる最終反応によってＮ末端にキャップした。ラクタム化ペプチドでは、関連ＫおよびＤ位が、Ｌｙｓ（Ｍｔｔ）およびＡｓｐ（Ｏ－２－ＰｈｉＰｒ）の使用によって直交性に保護された。これらの残基の側鎖は、ジクロロメタン（ＤＣＭ）×３、ＤＣＭ中２％トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）×１０、ＤＣＭ　３×次いでＤＭＦ　３×によってレジンを洗浄することにより、選択的に脱保護した。新しく脱保護した側鎖は、６０℃で５時間、ＰｙＢＯＰ（１ｍＬ）、ジイソプロピルエチルアミン（１ｍＬ）およびＤＭＦ（３ｍＬ）中でカップリングした。レジンを乾燥させ、６０℃で１６時間、第２の反応のために同じ試薬を添加した。室温で４時間、切断混合液（９５％　ＴＦＡ、２．５％トリイソプロピルシラン、２．５％　Ｈ２Ｏ、１０ｍＬ）中でのインキュベーションは、レジンからペプチドを切断し、側鎖保護基を除去する。レジンは、濾過によって除去し、切断したペプチドは、－８０℃でジエチルエーテル中に沈殿させ、遠心分離した。このペレットは、ジエチルエーテルによりさらに４回洗浄した後、室温で終夜乾燥させた。ペプチドは、３：１の水：アセトニトリル中に再懸濁した後、水：アセトニトリル勾配（０．１％　ＴＦＡ）を使用するＪｕｐｉｔｅｒ　Ｐｒｏｔｅｏカラム（４μｍ粒子径、９０Å孔径、２５０×１０ｍｍ；Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ）によるＲＰ－ＨＰＬＣを使用して精製した。ペプチド質量および純度（＞９５％）は、エレクトロスプレーイオン化マススペクトロメトリーによって確認した。

【０１９３】

円二色性（ＣＤ）：１ｍｍ経路長のＣＤセル中、２００μＬの試料によるＣＤ測定のため、Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｐｈｏｔｏｐｈｙｓｉｃｓ社製Ｃｈｉｒａｓｃａｎを使用した。タンパク質／ＤＮＡ試料を、ｐＨ７．４の、１５０ｍＭリン酸カリウム、１５０ｍＭフッ化カリウム、および５ｍＭ　ＴＣＥＰ中に懸濁し、測定前に３０分間平衡化した。全スペクトロにつき、１９０ｎｍと２６０ｎｍの間（ＤＮＡ結合実験では２６５～３２０ｎｍ）の３回のスキャンは１ｎｍのバンド幅で回収し、０．５ｓ－１の速度でデータをサンプルした。これらのスキャンを平均し、モル残基楕円率（ＭＲＥ）に変換した。熱変成実験は、１℃増加で１～９０℃の勾配にわたり２２２ｎｍでの楕円率を測定することにより実施した。２０℃での融解後スキャンは、融解前スキャンの１０％以内にオーバーレイした場合、転移が可逆的であることを確認した。生じる熱変成曲線は、ＭＲＥへと変換され、ギブズ－ヘルムホルツ式の改変に由来する二状態モデルにフィットさせ、融解温度（T_m）を決定した（Ｍａｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，　２００７）。

【０１９４】

血清安定性：ペプチドストック（６００μＭ）は、水中で調製し、５０μＬを９５０μＬのヒト血清（Ｍｅｒｃｋ）に添加した後、３７℃でインキュベートした。１００μＬのアリコットを指定した時点で除去し、３００μＬの３：１　アセトニトリル：水に添加し、遠心分離した（１８０００×ｇ、１５分）。ＬＣ－ＭＳによって上澄み液を解析し、２つの最大荷電状態強度の合計を使用して定量した（１：９＋、１０＋；２３，２４：３＋

，４＋）。

【０１９５】

等温滴定熱量測定（ＩＴＣ）：ペプチドは、ｐＨ７．４の、１０ｍＭリン酸カリウム、１５０ｍＭフッ化カリウム、および５ｍＭ　ＴＣＥＰからなるＩＴＣ緩衝液を使用して、ＰＥＡＱ－ＩＴＣ（Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）を使用するＩＴＣによって試験した。２５～２００μＭのアンタゴニストペプチドの２μＬ注入液を、２．５～２０μＭでｃＪｕｎを含有する細胞へと注入した。ソフトウェアを使用して、添加時の熱変化を記録および解析した。対照実験は、ＩＴＣ緩衝液のみを含有する細胞へのアンタゴニストペプチド試料の注入を含み、差し引かれる希釈の熱を決定した。生じる結合データを、ｏｎｅ　ｓｉｔｅ結合モデルにフィットし、結合のエンタルピー変化（ΔＨ）および平衡結合定数（ＫＤ）を抽出し、そこから結合の自由エネルギー変化（ΔＧ）および結合のエントロピー変化（ΔＳ）を算出した（Ｗｉｓｅｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，　１９８９）。熱力学パラメーターは２つの独立した実験の平均として示され、エラーは、一標準偏差として与えられた。

【０１９６】

２．２　酸性／Ｎ末端トランケーション

本セクションで使用および記載した様々なペプチドの要約を以下の表５に提供する。

【０１９７】

【表６】

ペプチド#	酸性-ZIP配列
	defgabcdefg***abcdefg***abcdefg***abcdefg***abcdefg***abcdefg***abcdefg***abcd***
1	MAS***LEQR***AEELARE***NEELEKE***AEELVVE***EDVLEEE***IEQLEER***NYALRKE***IEDLQKQ***LEKL***GAPHHHHHH
2	Ac-LARE***NEELEKE***AEELVVE***EDVLEEE***IEQLEER***NYALRKE***IEDLQKQ***LEKL***-NH_2
3	Ac-***LEKE***AEELVVE***EDVLEEE***IEQLEER***NYALRKE***IEDLQKQ***LEKL***-NH_2
4	Ac-***E***AEELVVE***EDVLEEE***IEQLEER***NYALRKE***IEDLQKQ***LEKL***-NH_2
5	Ac-LVVE***EDVLEEE***IEQLEER***NYALRKE***IEDLQKQ***LEKL***-NH_2
6	***EDVLEEE***IEQLEER***NYALRKE***IEDLQKQ***LEKL***GAP-NH_2
7/8	Ac-LVVE***EDVLEEE***IEQLEEK***NKALKDE***IEDLQKQ***LEKL***Y-NH_2
9/10	Ac-LVVE***EDVLEEE***IEQLEER***NYALRKE***IEDLQKQ***LEDL***-NH_2
11	Ac-***E***AEELVVE***EDVLEEE***IEQLEER***NYALRKE***IEDLQKQ-NH_2
12/13	Ac-***KE***AEDLVVE***EDVLEEE***IEQLEER***NYALRKE***IKDLQDQ-NH_2
14/15	Ac-***E***AKELVDE***EDVLEEE***IEQLEER***NYALRKE***IEDLQKQ-NH_2
16/17	Ac-***E***AEELVVE***EKVLEDE***IEQLEER***NYALRKE***IEDLQKQ-NH_2
18/19	Ac-***E***AEELVVE***EDVLEEE***IKQLEDR***NYALRKE***IEDLQKQ-NH_2
20/21	Ac-***E***AEELVVE***EDVLEEE***IEQLEEK***NKALKDE***IEDLQKQY-NH_2
22/23	Ac-***E***AEELVVE***EDVLEEE***IEQLEER***NYALRKE***IKDLQDQ-NH_2
24	Ac-***E***AEELVVE***EKVLEDE***IEQLEER***NYALRKE***IKDLQDQ-NH_2
25	Ac-***E***AEELVVE***EDVLEEE***IEQLEER***NYALRKE***IEDL-NH_2
26/27	Ac-***E***AEELVVE***EDVLEEE***IEQLEEK***NKALKDE***IEDLY-NH_2
28/29	Ac-***E***AEELVVE***EDVLEEE***IEQLEER***NYALRKE***IEDLQ-NH_2

表5: 試験したペプチドの要約

【０１９８】

ｃＪｕｎ　ＤＢＤと１の合理的に設計した酸性ドメインの間の相互作用の正確な性質は未知である。したがって、酸性ドメインは、最適化のために最初に注目された。１は、繰返しトランケートされ（２～６）、ｃ－Ｊｕｎ結合およびｃ－Ｊｕｎ／ＴＲＥ　ＤＮＡアンタゴニズムへの影響を調べた。ペプチドのヘリックス性は、ペプチドのみの試料の２２２ｎｍでのＣＤシグナルを定量することにより決定した。次いで、熱変成実験を使用して

、ペプチド－ｃ－Ｊｕｎヘテロ二量体のＴｍを決定し、標的結合のおよその測定として使用した。ＣＤは、ｃ－Ｊｕｎ／ＴＲＥ　ＤＮＡ相互作用をアンタゴナイズするペプチドの機能的活性の能力を調べるためにも使用した。使用したＴＲＥ－ＤＮＡ構築物は、～２８１ｎｍで正のＣＤピークを産生し（結合時のＤＮＡの直接測定を可能にするこの波長でのｃ－Ｊｕｎ吸光度はない）、ｃ－Ｊｕｎ結合時に強度が減少する。これは、ＤＮＡ結合の割合の明確および直接測定を提供した。漸増濃度のアンタゴニストペプチドが試料に添加されると、遊離のＴＲＥ－ＤＮＡとのオーバーレイへとピークがシフトし戻る。これは、ヒルの式へと滴定データをフィットすることにより、ＩＣ$_{50}$値の算出を可能にした。これらの実験において必要なより高い濃度により（ＣＤで検出されるシグナルのため）、ＩＣ$_{50}$値は同様に高く、実験条件において２０μＭのｃＪｕｎがあり、最も低いＩＣ５０は１０μＭまで落ちる。したがって、これらの値は、本文中に取り入れられ、異なる方法によって産生された値と比較されるべきではないが、試験したアンタゴニスト間の比較のために本明細書において代わりに使用される。同じ６０アミノ酸のｃ－Ｊｕｎ　ｂＺＩＰ構築物は、アンタゴニストペプチド長に関わらず、全ての実験のために使用した。これらの実験により、標的結合および続く標的アンタゴニズムは両方ともｉｎ　ｖｉｔｒｏで迅速に特徴付けられた。

【０１９９】

試験した各ペプチドについて得られた熱変成（Ｔｍ）、機能的活性（ＩＣ$_{50}$　ＣＤ（μＭ））、ヘリックス性（ｆＨ（％））結果の要約は、以下の表６に提供する。

【０２００】

【表７】

ペプチド#	T_m(°C)	IC_{50} CD (μM)	fH (%)	トランケーション
1	71.2±1.4	13.4±0.6	27.2	-
2	68.5±1.1	16.6±0.5	32.8	NΔ10 CΔ3
3	67.9±0.9	33.7±2.8	38.3	NΔ17 CΔ3
4	64.1±1.5	45.4±3.6	45.5	NΔ20 CΔ3
5	62.8±1.0	78.2±4.1	46.7	NΔ24 CΔ3
6	55.1±1.1	129.8±13.0	38.0	NΔ28
7	64.3±1.3	83.9±6.2	45.6	NΔ24 CΔ3
8	67.2±0.8	73.5±5.2	54.2	NΔ24 CΔ3
9	62.1±1.4	94.6±7.4	43.0	NΔ24 CΔ3
10	68.3±0.9	69±4.1	46.8	NΔ24 CΔ3
11	57.1±0.9	82.1±6.0	37.3	NΔ20 CΔ7
12	56.5±1.6	115.0±13.4	38.7	NΔ19 CΔ7
13	58.5±1.0	92.5±3.4	40.1	NΔ19 CΔ7
14	57.5±1.1	100.4±3.9	36.9	NΔ20 CΔ7
15	59.4±1.0	81.1±5.7	39.2	NΔ20 CΔ7
16	54.9±1.2	113.6±10.8	37.2	NΔ20 CΔ7
17	64.0±0.8	74.9±4.1	42.6	NΔ20 CΔ7
18	55.5±1.7	98.9±5.1	37.0	NΔ20 CΔ7
19	60.9±3.6	94.4±4.5	38.7	NΔ20 CΔ7
20	56.2±1.3	120.8±17.3	36.0	NΔ20 CΔ7
21	58.9±1.0	94.1±6.0	38.5	NΔ20 CΔ7
22	55.6±1.2	100.8±3.7	35.0	NΔ20 CΔ7
23	65.0±1.4	52.7±2.0	43.4	NΔ20 CΔ7
24	63.2±1.3	44.9±2.1	47.1	NΔ20 CΔ7
25	44.8±1.2	1212.9±118.4	32.8	NΔ20 CΔ10
26	N.D.	1559.5±143.9	30.1	NΔ20 CΔ10
27	52.5±1.4	118.5±10.9	35.0	NΔ20 CΔ10
28	53.8±5.3	725±62.6	31.2	NΔ20 CΔ9
29	57.2±0.4	140±14.3	36.4	NΔ20 CΔ9

表 6: 熱変成、機能的活性、およびヘリックス性結果の要約

【０２０１】

一連（２～６）の全てのＮ末端トランケーションは、ペプチド／標的結合およびアンタゴニズム効果を減少させ、全長の酸性鎖がｃ－Ｊｕｎ／ＴＲＥ相互作用のアンタゴニズムに寄与することを示している（図１８）。しかしながら、一連の各トランケーションは、除去された残基あたりのアンタゴニズムへのますます大きな影響をもたらした。３つの完全ヘプタドＮ末端欠失を表す、１から２、２から３および３から５のトランケーションの精査は、それぞれ、１．２分の１、２分の１および２．３分の１へのアンタゴニズムの減少を明らかにする。予測されるように、ぞれぞれの続くヘプタドが欠失されるため、パーセンテージの減少は増加し、したがって、アンタゴニズムにより重要になる。さらに、５から６の、調べた最終のＮ末端トランケーションは、４つの残基のみを除去したにも関わらず、アンタゴニズムを１．７分の１へと減少させた。ペプチド６（ＮΔ２８）は、Ｈｉ

ｎｇｅW分子のＬＺのみの部分を表す。酸性ドメイン単独がｃ－Ｊｕｎをアンタゴナイズしうる可能性を試験するため、この部分単独も試験し、結合しないことを示した（データは示さない）。これは、酸性鎖およびＨｉｎｇｅWのＬＺドメインが相乗的に操作し、ｃ－Ｊｕｎに結合およびアンタゴナイズすることを示す。

【０２０２】

Ｎ末端のトランケートは、ヘリックス率（ｆＨ）の逐次的増加ももたらし、１の～２７％から５の～４７％まで上昇し、欠失した領域はＬＺ領域と比較してヘリックス性が低いことを示している。１のＬＺドメインは、ホモ二量体化することが公知である、その親配列、ＦｏｓWから最も未変化であった（Ｍａｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，　２００６）。酸性鎖の負電荷は、静電反発力を産生し、したがって、ホモ二量体化する傾向が減少し、それらの除去は、ホモ二量体化誘導性のヘリックス性を増加させる。しかしながら、５から６へのさらなるトランケーションは、この傾向を逆転させ、ｆＨを～３８．０％まで減少させるが、１つの酸性残基および３つの疎水性残基を除去し、ＬＺのみのドメインを残す。減少されるわずかなさらなる静電反発力があるが、この領域は、直接結合またはヘリックス誘導によるホモ二量体化に寄与するようである。

【０２０３】

全体的に、酸性鎖ドメインの除去（１～６）は、ｃＪｕｎ／ＴＲＥ　ＤＮＡアンタゴニズムを９．７分の１へと減少させた。先に、本発明者らは、ペプチド６（１３０μＭ）で観察されたのと同様のＩＣ$_{50}$値を有するペプチドのＴＢＳスクリーニング中のペプチド活性の非常に顕著な減少を観察し、６がｃＪｕｎ／ＴＲＥ　ＤＮＡ結合に完全には競合において勝てないことを意味する。これは、さらに、酸性鎖の設計の理論的根拠を支持し、５（ＩＣ５０＝７８μＭ、１より５．８×低いアンタゴニズム、および６より１．７×良い）は、Ｎ末端から進められる実行可能な最大のトランケーションと考えられうる。

【０２０４】

２．３　Ｎ末端トランケーションのラクタム化

ペプチド５は、次に、ｉ→ｉ＋４（ＫからＤ）ラクタム架橋を組み込むことにより最適化された。ラクタム架橋は、オルソゴナル保護基（Ｌｙｓ（Ｍｔｔ）およびＡｓｐ（Ｏ－２－ＰｈｉＰｒ））の使用によって組み込まれ、選択的に脱保護され（ＤＣＭ中２％トリフルオロ酢酸）および典型的な固相化学を使用して反応されうるが、ペプチドはレジンに結合したままである。反応の成功は、マススペクトロメトリー（ＭＳ）を使用して確認され、直鎖状の未反応のペプチドと比較して、水分子の欠如から質量の減少を観察した。この実施例では、ラクタムは、ヘリックスの結合表面の破壊を防ぐため、溶媒曝露されたｂ－ｆまたはｆ－ｃヘプタド位にのみ導入された。配列への点突然変異は、スプリットバッチ合成（ｓｐｌｉｔ　ｂａｔｃｈ　ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ）によって産生された各配列の直鎖状（７，９）と環状（８，１０）バージョンの両方とも、Ｋ残基とＤ残基の架橋を組み込むために必要であった。

【０２０５】

環状ペプチド８および１０は、直鎖状の相対物５と比較して、それぞれ１．８倍および１．９倍にアンタゴニズムを増加させる。側鎖のラクタム化反応は、高親和性結合へとつながるヘリックス性の増加をもたらす。～６７℃および～６８℃のＴ$_m$値によって示されるその結合が、相当する低ＩＣ$_{50}$値を産生しないこれらのペプチドに注目することは興味深い。Ｔ$_m$は、予測されるように、各ペプチドのＩＣ$_{50}$と逆に相関すると考えられうるが、傾向の変化のレベルがある（図１９）。ペプチド２および１０は、例えば、類似のＴ$_m$値を有するが、２は、ｃＪｕｎ／ＴＲＥ相互作用を、４倍より効果的にアンタゴナイズする。１０は、２よりもさらに１４個のＮ末端残基によってトランケートされた。これは、ＨｉｎｇｅWに使用した合理的設計原理の重要性を支持し、それにより、ペプチド５および７～１０において大部分の酸性鎖が除去され、ペプチド６ではその全てが除去されるように、ｃＪｕｎ　ｂＺＩＰの両ドメインの阻害は最も有効なアンタゴニズムを産生する。これは、ｃＪｕｎ　ＬＺに強く結合するように最適化されうるが、ＤＢＤもブロッキングすることによりｃＪｕｎを機能的にアンタゴナイズするそれらの能力が限定されるペ

プチドを生じる。
【０２０６】
４から５のトランケーションは、負電荷（ＥＡＥＥ）のブロックを除去し、アンタゴニズムの１．７分の１への減少を生じた。これは、正に荷電したｃＪｕｎ　ＤＢＤ表面と相互作用し、ならびに分子のヘリックス性を誘導し、分子の双極性を潜在的に安定化するために重要な領域を示す（Ｐａｃｅ　ｅｔ　ａｌ．，　１９９８；Ｓａｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，　１９８８）。これは、ＤＮＡと直接相互作用する特定の残基を示すＴＲＥ　ＤＮＡとのｃＪｕｎ　ＤＢＤの相互作用の研究と関係がある。この追加したブロックの中心の２残基（ＥＡＥＥ　－　１０から１１へと移行）は、ｃＪｕｎのＤＮＡとの相互作用に応じる位置で生じ、すなわち、これらはｃＪｕｎとＤＮＡの間の直接ブロックの形成を助ける。ＮΔ２０トランケーションは、したがって、ダウンサイジングと機能的活性の保持の間の最適なバランスと考えられうる。
【０２０７】
２．４　Ｃ末端のトランケーション
ペプチド１１は、したがって、ＮΔ２０トランケーションを利用し、Ｃ末端でもトランケートする最適化の次のステップであった。４から１１での４つのＣ末端残基の除去は、アンタゴニズムを１．８分の１へと減少させるが、２５を産生するＣ末端でのさらなるトランケーションは、１１と比較して１４．８分の１、４と比較して２６．７分の１へと、アンタゴニズムを大きく減少させた。２７および２９を産生するラクタム化により２５を最適化する試みは、それらがアンタゴニズムを顕著に改善し、有効であったが、それらは依然として１と比較して８．８分の１および１０．４分の１へのアンタゴニズムの減少を生じる。これらのラクタム化はペプチドにずっと大きな影響をもたらしたが、それらは依然としてさらなる研究のためには効果的ではないと考えられた。
【０２０８】
２．５　１１の最適化
ペプチド１１は、さらなる最適化のための足場として考えられ、１と比較してほぼ半数の残基を有するが、高レベルの機能的活性を保持している。ｉからｉ＋４位へのＫ－Ｄラクタム架橋は、異なる部位に系統的に組み込まれ、どの領域がヘリックス制約に最も受け入れられ、親和性および阻害の改善をもたらすか調べた。また、架橋するＫおよびＤ残基を調整する点突然変異により、直鎖状ペプチドと環状ペプチドの両方が産生された。ラクタム化からのヘテロ二量体ΔＴ$_m$は、１４／１５の～２℃から２２／２３の～９℃の範囲である。オリジナル親配列と比較することも有用であり、ヘテロ二量体ΔＴ$_m$は、１１／１３の～１℃から１１／２３の～８℃の範囲である。ｃ－Ｊｕｎ／ＴＲＥアンタゴニズムは、本研究において最も重要な測定であるが、２３のみがＩＣ$_{50}$の有意な改善をもたらし、１１の１．６分の１であることが示された（Ｐ＝０．００３）。ラクタムの使用により、２３は、４の４つのＣ末端残基をトランケートすることによって起こるアンタゴニズムの減少を回復する。
【０２０９】
ラクタム化のための各部位の好適性に関する情報は、このデータから集められうる。ペプチドのヘリックス率の変化は、１２／１３の～１％から２２／２３の～８％の範囲である。特定の部位におけるラクタム化によって誘導されるペプチドヘリックス性の増加と観察されるｃＪｕｎ／ＴＲＥアンタゴニズムの増加の間には関係がある。
【０２１０】
１７内のラクタム化は、アンタゴニズムの顕著な増加はもたらさなかったが（Ｐ＝０．２４）、その直鎖状形態１６から、ペプチドヘリックス性の～５％増加およびｃＪｕｎヘテロ二量体Ｔ$_m$の～９℃上昇をもたらした。２３のこの部位とラクタム化部位の間の距離により、二重ラクタム化ペプチドは２４を産生した。二重ラクタム化は、最良の単一ラクタム化ペプチドと比較して、～４％よりヘリックス性であり、ヘテロ二量体Ｔ$_m$の顕著な変化はないが、ＩＣ$_{50}$値の顕著な減少がある（Ｐ＝０．０２）ペプチドをもたらす。
【０２１１】

この研究から、最も有効なペプチドの選択は、ＩＴＣによって調べられ、標的ｃＪｕｎとのそれらの相互作用の熱力学的パラメーターを定量した（図２０、表７）。ＣＤ実験において最も有効である２つの単一ラクタムペプチドおよびこれらの両方を利用した二重ラクタムを試験し、親配列と比較した。１／ｃＪｕｎは、先にＩＴＣによって調べたが、高温では低K_Dを生じることが本明細書において報告された。調べた全ての相互作用はエンタルピー成分によって支配され、より小さい不利なエントロピー寄与が伴った。この不利なエントロピー成分は、２４／ｃＪｕｎ相互作用で最大であり、１７／ｃＪｕｎで最小であった。

【０２１２】

【表８】

	化学量論, n	K_D (nM)	ΔH (kJ mol^{-1})	ΔG (kJ mol^{-1})	$-T\Delta S$ (kJ mol^{-1})
1	0.93±0.01	0.21±0.03	-129.70±3.65	-56.27±0.75	73.43±3.70
4	0.91±0.04	91.1±24.80	-189.95±8.09	-40.50±0.48	149.5±8.10
11	0.95±0.09	1099.50±181.5	-25.06±3.40	-34.10±0.41	-8.95±3.42
17	1.20±0.02	69.55±7.83	-59.00±1.68	-40.86±0.28	18.14±1.70
23	0.97±0.02	86.55±16.97	-98.74±2.54	-40.42±0.49	58.37±2.59
24	1.05±0.01	9.69±3.95	-127.82±2.61	-45.81±1.01	82.01±2.80

表7: ITCからの熱力学パラメーターcJunペプチド相互作用。 熱力学パラメーターは、2つの独立した実験の平均として表し、エラーは1SDとして示す。

【０２１３】

１、２３および２４も、それらの血清安定性について試験し、トランケーションおよびラクタム化の効果を示した（図２１）。２４時間では、１は６７％分解され、２３は２１％分解され、２４は７％分解された。１のみが、指数関数型崩壊のモデルにフィットするために必要な指数関数型崩壊を示し、１８．９時間の半減期を示す。９６時間後、１に相当するピークが無いことがＭＳで観察された。この時点で、２３のピーク強度は依然としてそれらの開始値の１７％であり、２４は３５％であった。これは、非天然のラクタム架橋によって提供される安定性の増加を明確に示し、その効果は、２４が２３より安定であると蓄積される（Ｐ＝０．０３８）。

【０２１４】

２．５　結論

トランケーションおよびヘリックス誘導ラクタム化の体系的な研究により、合理的に設計した一連のペプチドが、ＨｉｎｇｅＷ（１）を調査および最適化するために合成された。１は、標準的な技術を使用して（すなわち、天然の化学ライゲーションなし）、ＳＰＰＳによっては得ることができないことが証明され、２および３のみが著しく低い収量で産生された。残りの小ペプチドは全て、ＳＰＰＳにより、同様のおよび高収率で産生された。組換え発現からＳＰＰＳへの移行に由来する産生効率の増加は、過小評価すべきではない。繰返しトランケーションおよび特徴付けのプロセスは、親配列の異なる部分の有効性を明確にし、最小の有効配列を導くためにどのくらいペプチドをトランケートすべきかについて注意深い検討を可能にする。この実施例では、重要な検討事項は、標的ｃ－Ｊｕｎへのペプチド結合が、ＴＲＥに結合した二量体ｃ－Ｊｕｎに競合において勝つことができるかどうかである。この相互作用は、K_D～１００～２００ｎＭを有するように様々に確立され、これより強い相互作用を維持することは重要な基準であると考えられた（Ｓｅｌｄｅｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１１）。１と６のＣＤアンタゴニズムデータの比較（図１８Ｂ）は、１が、ＴＲＥ　ＤＮＡピークをその未結合の強度に回復できることから、高ペプチド濃度でｃＪｕｎに結合するＤＮＡはないことが示されるので、この重要な検討事項を例示している。しかしながら、６は相互作用を阻害するが、直線が１に向かう傾向がなく、試料中に存在する６の量に関わらず、一部のｃ－Ｊｕｎ／ＴＲＥ　ＤＮＡ複合体が残る可能性がある。有効性および薬物様特徴の獲得の欠損と合成効率の間のバランスは定量が難しいが、データは、Ｎ末端から２０残基を除去する１から４のトランケーションを

提案した。４から１１のＣ末端におけるトランケーションも、それを超えるトランケーションが、ラクタム化さえも、ペプチドがｃ－Ｊｕｎ／ＴＲＥ　ＤＮＡ相互作用に競合において勝ちうるほどの結合を回復できない程度までペプチド有効性を弱めるので、支持された。

【０２１５】

Ｎ末端におけるトランケーションの許容可能な程度は、この酸性ドメインがｃ－ＪｕｎＤＢＤのブロッキングに重要であるため、結合親和性検討事項を超えるようである。ペプチド５～１０は、もはや、ｃ－Ｊｕｎ　ＤＢＤへのＤＮＡ結合を効果的に防止できない、すなわち、これらのアンタゴニストペプチドがそのＬＺドメインに結合しているとき、ｃＪｕｎは、単量体としてＴＲＥ部位に依然として結合しうる。しかしながら、有効なアンタゴニズムは、ｃＪｕｎ　ＤＢＤの全長への結合を必要としない。特定のｃ－Ｊｕｎ　ＤＢＤアミノ酸側鎖とＴＲＥ　ＤＮＡ塩基の間の特定の接触が公知であり、これらのｃＪｕｎ残基のいずれかに結合するアンタゴニストがｃ－Ｊｕｎ／ＴＲＥ結合を顕著に減少させ、全長ＤＢＤへの結合は高レベルの阻害を維持するのに必要とされないと仮定されうる（Ｇｌｏｖｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，　１９９５；Ｓｅｌｄｅｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１１）。したがって、ペプチド４は、許容可能な最大のトランケーションであるようであり、ｃ－Ｊｕｎ　ＤＢＤのＤＮＡとの相互作用を直接ブロックしうるまでＮ末端を伸長し、決定的まことに、ＤＢＤを引きつけＤＮＡを遠ざけるようにこの領域において負に荷電した残基のブロックを提示する。ＥＡＥＥ残基の付加により、４は、５と比較してわずかにホモ二量体化が減少し、より良好なアンタゴニズムを有する。

【０２１６】

ほぼ半分の長さの１が除去され、高レベルの有効性を保持した２４を産生した。α－ヘリックスコイルドコイル構造および水素結合ネットワークの性質により、ペプチドの二量体パートナーへの結合に含まれない残基は、依然としてヘリックス性の導入によって結合に影響しうる。さらに、本明細書で研究したペプチドのヘリックス性は、例えばホモ二量体、単量体およびヘテロ二量体間など、様々な二量体化の平衡を考慮されなければならず、ヘリックス性の増加をもたらす傾向のあるいずれかの二量体化イベントが増加する。α－ヘリックスの長さの減少は、除去した残基が構造を破壊しない（例えば、それがプロリンまたはグリシンを含有する場合）か、またはいずれかの二量体結合パートナーを遠ざけない（例えば、静電反発力）限り、そのヘリックス性を減少させる傾向がある。

【０２１７】

１から２４のペプチドヘリックス性の２０％増加は、ペプチド血清安定性の増加をもたらした。全長１のＮ末端領域は、特に、非ヘリックス性のようであり、標的アンタゴニズムを改善せず、それらの除去は、ペプチド有効性に顕著に影響せずに安定性を増加させた。環状化はペプチドヘリックス性を増加させ、プロテアーゼ認識を減少させ、ペプチド血清安定性を増加させる。２４における第２のラクタムの付加は、この安定性をさらに増加させるが、安定性の増加は、第１のラクタムの付加よりも小さい。ラクタム化ペプチドのペプチド分解は、ゆっくりすぎるため、指数関数的崩壊関数にフィットされない。

【０２１８】

特定のラクタム隣接残基は、任意の所与の位置において、他よりもラクタムの適応およびヘリックス構造の適用により適しうる。ヘリックス構造を適用するためどのようにペプチドをフォールドするかもラクタムの効果に影響し、例えば、ヘリックスフォールドがペプチドの一端から他へと増えるようであり、次いで、ラクタムの効果は、それらが位置するフォールディングのこの遺伝子座にどのくらい近いかによって変わるようである。

【０２１９】

ＩＴＣによって観察された結合の熱力学パラメーターは、エントロピー成分に関して、わずかに予期しない結果を示す。ラクタム架橋の導入は、ペプチド分子を、エントロピーペナルティにより標的へと結合しうるそのヘリックス構造へと事前構築することにより結合親和性を増加させることが通常仮定される。ＩＴＣによって調べた全てのペプチドは、不利なエントロピー成分を有するが、１７は、この成分からの寄与が著しく低い。この場

合、結合のエントロピーペナルティは、ｃＪｕｎ結合表面に相補性であるヘリックスフォールドへとペプチドを事前構築することによって減少される。しかしながら、２３、および特に２４について、エントロピー成分からの大きな不利な寄与がある。これは、側鎖環状化からの標的結合親和性の増加が、改善されたエンタルピー相互作用によっても生じうることを示す。

【０２２０】

実施例３　－　ＨｉｎｇｅＷビスアルキル化

ラクタム化に反対して、ビスアルキル化を使用して環状化されうるさらなるペプチドＨｉｎｇｅＷバリアントを同定するため、ｃＪｕｎアンタゴニスト配列ＥＡＥＥＬＶＶＥＥＤＶＬＥＥＥＩＥＱＬＥＥＲＮＹＡＬＲＫＥＩＣＤＬＱＣＱ（配列番号２８）のバリアントは、実施例１に記載のＴＢＳライブラリースクリーニングを使用してスクリーニングされた。スクリーニングは、以下の表８に記載の配列を同定した。

【０２２１】

【表９】

ペプチドバリアント	配列
0W	EAEELVVEEDVLEEEIEQLEERNYALRSEICSLQCQ (配列番号37)
orthoDBMBW	EAEELVVEEDVLEEEIEQLEERNYALRKEICELSCQ (配列番号37)
metaDBMBW	EAEELVVEEDVLEEEIEQLEERNYALRAEICNLSCQ (配列番号39)
paraDBMBW	EAEELVVEEDVLEEEIEQLEERNYALRTEICSLMCK (配列番号40)
tdbbDBMBW	EAEELVVEEDVLEEEIEQLEERNYALRAEICSLQCQ (配列番号41)

表８-メタDBMBによるビスアルキル化に好適なHingeWバリアント

【０２２２】

表８に列挙した５つの配列の他に、０ＷおよびメタＤＢＭＢＷは、ｍＤＢＭＢによるビスアルキル化を使用して環状化され、直鎖状および環状形態の機能的活性は、ＣＤアッセイで試験され、結果およびＣＤ曲線を図２３に示す。図２３は、環状メタＤＢＭＢＷおよび０Ｗは、それらの直鎖状相対物と比較して、ｃ－Ｊｕｎ標的結合を改善し、これは表９に示すように、環状バリアントの低いＩＣ５０に反映されることを示す。

【０２２３】

【表１０】

ペプチドバリアント	IC_{50} (μM)
0W直鎖状	86.7±4.4
0W環状	77.6±6.5
メタDBMBW直鎖状	91.1±8.6
メタDBMBW環状	61.5±1.9

表9: 列挙したペプチドバリアントの機能的活性 (IC_{50} CD)。エラーは標準偏差 (SD)である。

【０２２４】

参考文献

本発明および本発明が属する最先端をより完全に記載および開示するため、多くの論文が、上記に引用される。これらの参考文献の完全な引用を以下に提供する。これらの参考

文献の各々の全体が本明細書に組み込まれる。

Ahn et al., A dominant-negative inhibitor of CREB reveals that it is a general mediator of stimulus-dependent transcription of c-fos. Mol Cell Biol 18, 967-977 (1998).
Alani et al., The transactivating domain of the c-Jun proto-oncoprotein is required for cotransformation of rat embryo cells. Mol Cell Biol 11, 6286-6295 (1991).
de Araujo, et al., Comparative α-helicity of cyclic pentapeptides in water. Angew Chem Int Ed Engl,. 53(27): p. 6965-9. (2014)
Azzarito, V. et al., Inhibition of α-helix-mediated protein-protein interactions using designed molecules. Nature chemistry, 5(3), 161-173. (2013)
Baxter et al., Library construction, selection and modification strategies to generate therapeutic peptide-based modulators of protein-protein interactions. Future Med Chem 6, 2073-2092 (2014).
Baxter et al., Exploiting Overlapping Advantages of In Vitro and In Cellulo Selection Systems to Isolate a Novel High-Affinity cJun Antagonist. ACS Chem Biol 12, 2579-2588 (2017).
Boysen et al., Role of interfacial hydrophobic residues in the stabilization of the leucine zipper structures of the transcription factors c-Fos and c-Jun. J Biol Chem 277, 23-31 (2002).
Brennan, et al., Selective antagonism of cJun for cancer therapy. J Exp Clin Cancer Res 39, 184 (2020).
Cabezas, E.; Satterthwait, A. C. J. Am. Chem. Soc., 121 , 3862. (1999)
Chen et al., Design of peptide inhibitors that bind the bZIP domain of Epstein-Barr virus protein BZLF1. J Mol Biol 408, 304-320 (2011).
Cody et al., Understanding the role of Leu22 variants in methotrexate resistance: comparison of wild-type and Leu22Arg variant mouse and human dihydrofolate reductase ternary crystal complexes with methotrexate and NADPH. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 61, 147-155 (2005).R. L.
Dai et al., Novel DNA bis-intercalation by MLN944, a potent clinical bisphenazine anticancer drug. J Biol Chem 279, 46096-46103 (2004).
Eckertet al., AP1 transcription factors in epidermal differentiation and skin cancer. J Skin Cancer 2013, 537028 (2013).
Eferl et al., AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. Nat Rev Cancer 3, 859-868 (2003).
Fanjul et al., A new class of retinoids with selective inhibition of AP-1 inhibits proliferation. Nature 372, 107-111 (1994).
Fairlie, D. P., & Dantas de Araujo, A.. Review stapling peptides using cysteine crosslinking. Biopolymers, 106(6), 843-852. (2016)
Fujimoto, K. et al. (2008) Development of a series of cross-linking agents that effectively stabilize alpha- helical structures in various short peptides. Chemistry 14(3):857-63.
Glover, J.N. and S.C. Harrison, Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. Nature, 1995. 373(6511): p. 257-61.
Haney, C.M. et al. Promoting peptide a-helix formation with dynamic covalent oxime side-chain cross-links. Chem Commun Camb).47(39):10915-7. (2011)
Heitz et al. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. Br J Pharmacol.157(2):195-206. (2009)

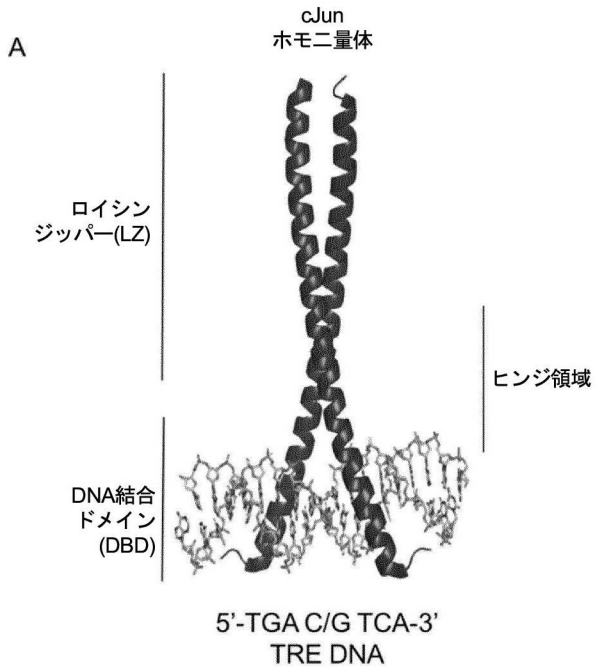
Holland-Nell, K.; Meldal, M. Maintaining biological activity by using triazoles as disulfide bond mimetics. Angew Chem Int Ed Engl. 50(22):5204-6. (2011)
Jain et al., A-ZIP53, a dominant negative reveals the molecular mechanism of heterodimerization between bZIP53, bZIP10 and bZIP25 involved in Arabidopsis seed maturation. Sci Rep 7, 14343 (2017).
Jo, H et al., Development of α-helical calpain probes by mimicking a natural protein-protein interaction. Journal of the American Chemical Society, 134(42), 17704-17713 (2012)
Jochim, A. L., & Arora, P. S. . Systematic analysis of helical protein interfaces reveals targets for synthetic inhibitors. ACS chemical biology, 5(10), 919-923. (2010)
John, R. et al., DNA binding of Jun and Fos bZip domains: homodimers and heterodimers induce a DNA conformational change in solution. Nucleic Acids Res 24, 4487-4494 (1996).
Kaplan et al., Increasing the affinity of selective bZIP-binding peptides through surface residue redesign. Protein Sci 23, 940-953 (2014).
Kowalczyk et al., Peptide Lipidation - A Synthetic Strategy to Afford Peptide Based Therapeutics. Peptides and Peptide-based Biomaterials and their Biomedical Applications. 1030: 185-227.(2017)
Lambert S. A. et al., The Human Transcription Factors. Cell 175, 598-599 (2018).
Lathbridge et al., Computational Competitive and Negative Design To Derive a Specific cJun Antagonist. Biochemistry 57, 6108-6118 (2018).
Leduc, A.M. et al. Helix-stabilized cyclic peptides as selective inhibitors of steroid receptor- coactivator interactions. Proc Natl Acad Sci U S A. 100(20):11273-8 (2003)
Lee T. I., Young R. A., Transcriptional regulation and its misregulation in disease. Cell 152, 1237-1251 (2013)
Mason et al., Semirational design of Jun-Fos coiled coils with increased affinity: Universal implications for leucine zipper prediction and design. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 8989-8994 (2006).
Mason et al., Improved stability of the Jun-Fos Activator Protein-1 coiled coil motif: A stopped-flow circular dichroism kinetic analysis. J Biol Chem,. 282(32): p. 23015-24. (2007)
Matthews et al., Dihydrofolate reductase. The stereochemistry of inhibitor selectivity. J Biol Chem 260, 392-399 (1985).
Muppidi, A. et al. Achieving cell penetration with distance-matching cysteine cross-linkers: a facile route to cell-permeable peptide dual inhibitors of Mdm2/Mdmx. Chem Commun (Camb). 47(33):9396-8. (2011)
Munoz et al., Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters. Nat Struct Biol 1, 399-409 (1994).
Olive et al., A dominant negative to activation protein-1 (AP1) that abolishes DNA binding and inhibits oncogenesis. J Biol Chem 272, 18586-18594 (1997).
Pace et al., A helix propensity scale based on experimental studies of peptides and proteins. Biophys J,. 75(1): p. 422-7. (1998)
Perry, Samuel R et al. “Contiguous hydrophobic and charged surface patches in short helix-constrained peptides drive cell permeability.” Organic & biomolecular chemistry vol. 16,3 (2018): 367-371.

Raj, M., Bullock, B. N., & Arora, P. S. . Plucking the high hanging fruit: a systematic approach for targeting protein-protein interactions. Bioorganic & medicinal chemistry, 21(14), 4051-4057 (2013)
Risse et al., Asymmetrical recognition of the palindromic AP1 binding site (TRE) by Fos protein complexes. EMBO J 8, 3825-3832 (1989).
Robertson, N. S., & Spring, D. R., Using Peptidomimetics and Constrained Peptides as Valuable Tools for Inhibiting Protein-Protein Interactions. Molecules (Basel, Switzerland), 23(4), 959. (2018)
Rodriguez-Martinez et al., Combinatorial bZIP dimers display complex DNA-binding specificity landscapes. Elife 6, e19272 (2017).
Ruan, F. et al. Metal ion-enhanced helicity in synthetic peptides containing unnatural, metal- ligating residues J. Am. Chem. Soc., 112 (25): 9403-9404 (1990)
Sali, D., M. Bycroft, and A.R. Fersht, Stabilization of protein structure by interaction of alpha-helix dipole with a charged side chain. Nature,. 335(6192): p. 740-3. (1988)
Seldeen et al, Evidence that the bZIP domains of the Jun transcription factor bind to DNA as monomers prior to folding and homodimerization. Arch Biochem Biophys480, 75-84 (2008).
Seldeenet al., Energetic coupling along an allosteric communication channel drives the binding of Jun-Fos heterodimeric transcription factor to DNA. FEBS J 278, 2090-2104 (2011).
Szaloki et al., Evidence for Homodimerization of the c-Fos Transcription Factor in Live Cells Revealed by Fluorescence Microscopy and Computer Modeling. Mol Cell Biol 35, 3785-3798 (2015).
Shaulian et al., AP-1 in cell proliferation and survival. Oncogene 20, 2390-2400 (2001).
Shiozawa, S. and K. Tsumiyama, Pathogenesis of rheumatoid arthritis and c-Fos/AP-1. Cell Cycle, 2009. 8(10): p. 1539-43.
Smith, Betsy A et al. “Minimally cationic cell-permeable miniature proteins via alpha-helical arginine display.” Journal of the American Chemical Society vol. 130,10 (2008): 2948-9.
Thillet et al., Site-directed mutagenesis of mouse dihydrofolate reductase. Mutants with increased resistance to methotrexate and trimethoprim. J Biol Chem 263, 12500-12508 (1988).
Timmerman et al., Rapid and quantitative cyclization of multiple peptide loops onto synthetic scaffolds for structural mimicry of protein surfaces. Chembiochem : a European journal of chemical biology, 6(5), 821-824. (2005)
Tsuchidaet al., Design, synthesis, and biological evaluation of new cyclic disulfide decapeptides that inhibit the binding of AP-1 to DNA. J Med Chem 47, 4239-4246 (2004).
Tyndall, et al., Proteases universally recognize beta strands in their active sites. Chem Rev,. 105(3): p. 973-99 (2005)
Walensky, L.D. et al. Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. Science. 305(5689):1466-70. (2004)
Wang, D. et al. Enhanced metabolic stability and protein-binding properties of artificial alpha helices derived from a hydrogen-bond surrogate: application to Bcl-xL. Angew Chem Int Ed Engl. 44(40):6525-9. (2005)
Wiseman, T., et al., Rapid measurement of binding constants and heats

of binding using a new titration calorimeter. Anal Biochem,. 179(1): p. 131-7. (1989)
Worrall, J. M. Mason, Thermodynamic analysis of Jun-Fos coiled coil peptide antagonists. FEBS J 278, 663-672 (2011).
Yung et al., Role of c-Jun N-terminal Kinase (JNK) in Obesity and Type 2 Diabetes. Cells, 2020. 9(3).

【図面】

【図１Ａ】



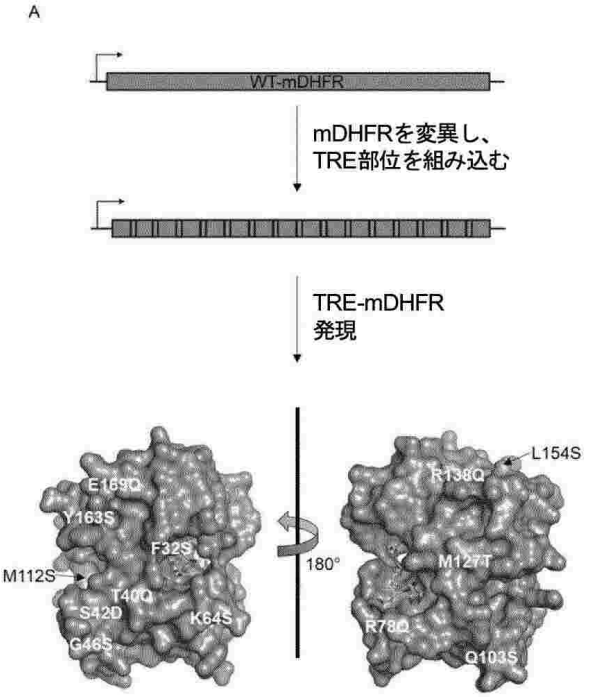
【図１Ｂ】



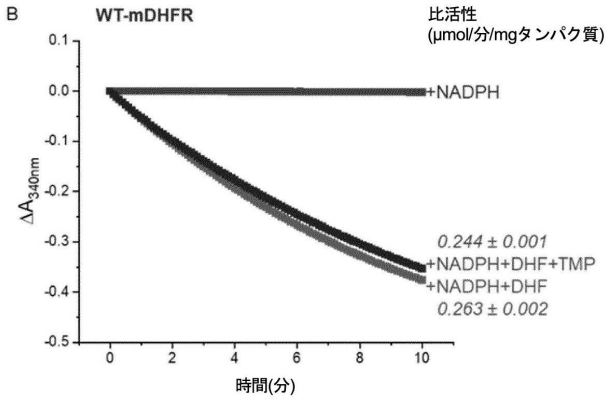
【図２】

```
 A   S   V   R   P   L   N   C   I   V   A   V   S   Q   N   M   G
GCT AGC GTT CGA CCA TTG AAC TGC ATC GTC GCC GTG AGT CAG AAT ATG GGG
 I   G   K   N   G   D   L   P   W   P   P   L   R   N   E   S   K
ATT GGC AAG AAC GGA GAC CTA CCC TGG CCT CCG CTC AGG AAT GAG TCA AAG
 Y   F   Q   R   M   T   Q   T   D   S   V   E   S   K   Q   N   L
TAC TTC CAA AGA ATG ACT GAC TCA GTT GAG TCA AAA CAG AAT CTG
 V   I   M   G   R   K   T   W   F   S   I   P   E   S   N   R   P
GTG ATT ATG GGT AGG AAA ACC TGG TTC TCC ATT CCT GAG TCA AAT CGA CCT
 L   K   D   R   I   N   I   V   L   S   Q   E   L   K   E   P   P
TTA AAG GAC AGA ATT AAT ATA GTT CTG AGT CAA GAA CTC AAA GAA CCA CCA
 R   G   A   H   F   L   A   K   S   L   D   D   A   L   R   L   I
CGA GGA GCT CAT TTT CTT GCC AAA AGT TTG GAT GAT GCC TTA AGA CTT ATT
 E   S   P   E   L   A   S   K   V   D   S   V   W   I   V   G   G
GAG TCA CCG GAA TTG GCG AGC AAA GTT GAC TCA GTT TGG ATC GTC GGA GGC
 S   S   V   Y   Q   E   A   M   T   Q   P   G   H   L   R   L   F
AGT TCT GTT TAC CAG GAA GCC ATG ACT CAA CCA GGC CAC CTT AGA CTC TTT
 V   T   Q   I   M   Q   E   F   E   S   D   T   F   F   P   E   I
GTG ACT CAG ATC ATG CAG GAA TTT GAG TCA GAC ACG TTT TTC CCA GAA ATT
 D   S   G   K   Y   K   L   L   P   E   S   P   G   V   L   S   Q
GAC TCA GGG AAA TAT AAA CTT CTC CCT GAG TCA CCA GGC GTC CTG AGT CAG
 V   Q   E   E   K   G   I   K   Y   K   F   E   V   Y   E   K   K
GTC CAG GAG GAA AAA GGC ATC AAG TAT AAG TTT GAA GTC TAC GAG AAG AAA
 D   *   A   *
GAC TAA GCT TAA
```

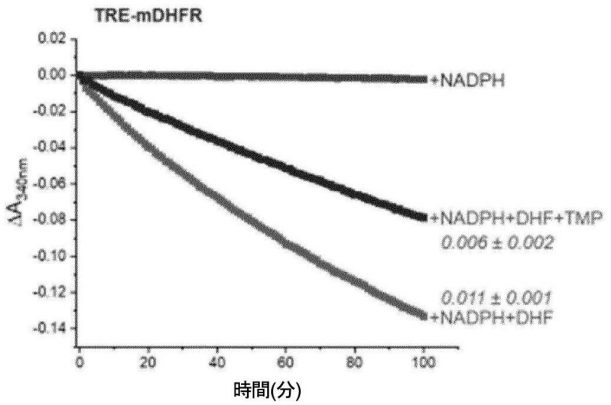
【図３Ａ】



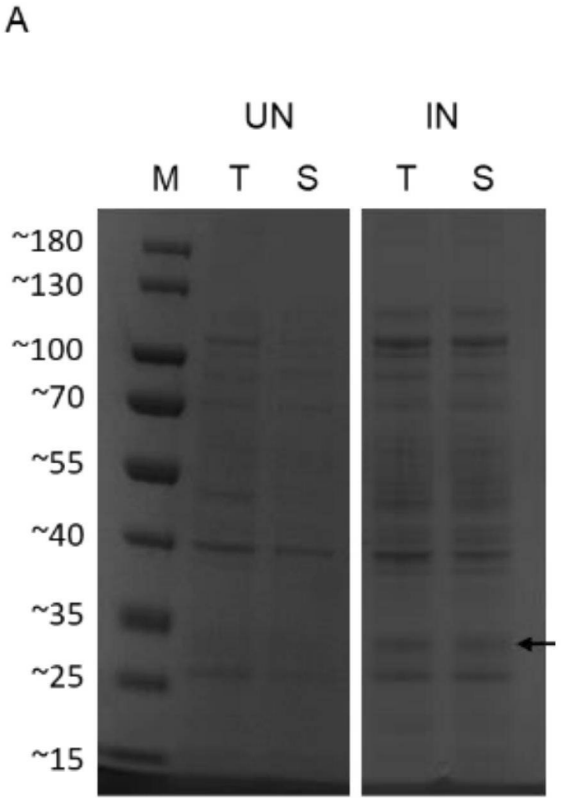
【図３Ｂ】



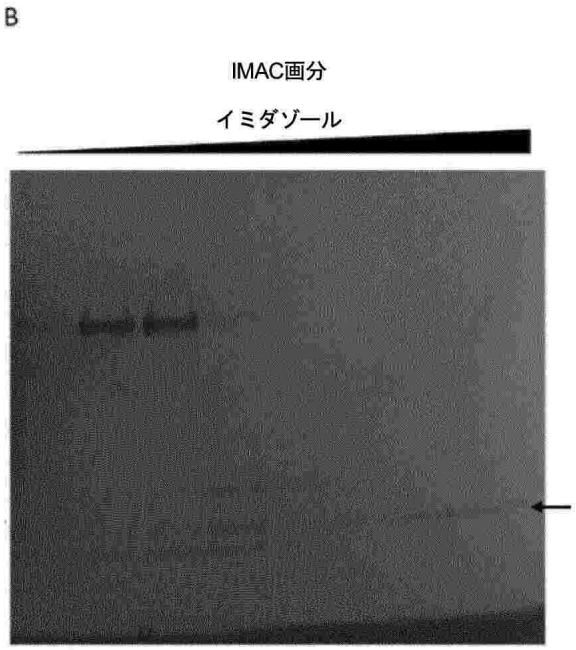
【図３Ｃ】



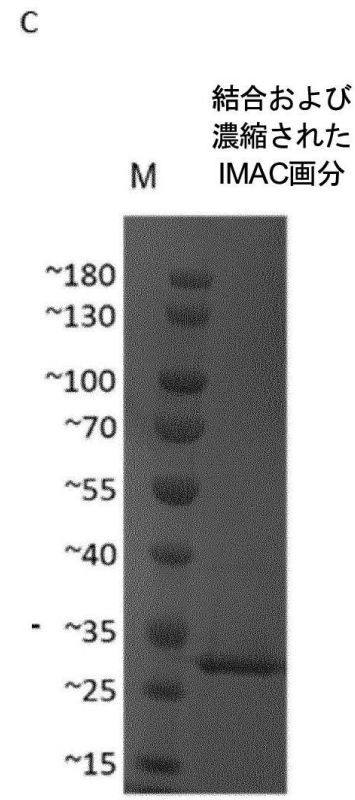
【図４Ａ】



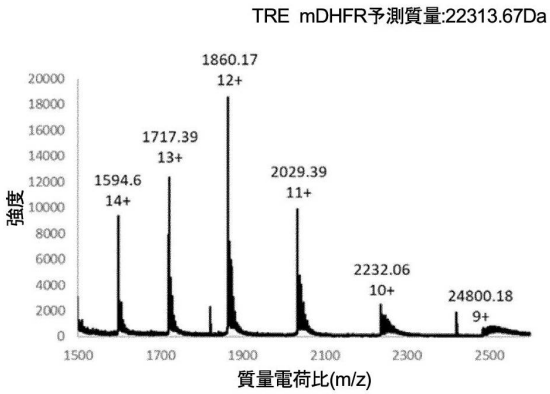
【図４Ｂ】



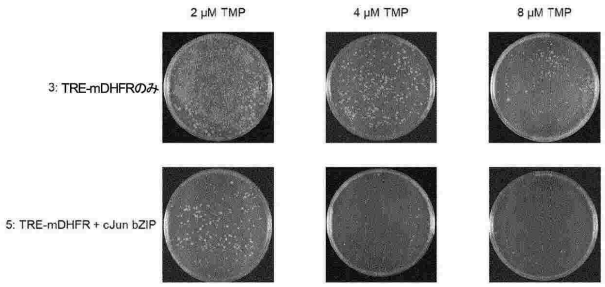
【図４Ｃ】



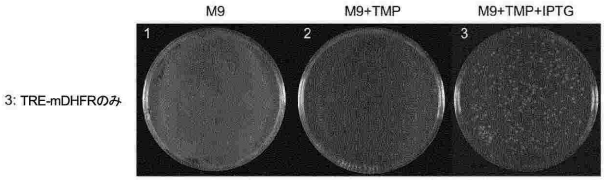
【図４Ｄ】



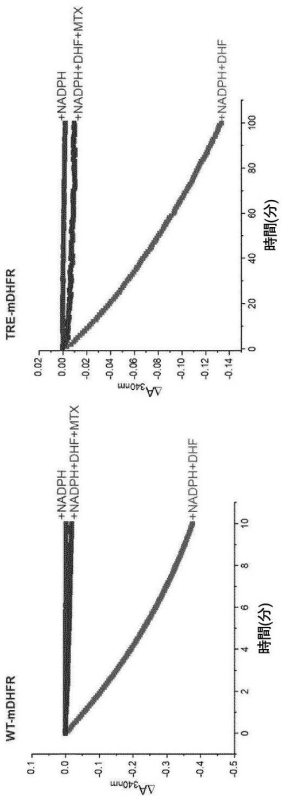
【図５】


2 μM TMP
4 μM TMP
8 μM TMP
3: TRE-mDHFRのみ
5: TRE-mDHFR + cJun bZIP

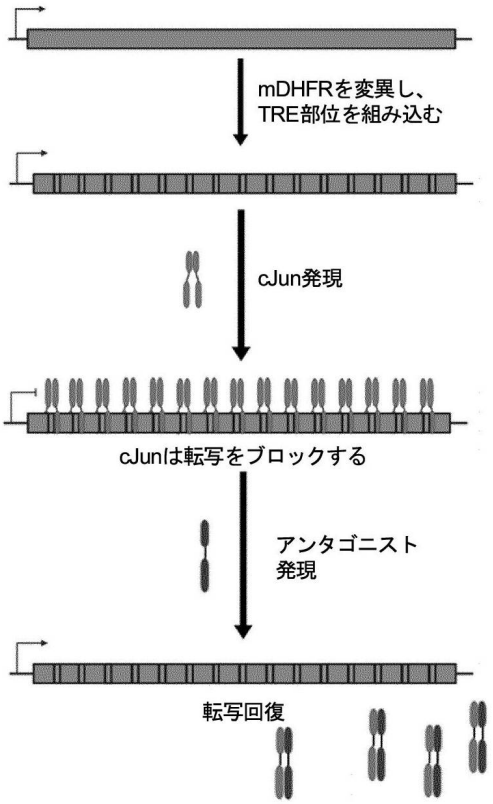
【図６】


M9
M9+TMP
M9+TMP+IPTG
1
2
3
3: TRE-mDHFRのみ

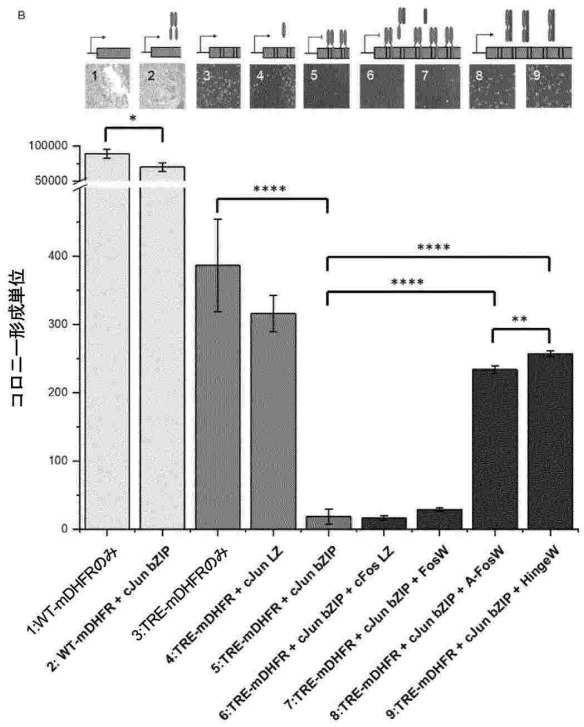
【図７】


TRE-mDHFR
+NADPH
+NADPH+DHF+MTX
+NADPH+DHF
時間(分)
WT-mDHFR
+NADPH
+NADPH+DHF+MTX
+NADPH+DHF
時間(分)

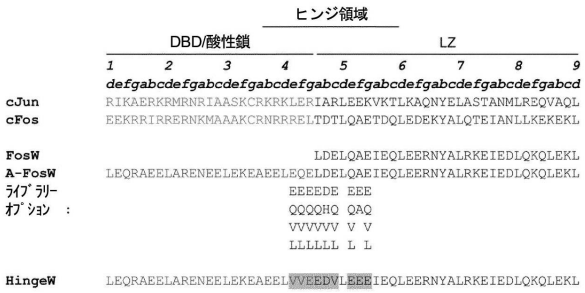
【図８Ａ】


mDHFRを変異し、
TRE部位を組み込む
cJun発現
cJunは転写をブロックする
アンタゴニスト
発現
転写回復

【図８Ｂ】



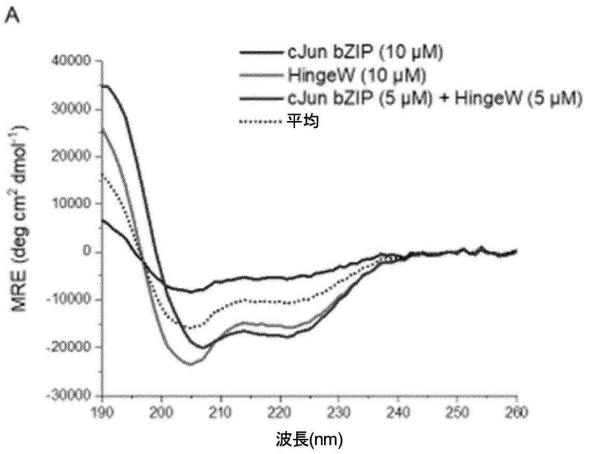
【図９】



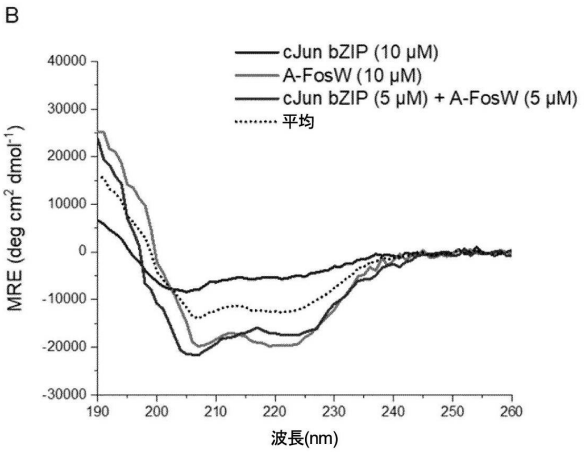
【図１０】



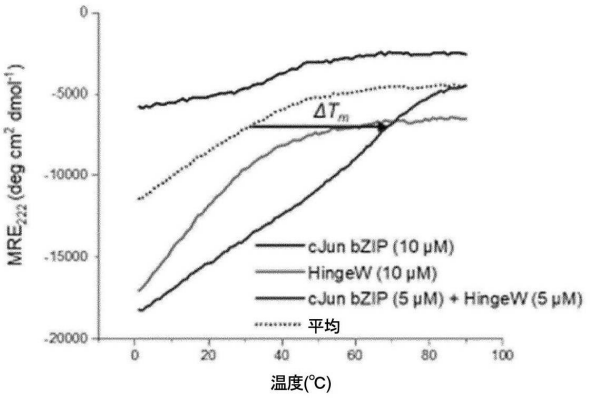
【図１１Ａ】



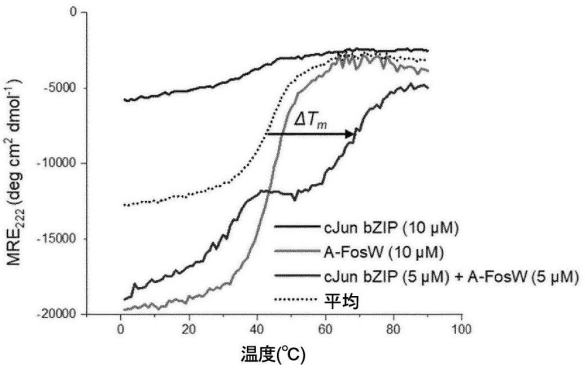
【図１１Ｂ】



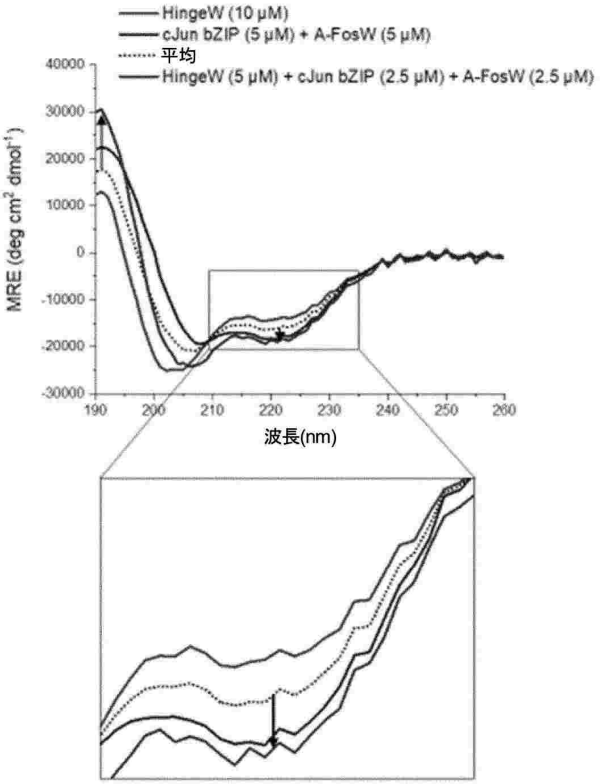
【図１１Ｃ】



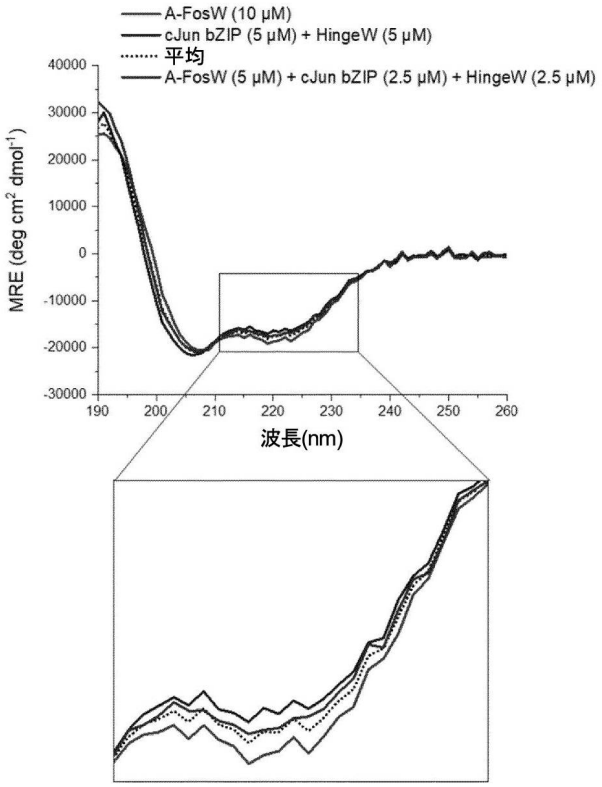
【図１１Ｄ】



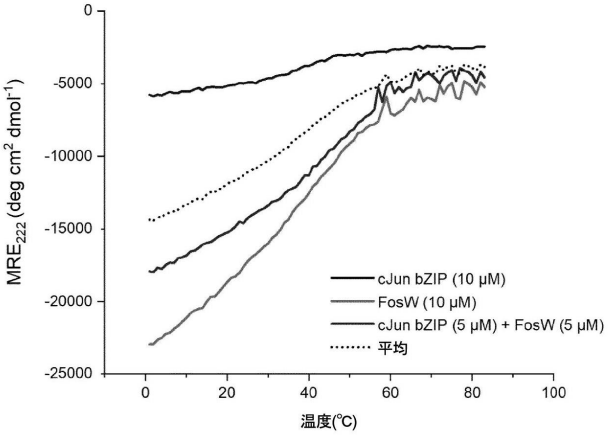
【図１１Ｅ】



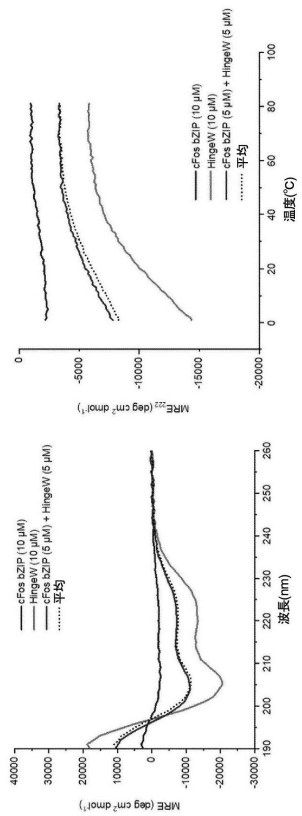
【図１１Ｆ】



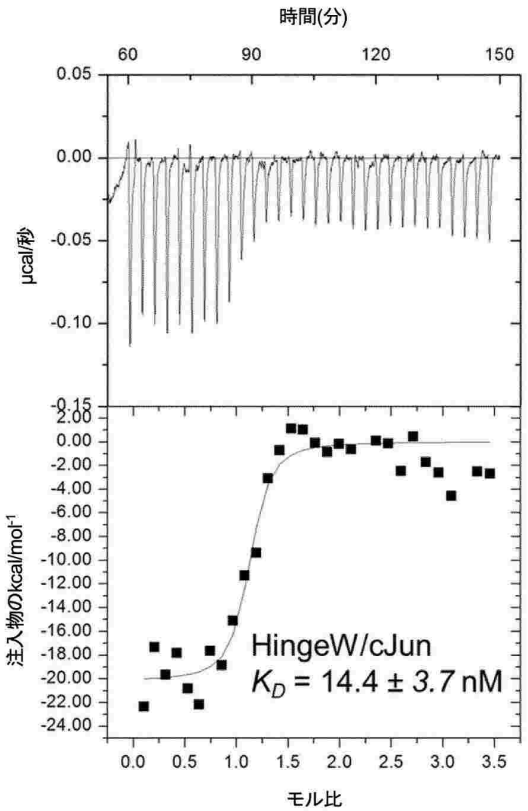
【図１２】



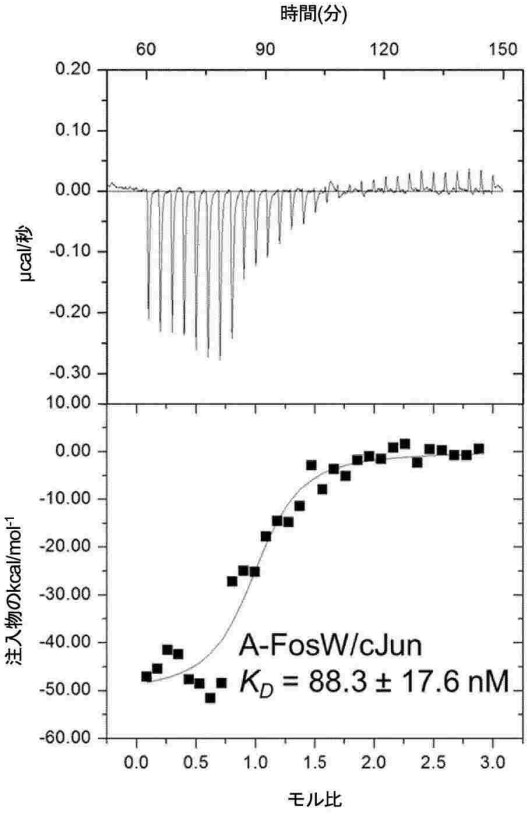
【図１３】



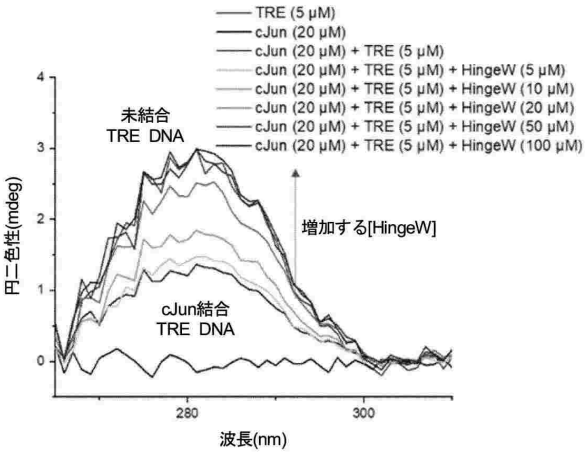
【図１４Ａ】



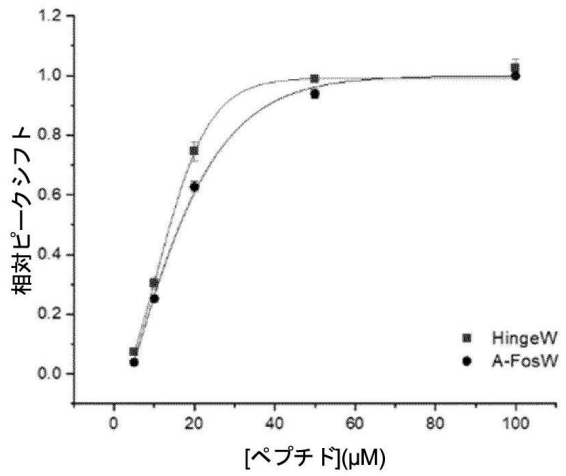
【図１４Ｂ】



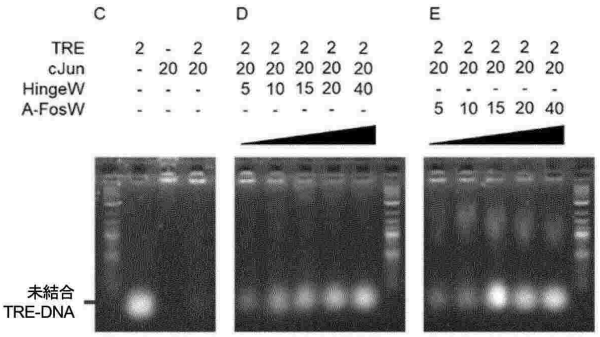
【図１５Ａ】



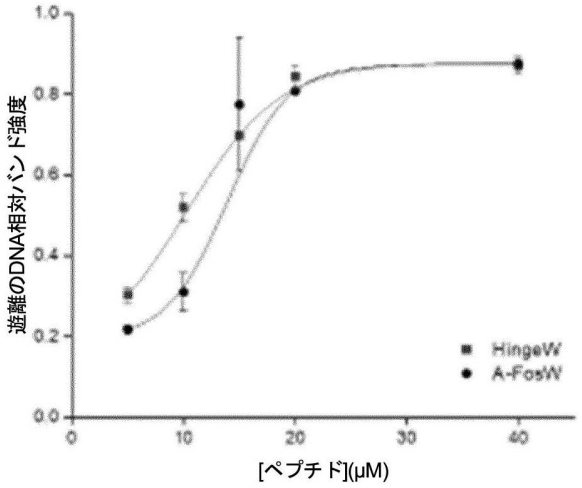
【図１５Ｂ】



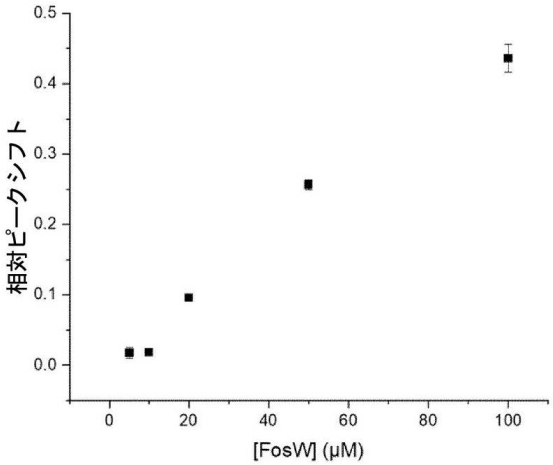
【図１５ＣＤＥ】



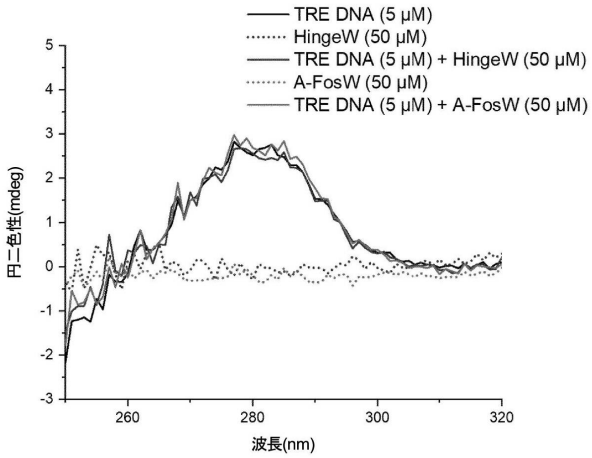
【図１５Ｆ】



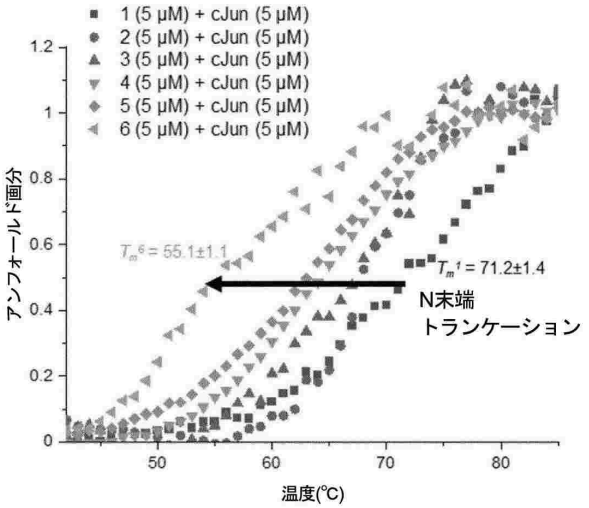
【図１６】



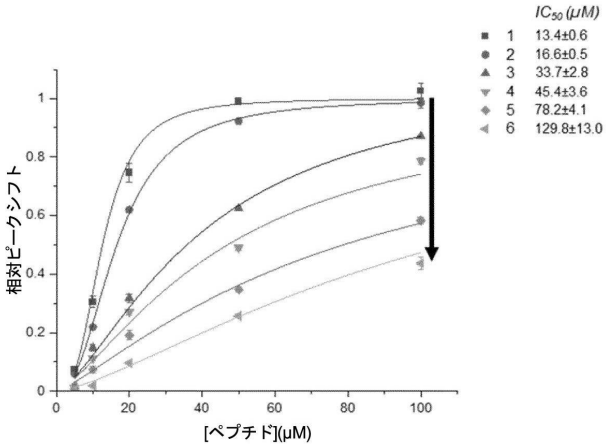
【図１７】



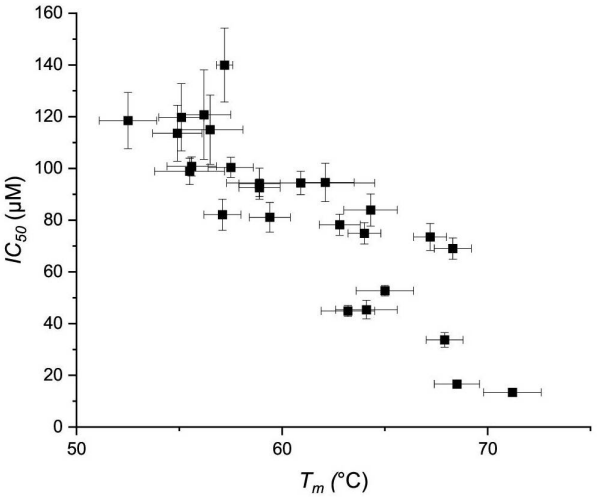
【図１８Ａ】



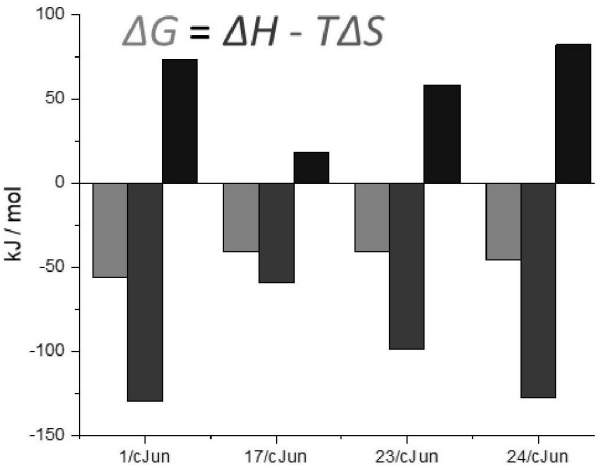
【図１８Ｂ】



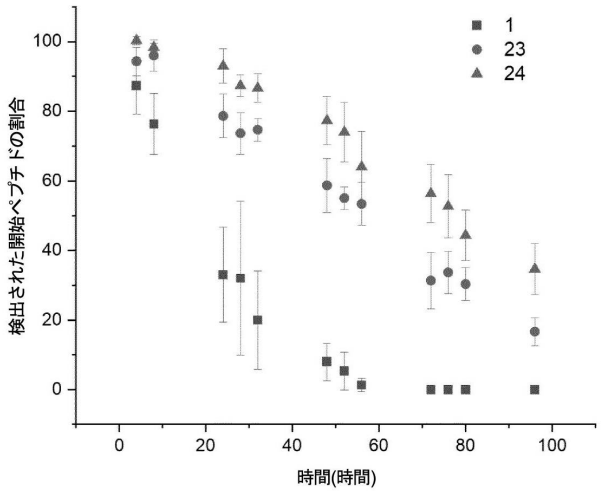
【図１９】



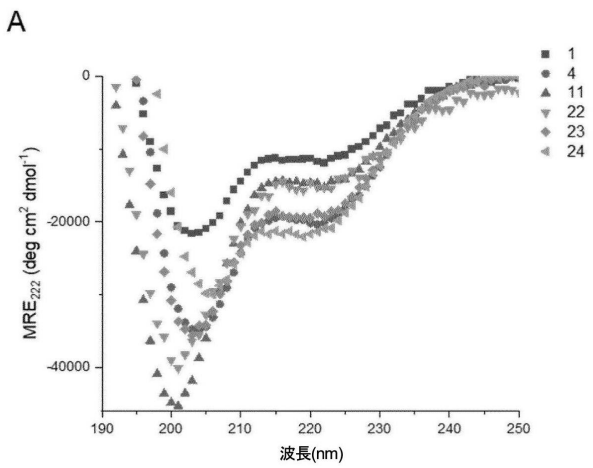
【図２０】



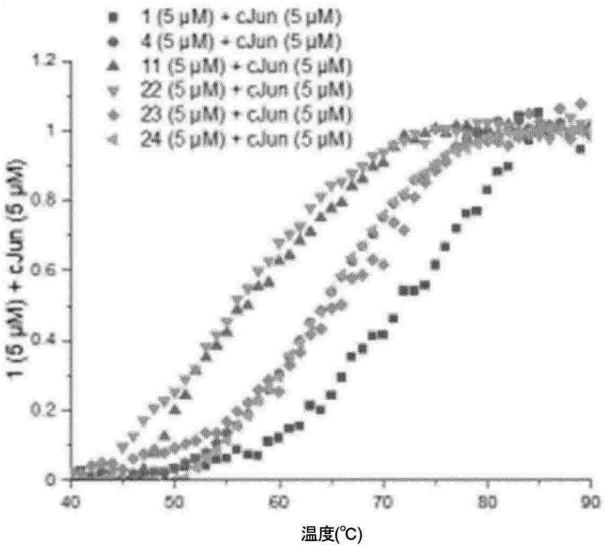
【図２１】



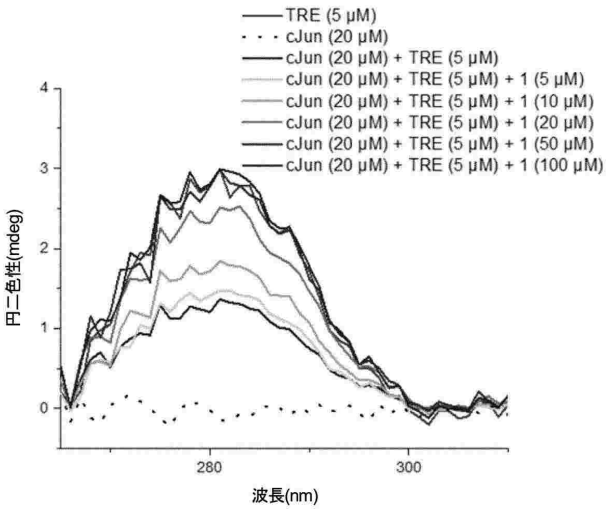
【図２２Ａ】



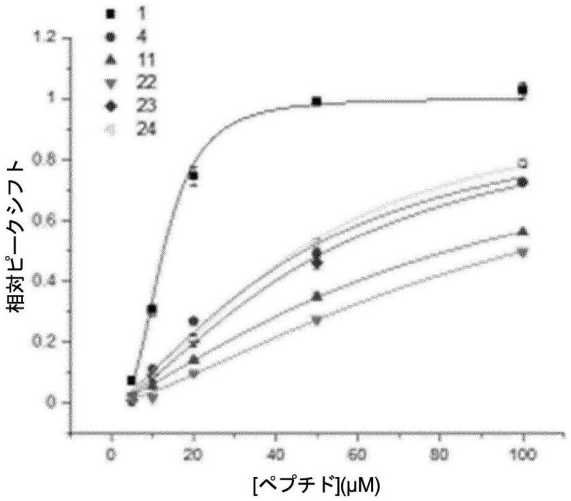
【図２２Ｂ】



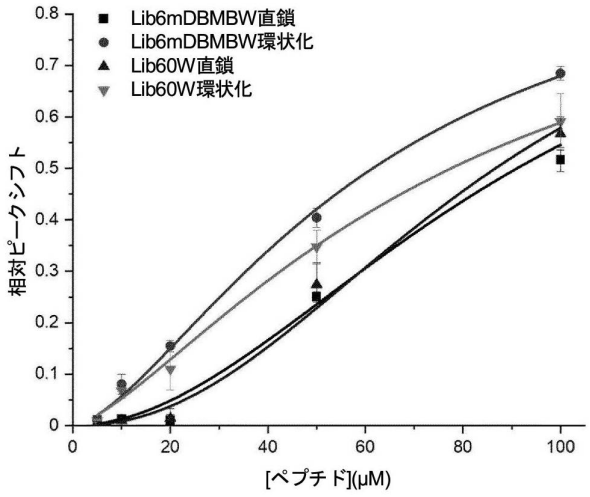
【図２２Ｃ】



【図２２Ｄ】



【図２３】



【配列表】

2025510591000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/056243

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/82 A61P3/10 A61P9/00 A61P19/02 A61P25/28
A61P35/00 A61P37/00
ADD. A61K38/00 C07K19/00
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61P A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, CHEM ABS Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BAXTER DANIEL ET AL: "Exploiting Overlapping Advantages of In Vitro and In Cellulo Selection Systems to Isolate a Novel High-Affinity cJun Antagonist", ACS CHEMICAL BIOLOGY, vol. 12, no. 10, 20 October 2017 (2017-10-20), pages 2579-2588, XP093052321, ISSN: 1554-8929, DOI: 10.1021/acschembio.7b00693 cited in the application abstract; figures 1-4; table 1 -/--	1-25

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
8 June 2023	16/06/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Schmidt-Yodlee, H

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/056243

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	-& Baxter D Et Al: "Supporting Information- Exploiting Overlapping Advantages of In Vitro and In Cellulo Selection Systems to Isolate a Novel High-Affinity cJun Antagonist", , 20 October 2017 (2017-10-20), XP093052325, Retrieved from the Internet: URL:https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acschembio.7b00693 [retrieved on 2023-06-06] figure S1; tables S2, S5 -----	1-25
A	WO 2006/017913 A1 (PHYLOGICA LTD [AU]; WATT PAUL MICHAEL [AU] ET AL.) 23 February 2006 (2006-02-23) claims 29-82; examples 9-18 -----	1-25
A	NIKOLAEV YAROSLAV ET AL: "The Leucine Zipper Domains of the Transcription Factors GCN4 and c-Jun Have Ribonuclease Activity", PLOS ONE, vol. 5, no. 5, 21 May 2010 (2010-05-21), page e10765, XP093051961, DOI: 10.1371/journal.pone.0010765 the whole document -----	1-25
A	BRENNAN ANDREW ET AL: "Selective antagonism of cJun for cancer therapy", JOURNAL OF EXPERIMENTAL AND CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 39, no. 1, 1 December 2020 (2020-12-01), XP055802224, IT ISSN: 0392-9078, DOI: 10.1186/s13046-020-01686-9 the whole document -----	1-25

3

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2023/056243

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

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

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

   b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2023/056243

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006017913 A1	23-02-2006	AU 2005274616 A1	23-02-2006
		CA 2577995 A1	23-02-2006
		EP 1793841 A1	13-06-2007
		JP 2008522954 A	03-07-2008
		US 2010029552 A1	04-02-2010
		WO 2006017913 A1	23-02-2006

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*38/16 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/16	
Ａ６１Ｋ	*47/54 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/54	
Ａ６１Ｋ	*47/56 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/56	
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	
Ａ６１Ｐ	*9/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/00	
Ａ６１Ｐ	*3/10 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/10	
Ａ６１Ｐ	*19/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/02	
Ａ６１Ｐ	*25/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00	
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00	
Ａ６１Ｋ	*31/7088(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7088	
Ａ６１Ｐ	*37/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/02	

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

バース クラバートン ダウン，ユニバーシティ オブ バース，デパートメント・オブ・ライフ・サイエンシズ

(72)発明者 ブレナン，アンドリュー

イギリス国 ＢＡ２ ７ＡＹ サマセット バース クラバートン ダウン，ユニバーシティ オブ バース，デパートメント・オブ・ライフ・サイエンシズ

Ｆターム（参考） 4B065 AA90X AC14 AC20 BA02 BC01 CA24 CA44
4C076 AA95 CC01 CC07 CC09 CC11 CC21 CC27 EE01 EE41 FF70
4C084 AA13 BA01 BA19 BA20 CA53 CA59 NA13 ZA36 ZA96 ZB07 ZB26 ZC35 ZC42
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA13 ZA36 ZA96 ZB07 ZB26 ZC35 ZC42
4H045 AA10 AA30 BA05 BA18 BA19 BA20 BA55 BA56 EA20 FA33 FA74 GA25 GA26