

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6205345号
(P6205345)

(45) 発行日 平成29年9月27日 (2017.9.27)

(24) 登録日 平成29年9月8日 (2017.9.8)

(51) Int. Cl.	F I	
A 6 1 K 47/54 (2017.01)	A 6 1 K 47/54	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 K 38/10 (2006.01)	A 6 1 K 38/10	
C O 7 K 7/08 (2006.01)	C O 7 K 7/08	Z N A

請求項の数 34 (全 57 頁)

(21) 出願番号	特願2014-502764 (P2014-502764)	(73) 特許権者	508087147
(86) (22) 出願日	平成24年3月28日 (2012.3.28)		ユニヴァーシティ オブ ユタ リサー チ ファウンデーション
(65) 公表番号	特表2014-510754 (P2014-510754A)		アメリカ合衆国 ユタ州 84108 ソ ルト レイク シティ アラビーン ド ライヴ 615 スイート 310
(43) 公表日	平成26年5月1日 (2014.5.1)	(74) 代理人	100147485
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/031015		弁理士 杉村 憲司
(87) 国際公開番号	W02012/135385	(74) 代理人	100174001
(87) 国際公開日	平成24年10月4日 (2012.10.4)		弁理士 結城 仁美
審査請求日	平成27年3月5日 (2015.3.5)	(74) 代理人	100181272
(31) 優先権主張番号	61/468,094		弁理士 神 絃一郎
(32) 優先日	平成23年3月28日 (2011.3.28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウイルス侵入の阻害に関する方法および組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ポリエチレングリコール (P E G) リンカーによって作用強度増強カーゴ分子に連結された、少なくとも1つのD - ペプチドを含み、

前記作用強度増強カーゴ分子が、コレステロール若しくはチオコレステロール、アルカン鎖、又は脂肪酸であり、

前記D - ペプチドが、配列ID番号31のアミノ酸配列を含む8アミノ酸のコアペプチドを含み、

前記 P E G リンカーが少なくとも12のエチレングリコール反復単位を含む組成物。

【請求項2】

前記少なくとも一つのD - ペプチドが、P I E 7 (配列ID番号: 6)、P I E 7 - G K (配列ID番号: 23)、P I E 7 - G K K (配列ID番号: 24)、K - P I E 7 - G K (配列ID番号: 25)、P I E 1 2 (配列ID番号: 26)、P I E 1 3 (配列ID番号: 27)、P I E 1 4 (配列ID番号: 28)、又はP I E 1 5 (配列ID番号: 29)の少なくとも一つを含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記少なくとも一つのD - ペプチドがヒト免疫不全ウイルス (H I V) g p 4 1 タンパク質のN - 三量体ポケットと結合可能である、請求項1又は2に記載の組成物。

【請求項4】

前記 P E G リンカーが、P E G ₁₂ , P E G ₁₆ , P E G ₂₄ , P E G ₂₅ , P E G ₂₆ , P E G

27, PEG₂₈, PEG₂₉, PEG₃₀, PEG₃₁, PEG₃₂, PEG₃₃, PEG₃₄, PEG₃₅ または PEG₃₆ のうちの 1 つである、請求項 1 ~ 3 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記作用強度増強カーゴ分子がコレステロールまたはチオコレステロールである、請求項 1 ~ 4 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記作用強度増強カーゴ分子が脂肪酸である、請求項 1 ~ 4 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記脂肪酸が C 8 脂肪酸、C 16 脂肪酸および C 18 脂肪酸のうちの少なくとも 1 つである、請求項 6 に記載の組成物。

10

【請求項 8】

前記作用強度増強カーゴ分子がアルカン鎖である、請求項 1 ~ 4 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記アルカン鎖は C 8 アルカン、C 16 アルカンおよび C 18 アルカンのうちの少なくとも 1 つである、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記少なくとも 1 つの D - ペプチドは、PIE 7 (配列 ID 番号: 6) および PIE 12 (配列 ID 番号: 26) のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 1 ~ 9 の何れか一項に記載の組成物。

20

【請求項 11】

C 末端で PEG₂₄ リンカー によってコレステロールに連結された PIE 12 (配列 ID 番号: 26) (chol-PEG₂₄-PIE 12) を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 12】

少なくとも 3 つの D - ペプチドおよび少なくとも 1 つの作用強度増強カーゴ分子を含み、

前記少なくとも 3 つの D - ペプチド及び前記少なくとも 1 つの作用強度増強カーゴ分子がそれぞれ多量体骨格に連結し、

前記少なくとも 3 つの D - ペプチドが、配列 ID 番号 31 のアミノ酸配列を含む 8 アミノ酸のコアペプチドを含み、

30

前記作用強度増強カーゴ分子が、コレステロール若しくはチオコレステロール、アルカン鎖、又は脂肪酸であり、

前記作用強度増強カーゴ分子が、少なくとも 12 のエチレングリコール反復単位を含む PEG リンカーを介して前記多量体骨格に連結している組成物。

【請求項 13】

前記多量体骨格は、3 つの NHS エステル基および第 4 直交基を含むヘテロ四量体骨格であり、

前記少なくとも 3 つの D - ペプチドが、前記 3 つの NHS エステル基を介して前記ヘテロ四量体骨格に連結し、前記作用強度増強カーゴ分子が前記第 4 直交基を介して前記ヘテロ四量体骨格に連結し、

40

前記第 4 直交基が少なくとも 12 のエチレングリコール反復単位を含む PEG リンカーを含む、請求項 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記少なくとも 3 つの D - ペプチドのそれぞれが、PIE 7 (配列 ID 番号: 6)、PIE 7 - GK (配列 ID 番号: 23)、PIE 7 - GKK (配列 ID 番号: 24)、K - PIE 7 - GK (配列 ID 番号: 25)、PIE 12 (配列 ID 番号: 26)、PIE 13 (配列 ID 番号: 27)、PIE 14 (配列 ID 番号: 28)、又は PIE 15 (配列 ID 番号: 29) から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 12 又は 13 に記載の組成物。

50

【請求項 15】

それぞれの D - ペプチドが同一である、請求項 12 ~ 14 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 16】

少なくとも 2 つの D - ペプチドが異なる、請求項 12 ~ 14 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 17】

それぞれの D - ペプチドが配列 ID 番号 26 のアミノ酸配列を含む、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 18】

前記作用強度増強カーゴ分子がコレステロール又はチオコレステロールである、請求項 12 ~ 17 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 19】

前記作用強度増強カーゴ分子が脂肪酸である、請求項 12 ~ 17 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 20】

前記脂肪酸が、C8脂肪酸、C16脂肪酸およびC18脂肪酸のうちの少なくとも1つである、請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 21】

前記作用強度増強カーゴ分子がアルカン鎖である、請求項 12 ~ 17 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 22】

前記アルカン鎖が、C8アルカン、C16アルカンおよびC18アルカンのうちの少なくとも1つである、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 23】

前記 PEG リンカーは、PEG₁₂、PEG₁₆、PEG₂₄、PEG₂₅、PEG₂₆、PEG₂₇、PEG₂₈、PEG₂₉、PEG₃₀、PEG₃₁、PEG₃₂、PEG₃₃、PEG₃₄、PEG₃₅、PEG₃₆、PEG₅₇、または PEG₁₃₂ である、請求項 12 ~ 22 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 24】

前記多量体骨格は、トリス、ジリシン、ベンゼン環、リン酸またはペプチドコアを含む、請求項 12 ~ 23 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 25】

前記作用強度増強カーゴ分子は、反応性基を介して前記ヘテロ四量体骨格に連結される、請求項 13 ~ 24 の何れか一項に記載の組成物。

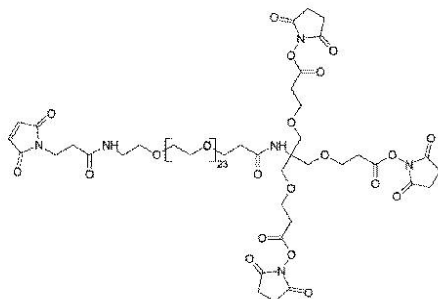
【請求項 26】

前記作用強度増強カーゴ分子は、マレイミド反応基を介して前記ヘテロ四量体骨格に連結される、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 27】

前記ヘテロ四量体骨格が下記式で表される構造を含む、請求項 13 に記載の組成物。

【化 1】



10

20

30

40

50

【請求項 28】

3つのPIE12（配列ID番号：26）D-ペプチドおよび多量体骨格に連結したコレステロール又はチオコレステロール、ここで該コレステロール又はチオコレステロールはPEG₁₂リンカーを介して該多量体骨格に連結されている；3つのPIE12（配列ID番号：26）D-ペプチドおよび多量体骨格に連結したコレステロール又はチオコレステロール、ここで該コレステロール又はチオコレステロールはPEG₁₆リンカーを介して該多量体骨格に連結されている；3つのPIE12（配列ID番号：26）D-ペプチドおよび多量体骨格に連結したコレステロール又はチオコレステロール、ここで該コレステロール又はチオコレステロールはPEG₂₄リンカーを介して該多量体骨格に連結されている；3つのPIE12（配列ID番号：26）D-ペプチドおよび多量体骨格に連結したコレステロール又はチオコレステロール、ここで該コレステロール又はチオコレステロールはPEG₃₆リンカーを介して該多量体骨格に連結されている；3つのPIE12（配列ID番号：26）D-ペプチドおよび多量体骨格に連結したコレステロール又はチオコレステロール、ここで該コレステロール又はチオコレステロールはPEG₅₇リンカーを介して該多量体骨格に連結されている；3つのPIE12（配列ID番号：26）D-ペプチドおよび多量体骨格に連結したコレステロール又はチオコレステロール、ここで該コレステロール又はチオコレステロールはPEG₁₃₂リンカーを介して該多量体骨格に連結されている；3つのPIE12（配列ID番号：26）D-ペプチドおよび多量体骨格に連結したC8脂肪酸、ここで該C8脂肪酸はPEG₂₄リンカーを介して該多量体骨格に連結されている；3つのPIE12（配列ID番号：26）D-ペプチドおよび多量体骨格に連結したC16脂肪酸、ここで該C16脂肪酸はPEG₂₄リンカーを介して該多量体骨格に連結されている；3つのPIE12（配列ID番号：26）D-ペプチドおよび多量体骨格に連結したC18脂肪酸、ここで該C18脂肪酸はPEG₂₄リンカーを介して該多量体骨格に連結されている；3つのPIE12（配列ID番号：26）D-ペプチドおよび多量体骨格に連結したC8アルカン、ここで該C8アルカンはPEG₂₄リンカーを介して該多量体骨格に連結されている；3つのPIE12（配列ID番号：26）D-ペプチドおよび多量体骨格に連結したC16アルカン、ここで該C16アルカンはPEG₂₄リンカーを介して該多量体骨格に連結されている；3つのPIE12（配列ID番号：26）D-ペプチドおよび多量体骨格に連結したC18アルカン、ここで該C18アルカンはPEG₂₄リンカーを介して該多量体骨格に連結されている；のうちの少なくとも一つを含む、請求項12に記載の組成物。

【請求項 29】

前記組成物はHIVの細胞内への侵入を阻害する、請求項1～28の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 30】

請求項1～29の何れか一項に記載の組成物、及び薬学的に許容可能な担体を含む薬学的組成物。

【請求項 31】

請求項1～29の何れか一項に記載の組成物又は請求項30に記載の薬学的組成物を含み、前記組成物又は前記薬学的組成物がHIVに接触することを特徴とする、HIVの細胞内への侵入の阻害に用いるための組成物。

【請求項 32】

請求項1～20の何れか一項に記載の組成物又は請求項30に記載の薬学的組成物を含み、前記組成物又は前記薬学的組成物が被験者に投与されることを特徴とする、被験者へのHIV感染の阻害に用いるための組成物。

【請求項 33】

前記組成物又は前記薬学的組成物が、ウイルス複製阻害剤、ウイルスプロテアーゼ阻害剤、ウイルス逆転写酵素阻害剤、ウイルス侵入阻害剤、ウイルスインテグラーゼ阻害剤、ウイルスRev阻害剤、ウイルスTat阻害剤、ウイルスNef阻害剤、ウイルスVpr阻害剤、ウイルスVpu阻害剤およびウイルスVif阻害剤からなる群から選択した少な

10

20

30

40

50

くとも1つの抗ウイルス剤と組み合わせて被験者に投与される、請求項32に記載の組成物。

【請求項34】

前記少なくとも1つの抗ウイルス剤が、CombiVir (登録商標) (ラミブジン/ジドブジン)、CRIXIVAN (登録商標) (インジナビル)、EMTRIVA (登録商標) (エムトリシタピン)、EPIVIR (登録商標) (ラミブジン)、FORTOVASE (登録商標) (サキナビル - sg)、HIVID (登録商標) (ザルシタピン)、INVIRASE (登録商標) (サキナビル - hg)、KALETRA (登録商標) (ロピナビル/リトナビル)、LEXIVA (商標) (ホスアンプレナビル)、NORVIR (登録商標) (リトナビル)、RITROVIR (登録商標) (ジドブジン)、SUSTIVA (登録商標) (エファビレンツ)、VEDEX EC (登録商標) (ジダノシン)、VIDEX (登録商標) (ジダノシン)、VIRACEPT (登録商標) (ネルファナビル)、VIRAMUNE (登録商標) (ネビラピン)、ZERIT (登録商標) (スタブジン)、ZIAGEN (登録商標) (アバカビル)、FUZEON (登録商標) (エンフビルチド)、RESCRIPTOR (登録商標) (デラビルジン)、REYATAZ (登録商標) (アタザナビル)、TRIZIVIR (登録商標) (アバカビル/ラミブジン/ジドブジン)、VIREAD (登録商標) (テノホビルジソプロキシルフマル酸塩)、ISENTRISS (登録商標) (ラルテグラビル)、SELZENTRY (登録商標) (マラビロク) 又は AGENERASE (登録商標) (アンプレナビル) である、請求項33に記載の組成物。

10

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(連邦支援研究に関する記載)

この研究は国立保健研究機構 (the National Institutes of Health) (認可番号 AI RI 076168) による援助を一部受けたものである。合衆国政府は本開示に対する特定の権利を有する。

【背景技術】

【0002】

HIVの侵入は、非共有会合表面 (gp120) および膜貫通 (gp41) サブユニットを含むウイルスエンベロープ糖タンパク質によって媒介される。gp120は主に細胞受容体の認識に関係しているが、gp41は膜融合を直接媒介する。gp41N - およびC - ペプチド領域 (N - およびC - ペプチド) から単離されたペプチドは、溶液に混合されると6ヘリックスバンドルを形成し、これは融合後のgp41構造を表す。3つのN - ペプチドは、両側に隣接するN - ペプチドの間の長い溝に横たわる3つの逆平行ヘリックスC - ペプチドによって囲まれた、中心が平行な三量体コイルドコイル (N - 三量体) を形成する。この構造の重要性は、N - およびC - ペプチドによるHIV侵入のドミナントネガティブな阻害によって示される。

30

40

【0003】

阻害および構造の有効なデータによって、HIV膜融合のモデル (図1) が裏付けられる。まず、gp120は細胞CD4およびケモカインコレセプター (典型的にはCXCR4またはCCR5) と相互作用し、gp120に大きな構造変化が生じ、これはgp41とgp120との界面を介してgp41に伝播する。その後gp41は構造的再編成を行い、これによってそのN - 末端融合ペプチドを開放し、これが標的細胞膜に入り込む。融合のこの段階で、gp41は、ウイルス膜と細胞膜とを架橋する伸長した「ヘアピン中間体」立体配座となり、N - 三量体領域を露出する。この中間体は比較的長寿命 (数分間) であるが、各gp41単量体のN - およびC - ペプチドが会合してヘアピン構造を形成すると、最終的に崩壊する。3つのこのようなヘアピン (ヘアピンの三量体) は6ヘリ

50

ックスバンドルを形成し、これはウイルス膜と細胞膜とを密接に付着させ、膜融合をもたらす。この構造は g p 4 1 の融合活性状態のコアに相当すると見られ、インフルエンザ、モロニ - マウス白血病ウイルス、サル免疫不全ウイルス (S I V) およびエボラウイルスからのエンベロープ融合タンパク質の提唱される膜融合構成と類似している。

【 0 0 0 4 】

このモデルによれば、N - 三量体に結合してヘアピン形成を妨げる阻害剤は、ウイルスの侵入を阻害することができる。このことはN - 三量体に結合する多くのペプチド、タンパク質および小分子阻害剤によって十分に裏付けされてきた。N - 三量体の特に興味深い特徴は、その17のC - 末端残基によって形成される深い疎水性の「ポケット」である。このポケットは阻害剤標的として下記の魅力的な特徴を有している：(1) 大変高度に保存された配列、(2) ウイルス侵入における重要な役割、(3) 短鎖ペプチドによる阻害に弱い小さな結合部位、および(4) 数種類のペプチド設計(例えば、ポケット構造を忠実に模倣するIQN17, IZN17, 5ヘリックス、N_{CCG}N13)。当技術分野において必要なのは、g p 4 1の細胞内侵入を阻害することのできる、適切な薬物動態特性を有するペプチドである。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 0 5 】

【特許文献1】米国出願第12 / 5 2 6 , 0 7 1号

【特許文献2】米国特許第3 , 6 1 0 , 7 9 5号

【特許文献3】米国特許第6 , 0 3 1 , 0 7 1号

【特許文献4】米国特許第5 , 8 2 4 , 5 2 0号

【特許文献5】米国特許第5 , 5 9 6 , 0 7 9号

【特許文献6】米国特許第5 , 5 6 5 , 3 3 2号

【特許文献7】米国特許第5 , 0 8 4 , 8 2 4号

【特許文献8】米国特許第5 , 2 8 8 , 5 1 4号

【特許文献9】米国特許第5 , 4 4 9 , 7 5 4号

【特許文献10】米国特許第5 , 5 0 6 , 3 3 7号

【特許文献11】米国特許第5 , 5 3 9 , 0 8 3号

【特許文献12】米国特許第5 , 5 4 5 , 5 6 8号

【特許文献13】米国特許第5 , 5 5 6 , 7 6 2号

【特許文献14】米国特許第5 , 5 6 5 , 3 2 4号

【特許文献15】米国特許第5 , 5 6 5 , 3 3 2号

【特許文献16】米国特許第5 , 5 7 3 , 9 0 5号

【特許文献17】米国特許第5 , 6 1 8 , 8 2 5号

【特許文献18】米国特許第5 , 6 1 9 , 6 8 0号

【特許文献19】米国特許第5 , 6 2 7 , 2 1 0号

【特許文献20】米国特許第5 , 6 4 6 , 2 8 5号

【特許文献21】米国特許第5 , 6 6 3 , 0 4 6号

【特許文献22】米国特許第5 , 6 7 0 , 3 2 6号

【特許文献23】米国特許第5 , 6 7 7 , 1 9 5号

【特許文献24】米国特許第5 , 6 8 3 , 8 9 9号

【特許文献25】米国特許第5 , 6 8 8 , 6 9 6号

【特許文献26】米国特許第5 , 6 8 8 , 9 9 7号

【特許文献27】米国特許第5 , 6 9 8 , 6 8 5号

【特許文献28】米国特許第5 , 7 1 2 , 1 4 6号

【特許文献29】米国特許第5 , 7 2 1 , 0 9 9号

【特許文献30】米国特許第5 , 7 2 3 , 5 9 8号

【特許文献31】米国特許第5 , 7 4 1 , 7 1 3号

【特許文献32】米国特許第5 , 7 9 2 , 4 3 1号

20

30

40

50

【特許文献 33】	米国特許第 5, 807, 683 号	
【特許文献 34】	米国特許第 5, 807, 754 号	
【特許文献 35】	米国特許第 5, 821, 130 号	
【特許文献 36】	米国特許第 5, 831, 014 号	
【特許文献 37】	米国特許第 5, 834, 195 号	
【特許文献 38】	米国特許第 5, 834, 318 号	
【特許文献 39】	米国特許第 5, 834, 588 号	
【特許文献 40】	米国特許第 5, 840, 500 号	
【特許文献 41】	米国特許第 5, 847, 150 号	
【特許文献 42】	米国特許第 5, 856, 107 号	10
【特許文献 43】	米国特許第 5, 856, 496 号	
【特許文献 44】	米国特許第 5, 859, 190 号	
【特許文献 45】	米国特許第 5, 864, 010 号	
【特許文献 46】	米国特許第 5, 874, 443 号	
【特許文献 47】	米国特許第 5, 877, 214 号	
【特許文献 48】	米国特許第 5, 880, 972 号	
【特許文献 49】	米国特許第 5, 886, 126 号	
【特許文献 50】	米国特許第 5, 886, 127 号	
【特許文献 51】	米国特許第 5, 891, 737 号	
【特許文献 52】	米国特許第 5, 916, 899 号	20
【特許文献 53】	米国特許第 5, 919, 955 号	
【特許文献 54】	米国特許第 5, 925, 527 号	
【特許文献 55】	米国特許第 5, 939, 268 号	
【特許文献 56】	米国特許第 5, 942, 387 号	
【特許文献 57】	米国特許第 5, 945, 070 号	
【特許文献 58】	米国特許第 5, 948, 696 号	
【特許文献 59】	米国特許第 5, 958, 702 号	
【特許文献 60】	米国特許第 5, 958, 792 号	
【特許文献 61】	米国特許第 5, 962, 337 号	
【特許文献 62】	米国特許第 5, 965, 719 号	30
【特許文献 63】	米国特許第 5, 972, 719 号	
【特許文献 64】	米国特許第 5, 976, 894 号	
【特許文献 65】	米国特許第 5, 980, 704 号	
【特許文献 66】	米国特許第 5, 985, 356 号	
【特許文献 67】	米国特許第 5, 999, 086 号	
【特許文献 68】	米国特許第 6, 001, 579 号	
【特許文献 69】	米国特許第 6, 004, 617 号	
【特許文献 70】	米国特許第 6, 008, 321 号	
【特許文献 71】	米国特許第 6, 017, 768 号	
【特許文献 72】	米国特許第 6, 025, 371 号	40
【特許文献 73】	米国特許第 6, 030, 917 号	
【特許文献 74】	米国特許第 6, 040, 193 号	
【特許文献 75】	米国特許第 6, 045, 671 号	
【特許文献 76】	米国特許第 6, 045, 755 号	
【特許文献 77】	米国特許第 6, 060, 596 号	
【特許文献 78】	米国特許第 6, 061, 636 号	
【特許文献 79】	米国特許第 6, 025, 371 号	
【特許文献 80】	米国特許第 6, 017, 768 号	
【特許文献 81】	米国特許第 5, 821, 130 号	
【特許文献 82】	米国特許第 5, 976, 894 号	50

- 【特許文献83】米国特許第5,972,719号
- 【特許文献84】米国特許第5,965,719号
- 【特許文献85】米国特許第5,962,337号
- 【特許文献86】米国特許第5,958,792号
- 【特許文献87】米国特許第5,948,696号
- 【特許文献88】米国特許第5,942,387号
- 【特許文献89】米国特許第5,925,527号
- 【特許文献90】米国特許第5,919,955号
- 【特許文献91】米国特許第5,916,899号
- 【特許文献92】米国特許第5,859,190号 10
- 【特許文献93】米国特許第5,856,496号
- 【特許文献94】米国特許第5,856,107号
- 【特許文献95】米国特許第5,847,150号
- 【特許文献96】米国特許第5,840,500号
- 【特許文献97】米国特許第5,831,014号
- 【特許文献98】米国特許第5,721,099号
- 【特許文献99】米国特許第5,712,146号
- 【特許文献100】米国特許第5,698,685号
- 【特許文献101】米国特許第5,506,337号
- 【特許文献102】米国特許第5,618,825号 20
- 【特許文献103】米国特許第5,288,514号
- 【非特許文献】
- 【0006】
- 【非特許文献1】Thorson⁵, Methods in Molec. Biol. 77:43-73(1991), Zoller, Current Opinion in Biotechnology, 3:348-354(1992)
- 【非特許文献2】Ibba, Biotechnology & Genetic Engineering Reviews 13:197-216(1995)
- 【非特許文献3】Cahill⁵, TIBS, 14(10):400-403(1989) 30
- 【非特許文献4】Benner, TIB Tech, 12:158-163(1994)
- 【非特許文献5】IbbaおよびHennecke, Bio/technology, 12:678-682(1994)
- 【非特許文献6】Spatola, A. F. in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p. 267(1983)
- 【非特許文献7】Spatola, A. F., Vega Data(March 1983), Vol. 1, Issue 3, Peptide Backbone Modifications (general review) 40
- 【非特許文献8】Morley, Trends Pharm Sci (1980) pp. 463-468; Hudson D⁵, Int J Pept Prot Res 14:177-185(1979)(- - CH₂NH - - , CH₂CH₂ - -)
- 【非特許文献9】Spatola⁵, Life Sci 38:1243-1249(1986)(- - CH₂ - - S)
- 【非特許文献10】Hann J. Chem. Soc Perkin Trans. 1307-314(1982)(- - CH - - CH - - , cis and trans)
- 【非特許文献11】Almquist⁵, J. Med. Chem. 23:1392-1398(1980)(- - COCH₂ - -)
- 【非特許文献12】Jennings White⁵, Tetrahedron Let 50

- t 23 : 2533 (1982) (-COCH₂-)
- 【非特許文献13】Szelke⁵、European Appln, EP 45665 CA (1982): 97:39405 (1982) (-CH(OH)CH₂-)
- 【非特許文献14】Holladay⁵、Tetrahedron. Lett 24: 4401-4404 (1983) (-C(OH)CH₂-)
- 【非特許文献15】Hruby, Life Sci 31:189-199 (1982) (-CH₂-S-)
- 【非特許文献16】Remington: The Science and Practice of Pharmacy (19th ed.) ed. A.R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA 1995 10
- 【非特許文献17】Rotivinen⁵、1988 Acta Pharmaceutica Fennica 97, 159~166; Ripka, New Scientist 54-57 (June 16, 1988)
- 【非特許文献18】McKinalyおよびRossmann、1989 Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29, 111~122
- 【非特許文献19】PerryおよびDavies, QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships, in Drug Design pp. 189~193 (Alan R. Liss, Inc. 1989) 20
- 【非特許文献20】LewisおよびDean, 1989 Proc. R. Soc. Lond. 236, 125~140および141~162
- 【非特許文献21】Aske⁵、1989 J. Am. Chem. Soc. 111, 1082~1090
- 【非特許文献22】Grant GA (1992) Synthetic Peptides: A User Guide. W.H. Freeman and Co., N.Y. (1992)
- 【非特許文献23】Bodansky MおよびTrost B., Ed. (1993) Principles of Peptide Synthesis. Springer Verlag Inc., NY 30
- 【非特許文献24】Abrahmsen L⁵、Biochemistry, 30:4151 (1991)
- 【非特許文献25】Dawson⁵、Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. Science, 266:776779 (1994)
- 【非特許文献26】Baggiolini M⁵、(1992)、FEBS Lett. 307:97~101
- 【非特許文献27】Clark Lewis I⁵, J. Biol. Chem., 269:16075 (1994) 40
- 【非特許文献28】Clark Lewis I⁵、Biochemistry, 30:3128 (1991)
- 【非特許文献29】Rajaratnam K⁵、Biochemistry 33:6623~30 (1994)
- 【非特許文献30】Schnolzer, M⁵、Science, 256:221 (1992)
- 【非特許文献31】deLisle Milton RC⁵、Techniques in Protein Chemistry IV. Academic Press, New York, pp. 257~267 (1992)
- 【非特許文献32】Schumacher⁵、Identification of D 50

- peptide ligands through mirror-image phage display, Science, 1996 Mar 29; 271 (5257): 1854 ~ 1857

【非特許文献33】Williamsら、PNAS, 74: 11285 (1997)

【非特許文献34】M. Singhら、J. Mol. Biol, 290: 1031 (1999)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

開示する方法および組成物のために使用することのできる、もしくはそれらと共に使用することのできる、またはそれらの調製において使用することのできる、あるいは開示する方法および組成物の製造物である材料、組成物および成分を開示する。これらの材料およびその他の材料を本明細書に開示するが、これらの材料の組み合わせ、サブセット、相互作用、群などの開示の際に、これらの化合物の種々の個別のおよび集合的な組み合わせ、ならびにこれらの化合物の順序が明白に開示されていない可能性があるが、各々が具体的に企図され、本明細書に記載されていると理解されたい。例えば、ポリペプチドが開示および考察され、ポリペプチドを含む多くの分子に対して多くの修飾が考察される場合、それとは反対のことが特に明記されていない限り、ポリペプチドのあらゆる組み合わせおよび順序ならびに可能な修飾が具体的に企図されている。よって、分子クラスA, B, Cおよび分子クラスD, E, Fが開示され、ならびに組み合わせ分子の例A - Dが開示されている場合、各々が個別に記載されていなくても、各々は個別および集合的に企図されている。よってこの例においては、A - E, A - F, B - D, B - E, B - F, C - D, C - E, C - Fの組み合わせの各々が、A, B, CおよびD, E, Fの開示ならびにA - Dの組み合わせ例から具体的に企図されているものと理解されたい。同様に、これらのクラスのサブセットまたは組み合わせも具体的に企図、開示されている。従って、例えばA - E, B - FおよびC - Eのサブグループは具体的に企図されたものであり、A, B, CおよびD, E, Fの開示ならびにA - Dの組み合わせ例から開示されていると見なされるべきである。この概念は、開示された組成物の製造および使用に関する方法のステップが含まれるが、これに限定されないアプリケーションの全ての態様に適用される。よって実行することのできる種々の追加のステップがある場合、これらの追加ステップの各々は、開示された方法の任意の特定の実施形態または実施形態の組み合わせによって実行でき、各々のこのような組み合わせは具体的に企図され、開示されていると見なされるべきであることを理解されたい。

【課題を解決するための手段】

【0008】

当業者は、日常的な実験のみを使用して、本明細書に記載する方法および組成物の特定の実施形態の多くの同等物を認識、または確認することができるだろう。尚、これらは変わる可能性があるので、開示された方法および組成物は、記載された特定の的方法論、実施要綱および試薬に制限されるものではないと理解されたい。また、本明細書において使用される用語は特定の実施形態を説明する目的のみに使用され、添付の請求項によってのみ制限される本発明の範囲を制限することを意図したものではないと理解されたい。

【図面の簡単な説明】

【0009】

本明細書に組み込まれ、その一部を構成する添付の図面は、記載と共に、開示した組成物および方法の特定の実施形態を説明するものである。

【0010】

【図1】HIVの侵入経路の実施形態を示し、gp41融合ペプチドおよび膜貫通ドメインも示している。明確さのために、gp120をプレヘアピン中間体から削除している。

【図2】N - 三量体ポケット領域(D - ペプチド結合部位)と標的細胞膜との間の予測距離を示している。

10

20

30

40

50

【図3】図3 aは、本明細書に開示するホモ三量体PEG骨格の一実施形態を示している。図3 bは、本明細書に開示するヘテロ四量体PEG骨格の一実施形態を示している。

【図4】図4 aは、PEGリンカー長のchol-PIE12-三量体作用強度(ポテンシー)への観測効果を示している。図4 bは、種々のアルカン長のC8/C16/C18-PIE12-三量体作用強度への観測効果を示している。

【図5】PIE12-三量体の一実施形態と比較した、chol-PIE12-三量体の一実施形態の増強された薬物動態特性を示している。

【発明を実施するための形態】

【0011】

(A. 定義)

特に定義されていない限り、本明細書に使用される全ての技術用語および科学用語は、本明細書の文脈において、当業者によって一般的に理解される意味を有している。

【0012】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用する場合、単数形「a」、「an」および「the」は、特に文脈において明確に指示のない限り、複数の指示対象を含む。従って、例えば、「a carrier」についての言及は、2つ以上のこのようなキャリアの混合物などを含む。

【0013】

本明細書において、範囲は、「約(about)」ある特定の値から、および/または「約」他の特定の値までとして表現されることができる。このような範囲が示される場合、他の実施形態は、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」を使用することによって、値を近似値として示す場合、その特定の値は別の実施形態を形成することを理解することができる。更に各範囲の終点は、他の終点との関連において、および他の終点と独立して、どちらにおいても重要であることが更に理解され得る。本明細書では多くの値が開示されているが、各値は、その値自体に加えて、本明細書においては「約」その特定の値としても開示されているものと理解されたい。例えば「10」という値が開示されている場合、「約10」も開示されている。また、当業者によって適切に理解されるように、ある値が開示されている場合、その値「以下または同等」の値、その値「以上または同等」の値、および複数の値の間の潜在的な範囲も開示されているものと理解されたい。例えば、「10」という値が開示されている場合、「10以下」および「10以上」も開示されている。また、本明細書を通して、データが多くの異なる形式で提供されていること、そしてこのデータは終点および開始点、ならびにこれらのデータ点の任意の組み合わせの範囲を表しているものと理解されたい。例えば、特定のデータ点「10」および「15」が開示されている場合、それらを超える、以上、未満および以下、ならびに10と15の間も開示されていると理解されたい。また、2つの特定の値の間の各々の値も開示されていると理解されたい。例えば、10および15が開示されている場合、11、12、13および14も開示されている。

【0014】

本明細書およびそれに続く特許請求の範囲では、下記に示す意味を有すると規定される、多くの用語に関して述べられている。

【0015】

「任意選択の」または「任意選択で」とは、続いて記載される事象または状況が起こるまたは起こらないことを意味しており、この記載はその事象または状況が起こる場合および起こらない場合を含んでいる。

【0016】

本明細書全体において種々の文献が参照されている。これらの文献の開示全体を参照としてこの明細書に援用し、これが属する技術分野をより完全に記載している。開示された文献はまた、文献が依拠される文章で論じられる、当該文献に含まれる資料のために、本明細書において個別かつ具体的に援用される。

【0017】

10

20

30

40

50

(B . 組成物)

開示された組成物の調製に使用される成分および本明細書に開示する方法において使用される組成物自体について開示する。

【 0 0 1 8 】

D P 1 7 8 および C 3 4 などの合成 C - ペプチド (C ヘリックスに対応するペプチド) は、H I V - 1 膜融合の強力な阻害剤であり、実験室馴化株および初代分離株に対して有効である。g p 4 1 コアの構造的特性に基づき、これらのペプチドは、外因性 C - ペプチドが g p 4 1 の中央コイルドコイルと結合してその不活性化を導く、ドミナントネガティブ機構を介して作用すると考えられている。これらのペプチドは、天然の g p 4 1 構造 (すなわち、遊離ピリオンに存在する非融合性立体構造) が g p 1 2 0 / C D 4 / 共受容体の相互作用によって攪乱される場合に形成される、g p 4 1 のプレヘアピン中間体に作用する可能性がある。このプレヘアピン中間体は露出された N - コイルドコイルを有しており、これによって融合活性のヘアピン構造が形成される前に、C - ペプチドに結合して g p 4 1 を不活性化することができる。従って、このキャビティと高い親和力で結合して通常の N - および C - ヘリックス対形成を阻止する化合物は、有効な H I V - 1 阻害剤である。さらにキャビティ内の残基は多様な H I V - 1 分離株間で高度に保存される。この高い構造的な保存性のため、この部位を標的とする薬物は、多様な H I V - 1 分離株に対して広い活性度を有していると考えられる。

10

【 0 0 1 9 】

本明細書に記載するような、H I V - 1 エンベロープタンパク質 g p 4 1 サブユニットの N - ヘリックスコイルドコイル表面上のポケットは、薬物標的である。同様に、A I D S を引き起こす可能性のあるその他の病原体 (例えば H I V - 2) または非ヒト哺乳動物に A I D S の様な症状を引き起こす病原体 (例えば S I V) 上のキャビティもまた薬物標的である。有効な方法 (例えば、鏡像ファージディスプレイ法、コンビナトリアルケミストリー、計算的手法およびその他の薬物スクリーニングならびに医化学的方法) を、十分な親和性で H I V - 1 (および / または H I V - 2) のコイルドコイルキャビティに結合させ、ウイルスの細胞内侵入を妨いでウイルス感染を阻害する多量体を含むペプチドおよび D - ペプチドならびにペプチド模倣薬および小分子の同定に使用することができる。鏡像ファージディスプレイは、H I V - 1 g p 4 1 の N - ヘリックスコイルドコイル表面上のキャビティに結合する D - ペプチドの同定に使用されてきた。

20

30

【 0 0 2 0 】

本明細書では、ウイルス膜貫通タンパク質の N - 三量体ポケットと相互に作用する D - ペプチドを含む組成物を開示する。例えば、D - ペプチドは H I V エンベロープ糖タンパク g p 4 1 (例えば、H I V - 1 , H I V - 2) の N - ヘリックスコイルドコイルにおける表面のキャビティと結合することができる。このような D - ペプチドは、それらが N - ヘリックスコイルドコイルキャビティとウイルス g p 4 1 の C - ペプチド領域のアミノ酸残基の相互作用を干渉し、ウイルスの細胞内侵入を阻止する、または阻害するようにキャビティに結合するための十分な長さであれば、どんな長さでもよい。例えば、ペプチドは長さが少なくとも 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 , 9 または 1 0 のコアアミノ酸残基を含むことができる。本明細書に記載するように、アミノ酸残基は、自然または非自然に発生させるか、または修飾することができる。H I V g p 4 1 の N - 三量体に結合するペプチドの例は米国出願第 1 2 / 5 2 6 , 0 7 1 号に記載されており、その全体を本明細書に参照として援用する。

40

【 0 0 2 1 】

D - ペプチドの掌体は、自然に発生するペプチドの掌体の反対である。従って D - ペプチドは酵素に対して効率的な基質として機能しないので、L - ペプチドほどすぐに分解されない。さらに、D - ペプチドを標的とする周知の有効な免疫応答がないため、それらは L アミノ酸ペプチドによって誘発されるものに匹敵するような免疫応答を誘発しない。さらに、D - ペプチドには L - ペプチドより優れた以下の潜在的な利点がある：(1) D - ペプチドはプロテアーゼに耐性があり、セラムの半減期を劇的に増大させる特性を有して

50

いる、(2) L - ペプチドは消化を避けるために注入されなければならないが、短鎖 D - ペプチドは経口投与して全身に吸収される、(3) D - ペプチドは、L - ペプチドにはできない、独特な界面幾何学形状を有する標的に結合することができるため、豊富な構造多様性を有している。

【0022】

本明細書に記載されるようにして同定される D - ペプチドの例を下記に示す。特定の実施形態において、D - ペプチドはポケット特異的侵入阻害剤 (PIE: Pocket-specific Inhibitors of Entry) と称される。このような D - ペプチド阻害剤の例として PIE7 があり、これは配列 AC - GACDYPEWQLCAA - NH₂ (配列 ID 番号: 6) で表される。特定の実施形態において、1 つまたは複数の N - 末端リジン残基を D - ペプチドに加え、水溶性を高めることができる。本明細書に開示する D - ペプチドの特定の実施形態は、アミノ酸配列前のリンカー配列「PEG」で示すことができる。

【0023】

表 1 には、本明細書に開示する方法および組成物に使用することのできる D - ペプチドの種々の例を示す：

【0024】

D - ペプチドの結合および中和

【表 1】

試料	配列
D10-p5	KKGACELLGWEWAWLCAA (配列 ID 番号:1)
2K-PIE1	KKGACESPEWRWLCAA (配列 ID 番号:2)
2K-PIE2	KKGACDYPEWRWLCAA (配列 ID 番号:3)
PIE2-AAA	KGACDYPEWRWLCAA (配列 ID 番号:4)
PIE2	KGACDYPEWRWLCAA (配列 ID 番号:5)
PIE7	KGACDYPEWQWLCAA (配列 ID 番号:6)
PIE8	KGACDYKEWQWLCAA (配列 ID 番号:7)
PEG-PIE7	PEG-KGACDYPEWQWLCAA (配列 ID 番号:8)
PEG-(PIE7) ₂	PEG-(KGACDYPEWQWLCAA) ₂ (配列 ID 番号:9)
2K-PhD1	KKGACPREWHWLCAA (配列 ID 番号:10)
PhD1	GACPREHWLCAA (配列 ID 番号:11)
2K-PIE0	KKGACDYWEWRWLCAA (配列 ID 番号:12)
D-PIE2	DGACDYPEWRWLCAA (配列 ID 番号:13)
2K-PIE3	KKGACDDPDWQWLCAA (配列 ID 番号:14)
2K-PIE4	KKGACEDPDWQWLCAA (配列 ID 番号:15)
2K-PIE5	KKGACEDPEWQWLCAA (配列 ID 番号:16)
2K-PIE6	KKGACNDPEWQWLCAA (配列 ID 番号:17)
PIE1	DGACESPEWQWLCAAGAA (配列 ID 番号:18)
R4#9	ACPPEWHWLCGGGSA (配列 ID 番号:19)
R4#12	ACPVEWRWLCGGGSA (配列 ID 番号:20)
R4#6	ACPIEWRWLCGGGSA (配列 ID 番号:21)
PhD1b	ACPREHWLWLCGGGSA (配列 ID 番号:22)
PIE7-GK	GACDYPEWQWLCAAGK (配列 ID 番号:23)
PIE7-GKK	GACDYPEWQWLCAAGKK (配列 ID 番号:24)
K-PIE7-GK	KGACDYPEWQWLCAAGK (配列 ID 番号:25)
PIE12	HPCDYPEWQWLCELGK (配列 ID 番号:26)
PIE13	HPCDYPEWQWLCKLGLK (配列 ID 番号:27)
PIE14	HPCDYPEWQWLCLRLGK (配列 ID 番号:28)
PIE15	HACDYPEWQWLCELGK (配列 ID 番号:29)

【0025】

本明細書で使用する「D - アミノ酸残基」という用語は、D - グリセルアルデヒドと同

じ絶対配置を有する アミノ酸残基を指す。

【0026】

本明細書に開示する組成物の実施形態は、HIVの細胞内侵入の阻害剤として使用することのできるペプチド、ペプチドの一部およびペプチドの変異体/誘導体を含んでいる。コイルドコイルのC-末端端部における疎水性ポケットに十分に適合し、C-ペプチド領域のgp41のN-ペプチド領域との相互作用を阻止する、本明細書に開示するペプチドまたはそのようなペプチドの一部の特定の実施形態は、HIV感染の阻害に有益であろう。説明する任意のペプチドの一部またはその誘導体の大きさは、2~20(2~20の任意の数の残基)のアミノ酸残基とすることができる。特定の実施形態において、コンセンサス配列EWXWL(配列ID番号:30)または配列WXWL(配列ID番号:31)を少なくとも含むD-ペプチドを使用することができる。本明細書に記載するD-ペプチドがコンセンサス配列に加えてアミノ酸残基を含む場合、付加されたアミノ酸残基およびD-ペプチドの大きさは、本明細書に記載されるペプチドを参照して選択するか、またはこれらのペプチドとは関係なく設計することができる。ただしこの場合、ペプチドは疎水性ポケットに適合して阻害剤として作用することのできるものとする。付加アミノ酸残基は本明細書に記載するD-ペプチドのN-末端、C-末端またはそのどちらにも存在することができる、より大きなペプチドを製造する。あるいは、結合親和性を増強させるために、他のアミノ酸残基を選択することができる。例えば、このようなペプチドは保存されたアミノ酸残基を含むことができ、これらの残基は、本明細書に開示するペプチドで発生するものと同じ場所に位置することができる。いくつかの実施形態において、ペプチドはコア配列「WXWL」(配列ID番号:31)を含むことができる。

10

20

【0027】

本明細書に開示するペプチドのいくつかの実施形態において、ペプチドは、本明細書に開示する任意のペプチドにおけるこれらの位置のアミノ酸残基とは異なるアミノ酸残基を含むことができ(例えば、本明細書に開示するペプチドに発現しないイソロイシンもしくはアスパラギン、またはその他のアミノ酸残基であってもよい)、または、別のペプチドの特定の位置にあるアミノ酸残基によって置換することができる。天然タンパク質に見られる20L-アミノ酸のD型以外のアミノ酸残基を使用してもよい。このような変更は、例えば、ペプチドの生物学的利用能、結合親和性またはその他の特徴を高めるために行うことができる。D-ペプチドは本明細書に開示するペプチドに存在する、保存されたアミノ酸残基を含むことができるが、これらは表1に示す、介在するアミノ酸残基の数よりも少ない(または多い)アミノ酸残基で分離することができる。例えば、5未満のアミノ酸残基は、コンセンサス配列内の第1システインとグルタミン酸との間に存在することができる。あるいは、これら2つの残基は5以上のアミノ酸残基で分離することができる。内部修飾も行うことができる(例えば、結合を高める、またはペプチドの溶解度を増大させるため)。例えば、D10p5の第1ロイシンはアルギニンと置換して溶解度を増大させることができる。D-ペプチドはそのN-末端に付加部分(moiety)またはアミノ酸を有することができる。例えば、N-末端に存在するN-末端をブロックする、または電荷を取り除く部分を付加することができる。その部分は、例えば、グリシン(G)に直接連結したアセチル基などのブロック部分、または1つまたは複数のリジン残基に連結し、それがN-末端Gに連結するアセチル基のような、GのN-末端に連結する1つまたは複数の付加アミノ酸残基に連結するアセチル基であってもよい。

30

40

【0028】

本明細書に開示するペプチドの一実施形態において、2つのリジン残基をN-末端G(KKGAC...、配列ID番号:32)に連結させて、例えばペプチドの溶解度を増大させ、その後アセチル基のようなブロック部分を末端リジン(アセチル基-KKGAC...、配列ID番号:32)に連結させることができる。他の実施形態では、4つのリジン残基をN-末端Gに連結させる。さらにD-ペプチドは、付加および/または変化部分またはアミノ酸をそのC-末端に有することができる。例えば、C-末端のアラニン残基のうちの1つまたは両方を変化させ、および/または1つまたは複数の残基をC-末端

50

に付加し、例えば結合を増強させることができる。あるいは、アミノ酸残基以外の官能（化学）基を含有させて、本明細書に開示する実施形態における阻害剤を製造することができる。例えば、これらの付加的な化学基は、N - 末端およびC - 末端の末端または内部の何れにも存在することができる。

【0029】

2つ以上のD - ペプチドを適切なリンカー（例えばアミノ酸残基またはその他の化学部分のリンカー）で連結して、阻害の有効性を増大させることができる。あるいは、1つまたは複数のD - ペプチドを適切なリンカーを介して、HIV gp120, CD4,CCR5, CXCR4またはHIV gp41の非ポケット領域に結合する分子（薬物）に連結させ、阻害の有効性を増大させることができる。

10

【0030】

本明細書に開示するペプチドの命名法に関しては、ペプチドの異なるファミリー - をx - merと称し、この場合、xはシステイン残基間の残基数とみなす。x - merは「コアペプチド」と称される。例えば、配列ID番号：6（KGACDYPEWQWLCAA）は15の残基で構成され、よって従来技術では15 - merと称される。しかしながら、本明細書に開示する特定の実施形態では、システイン（C）間の残基長は8であり、よって8 - merと考えられ（そして8つのコア残基を有するものと称され）、明細書全体でそのように称される。特定の実施形態では、2つのシステイン残基以外のアミノ酸は「フランキング配列」と称される。この命名法では、2つのシステイン残基において残基数の異なるペプチドに異なるファミリー - が可能になるが、全体のペプチド長は、フランキング配列の違いにより、区別するために変えることができる。例えば、配列ID番号：6（KGACDYPEWQWLCAA）は15残基長であり、8 - merペプチドファミリー - のメンバーである（8つのコア残基を持っているため）、そしてKGAのN - 末端フランキング配列とAAのC - 末端フランキング配列とを有している。比較すると、配列ID番号：2（KKGACESPEWRWLCAA）は16残基のペプチド全長を有しているが、8 - merペプチドファミリー - のメンバーでもあり、KGAのN - 末端フランキング配列とAAのC - 末端フランキング配列とを含んでいる。本明細書に開示するペプチドに存在するコア残基およびフランキング残基に加え、本明細書に開示する全てのペプチドは、ブロックされたN - 末端およびC - 末端を含んでおり、N - 末端はアセチル基（Ac）によってブロックされ、C - 末端はアミノ基（NH₂）によってブロックされている。

20

30

【0031】

本明細書に記載するように、本開示によるD - ペプチドは、D - ペプチドを同定するために使用されるライブラリーの設計において、N - 末端でGAに、C - 末端でAAに隣接させることができる。これらのアミノ酸残基のうちいくつかまたは全ては、例えば、吸収、分配、代謝および/または排出を変えることによって、変更、置換または除去することができる。一実施形態では、C - 末端アミド化の直前にグリシン残基を付加することによって、C - 末端を修飾する。別の実施形態では、ほとんどのC - 末端Aを、異なるアミノ酸残基によって改変/修飾または置換する、または除去する。さらなる実施形態では、アミノ酸をC - 末端および/またはN - 末端に付加する。よって本明細書では、N - 末端GAおよびC - 末端AAの両方を置換または付加的に隣接させて作用強度を増強することを企図している。例えば、1つまたは2つのリジン（L）をC - 末端AAに付加して、特定のPIEの単一または二重のリジン変異体を製造することができる。また、例えば、N - 末端リジンを修飾して、N - 末端がHPを含有するようにすることもできる。

40

【0032】

本開示によって企図されるD - ペプチドの1つの配列は、AC - HPCDYPEWQLCELGK - NH₂（配列ID番号：26）であり、これはPIE12とも称される。別の実施形態では、D - ペプチドは配列AC - GACDYPEWQWLCAAGK - NH₂（配列ID番号：23）を有するPIE7 - GKであってもよい。このペプチドは、リジン（L）がC - 末端に移動しているのを除き、PIE7と同じである。この移動により、僅かに作用強度が高まり、それらのC - 末端を介したペプチドの架橋が可能となる。PIE7

50

変異体の別の例には、PIE7-GKK (GACDYPEWQWLC AAGKK, 配列ID番号: 24) がある。これはPIE7-GKの二重リジン変異体であり、三量体PIE7 (中心のPIE7-GKKは2つの両側に隣接するPIE7-GKペプチドに連結される) の特定の実施形態において中心ペプチドとして機能する。これらの連結は全てC-末端を介するものである。また、K-PIE7-GK (KGACDYPEWQWLC AAG, 配列ID番号: 25) も開示する。PIE7-GKのこの二重リジン変異体は、三量体PIE7のその他の実施形態の特定の実施形態において中心ペプチドとして機能する (中心K-PIE7-GKは2つの両側に隣接するペプチド、PIE7-GKおよびPIE7に連結される)。これらの連結によって、N-末端を両側に隣接するペプチドのC-末端に連結する。本明細書に開示するペプチド変異体のさらなる例は下記のPIE12変異体

10

【0033】

特定の実施形態において、本明細書に開示するペプチドは、二量体または三量体のような多量体として存在することもできる。例えば、多量体が二量体の場合、この二量体は2つの同一のペプチドまたは2つの異なるペプチドから構成することができる。あるいは、多量体は三量体であってもよい。多量体が三量体の場合、この三量体は2つの同一のペプチドと1つの異なるペプチド、3つの同一のペプチドまたは3つの異なるペプチドであってもよく、その各々を相互に区別できるペプチドで構成することができる。

20

(1. 多量体)

【0034】

本明細書にペプチドの多量体を開示する。特定の実施形態において、本明細書に開示する多量体は少なくとも1つのD-ペプチドを含むことができ、これはウイルス膜貫通タンパク質のN-三量体ポケットと相互作用する。多量体は二量体、三量体または四量体などのより高次の多量体とすることができるが、5, 6, 7, 8, 9, 10, 11または12のD-ペプチドを有する多量体を含むこともできる。よって本明細書で開示するのは、1つまたは複数のD-ペプチドポケットに特有の侵入阻害剤 (PIE) を含む多量体を含有する組成物である。

30

【0035】

本明細書では、開示するD-ペプチドを架橋して多量体が形成されると理解され、そしてそれが企図されている。特定の実施形態において、多量体は多量体骨格を使用して架橋してもよい。架橋剤の例として、NHS-エステル (リジンに反応する) またはマレイミド (システインに反応する) で誘導化されるポリエチレングリコール (PEG) がある。他の実施形態において、架橋剤は2つの別個の連結ケミストリー (例えば片方はNHS-エステルでもう片方はマレイミド) を含むこともできる。特定の実施形態において、D-ペプチドは2つのシステイン残基間の直接ジスルフィド結合形成によって連結することもできる。

【0036】

特定の実施形態例において、多量体骨格は3つのNHSエステル基を含む三量体骨格とすることができる。特定の実施形態において、多量体骨格はホモ三量体骨格または3つのNHSエステル基を含むヘテロ三量体骨格であってもよい。さらに他の実施形態において、多量体骨格は3つのNHSエステル基と4つめの直交基とを含む四量体骨格であってもよい。このような実施形態において、多量体骨格は、3つのNHSエステル基と4つめの直交基とを含むヘテロ四量体骨格であってもよい。さらに特定の実施形態において、開示する架橋剤および多量体骨格は、トリス (tris)、ジリシン、ベンゼン環、リン酸またはペプチドコアを含むことができる。開示する組成物に使用することのできる、本明細書に開示するその他の架橋剤には、チオール反応性基、例えば、ハロアセチル (ヨ-ド酢酸)、ピリジルジスルフィド (例えばHPDP) およびその他のチオールがある。

40

【0037】

50

連結するD-ペプチドは本明細書に開示するもののうちの任意のものとして行うことができ、D-ペプチドは互いに同一のものまたは異なるものであってもよい。二量体が存在する場合、両方のD-ペプチドのN-末端を相互に架橋することができる。あるいは、D-ペプチドのC-末端を架橋することができる。また、片方のD-ペプチドのN-末端およびもう片方のD-ペプチドのC-末端を架橋する三量体が存在する場合、D-ペプチドのN-末端およびC-末端はどのような組み合わせにも連結させることができる。例えば、これらは下記の配置のうちの何れかに連結させることができる：N-N/C-C-ペプチド1のN-末端をペプチド2のN-末端に連結；ペプチド2のC-末端をペプチド3のC-末端に連結。この命名を使用すると、16の可能な三量体系列がある、つまり、X/Yであり、この場合、XおよびY = N-N, N-C, C-N-またはC-Cである。D-ペプチドは、N-またはC-末端、内部場所またはこれらの組み合わせによって中心骨格にも連結させることができる。よって例えば本明細書では、1つまたは複数のD-ペプチドを、末端架橋よりも、内部残基で架橋することが企図されている。さらに三量体において、内部架橋剤を一組のペプチド（例えば、ペプチド1とペプチド2）に使用し、末端架橋剤（N-またはC-末端）をペプチド2とペプチド3の架橋に使用することが企図されている。

10

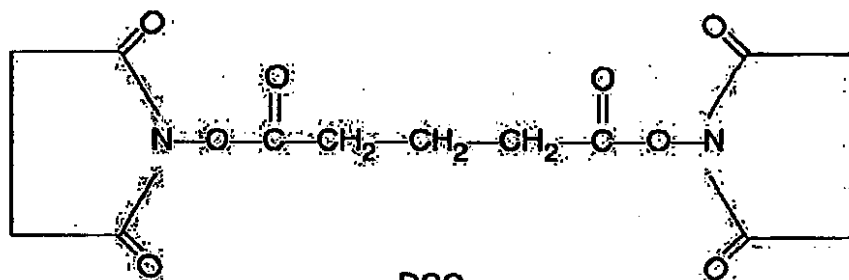
【0038】

本明細書で使用するように、多量体の命名法は、ペプチドが連結される方法を示している。例えば、C5C-PIE7-三量体は、3つのPIE7ペプチドが、Cを介して、PEG₅スペーサを使ってC-末端に連結されることを意味している。N9C-PIE7-三量体は、3つのPIE7ペプチドが、N-を介して、PEG₉スペーサを使用してC-末端に結合されることを意味している。二量体のいくつかの例として、N9C-PIE7-二量体、C9C-PIE7-二量体、N5N-PIE7-二量体、N5C-PIE7-二量体、C5C-PIE7-二量体、N0N-PIE7-二量体、N0C-PIE7-二量体およびC0C-PIE7-二量体がある。尚、長さゼロスペーサは、任意の種々の短架橋剤（例えば、BS3, DSGまたはDST）とすることができる。DSGの構造は以下の通りである：

20

【0039】

【化1】



DSG

(ジスクシニミジルグルタラート)

MW 326.26

スペーサーアーム長 7.72Å

30

40

【0040】

本明細書に開示する組成物のいくつかの実施形態において、C5C連結幾何学形状は、二量体および三量体を製造する結合として使用することができる。このような二量体の例には、C5C-PIE12-二量体およびPEG₅-PIE13-二量体（このペプチドは内部リジン残基を有し、従って、二量体はこの内部リジンを介した架橋によって製造することができる）がある。特定の実施形態において、例えばPEGリンカーを使用することができる。三量体の例には、C5C-PIE7-三量体、C5C-PIE12-三量体およびC0C-PIE7-三量体がある。

50

【 0 0 4 1 】

本明細書において使用する「PIE12-三量体」という用語は多量体の総称であり、これは、3つのPIE12単量体が種々の架橋戦略によって連結される、僅かに異なる化学組成物を有する分子の数を表している。特定の実施形態において、PIE12-三量体の1つのクラスは、中心骨格を使用せず、種々の長さのPEG架橋剤を使って単量体を連結することによって構成することができる。このような実施形態において、三量体は例えば、C×C-PIE12-三量体として示してもよく、この場合、「C×C」はリジン側鎖の唯一の第一級アミンを介するPIE12単量体の結合を表しており、リジン残基はペプチド単量体のC-末端にある。他の実施形態において、N×N-PIE12-三量体は、N-末端にあるリジンによる結合を表している。「x」はこの文脈において、個々の単量体を連結する架橋剤におけるPEGの数を表している。特定の実施形態において、2つのリジンを含む中心単量体をこの種の三量体の製造に使用することができる。この種の三量体の別の名称として、例えばC5C(PIE12)₃があり、この場合、「3」は三量体を示している。

10

【 0 0 4 2 】

本明細書に記載するPIE12-三量体のいくつかの実施形態は、PIE12単量体を三量体に連結させる種々の長さの3つのPEGリンカーまたは「アーム」を有する3価原子(すなわち窒素)をコアに含有する、中心多量体骨格を使用して構成することができる。他の実施形態において、中心多量体骨格は、個々の単量体に連結する、例えば種々の長さの3つのPEGリンカーを有する4価原子を、多量体骨格(すなわち炭素)のコアに含有することができる。

20

【 0 0 4 3 】

特定の実施形態において、作用強度を増強させたPIE12-三量体は、作用強度増強カーゴ(積み荷)部分が4価骨格の第4アームを使用してPIE12-三量体に付着された、炭素コア骨格を用いて構築することができる。このような実施形態において、種々の長さ(すなわち2~132)のPEGユニットを、第4アームの種々の部分への連結に使用することができる。PIE12-三量体の1つの例としてchol-PEG₂₄-PIE12-三量体があり、この場合、「chol」はチオコレステロールの省略形であり、「PEG₂₄」は第4アームに含まれるPEGユニットの数を指している。特定の実施形態において、作用強度増強カーゴは、マレイミドケミストリーを含む種々の化学反応により、第4アームPEGに付着させることができる。この三量体化の命名法は、本明細書に記載する他のD-ペプチド(例えば、PIE7またはPIE7-GK)に適用される。

30

【 0 0 4 4 】

本明細書に開示する多量体は、表1に開示するものを含むペプチドまたはそれらの変異体の任意の組合せにより、多量体がウイルスの細胞内侵入を阻害するように製造することができる。特定の実施形態において、多量体は、本明細書に開示するペプチドのうちの一つ、二つ、または三つ以上によって製造することができる。このような実施形態において、全てのペプチドは同一のものとする事ができる、または開示されている、または具体的に開示されていないペプチドの組合せとすることができる。特定の実施形態において、ペプチドのうち少なくとも一つは配列WXWL(配列ID番号:31)を含むことができる。他の実施形態において、本明細書に開示する多量体は、少なくとも一つのD-ペプチド、二つ以上の異なるD-ペプチド、またはその他の成分によっても製造することができる。

40

a) 多量体骨格

【 0 0 4 5 】

多量体を製造する別の戦略として、中心多量体骨格を、一つまたは複数のD-ペプチドの付着に使用することができる。特定の実施形態において、本明細書に開示する多量体骨格は、TSATのような中心三官能架橋剤トリス(スクシンイミジル)アミノトリアセテトを含むことができ、これは3つのN-ヒドロキシこはく酸イミド(NHS)エステル基を含んでいる。いくつかの実施形態において、この幾何学形状は「爪」と称される、とい

50

うのも、構造が鷲の爪と似ているからである。この戦略の2つの例として、(1)短い爪(TSATをペプチドに直接連結させる)および(2)長い爪(TSATとペプチドとの間に、6つの付加原子スペーサを含む、TSAT(LC-TSAT)の延長形を使用)がある。その他のスペーサ長さまたは組成物(例えばPEG)も使用することができる。様々な爪の構成には、PIE7-GK(長い爪)およびPIE7-GK(短い爪)が含まれる。

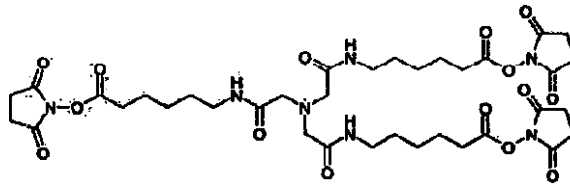
【0046】

以下にLC-TSATの代表例を示す：

【0047】

【化2】

10



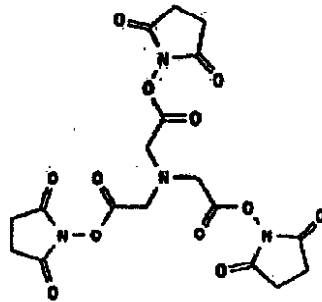
【0048】

また、下記にTSATの代表例を示す：

20

【0049】

【化3】



30

【0050】

未来型のD-ペプチドを「超設計(Over-engineering)する」とは、作用強度の限界に達した後も親和性を改善されることを意味している。このような阻害剤は改善されたインビトロの抗ウイルス作用強度を示さないが、潜在的な耐性変異(すなわち、結合親和性に穏やかに影響を与える耐性変異は、作用強度に影響を与えない)を防ぐ「耐性キャパシタ(resistance capacitor)」として作用する結合エネルギー(親和性)の蓄えを有している。この「耐性コンデンサ」の特性は、耐性を与えるために結合する僅かな多重突然変異の段階的な蓄積を防止することである。個々の突然変異は阻害剤の作用強度に影響を与えず、阻害剤の存在に増殖優位性を与えない。この「耐性コンデンサ」は三量体D-ペプチド阻害剤に特に有益である、というのも、耐性突然変異は3つのポケット全てに同時に影響を与えるからである。特定の実施形態において、耐性発現へのさらなる防御として、本明細書に開示する三量体D-ペプチドを、各々がはっきりとした耐性プロファイルを有する、3つの異なるD-ペプチド配列を使って構成することもできる。このようなヘテロ三量体は耐性発現に対して顕著な付加的バリアーを示すだろう。

40

b)ヘテロ四量体

【0051】

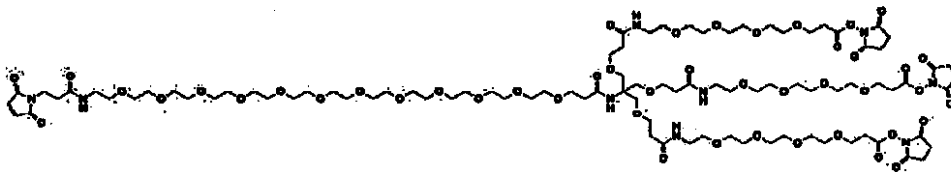
本明細書に開示するように、PIE12-三量体はHIV侵入の強力な阻害剤である。本明細書に開示する組成物の特定の実施形態において、以下のさらなる修飾が企図される、

50

その修飾は、PIE12が、1)より簡単かつ高い収率で合成できるような修飾；2)増強された薬物動態特性を有する(例えば、腎系球体ろ過分画分子量よりも小さいため、腎臓ろ過を減少させることによる)ような修飾；および3)HIV侵入の発生する細胞の表面へ局所的に集中し、キネティックポテンシーの限界を克服することにより、作用強度が改善されるような修飾、である。特定の実施形態において、これらの改善された特性のうちのいくつか、またはそれらを全て有するPIE12-三量体変異体を製造するために、カスタム設計のヘテロ四量体PEG骨格を用いることができる。この骨格は典型的には、PIE-D-ペプチドを付着させるための、一種類の反応基(例えばNHSEステル)を持つ3つのアームを有している。典型的にはより長いPEGアームを有する第4アームは、他の3つのアーム(例えば、3つのアームがNHSEステルを有している場合はマレイミド)に直交する反応基を有している。この分子ヘテロ四量体骨格設計により、任意のPEGアームの直接的な修飾が可能となり、三量体PIEの、付加された作用強度増強カーゴとの合成が著しく簡素化される。以下に本説明によるヘテロ四量体PEG骨格の例を示す。

【0052】

【化4】



【0053】

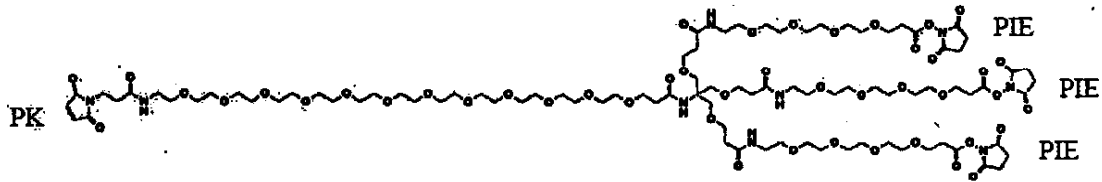
特定の実施形態において、開示する組成物はヘテロ四量体骨格などの多量体骨格を含んでおり、これは作用強度増強カーゴを含むように修飾することができる。本明細書において、作用強度増強カーゴとは、本明細書に開示する組成物の作用強度を増強させるカーゴである。いくつかの実施形態において、作用強度増強カーゴは薬物動態増強特性を有するカーゴを含んでいる。他の実施形態において、作用強度増強カーゴは、膜局在化特性を有するカーゴを含んでいる。特定の実施形態において、作用強度増強カーゴは、ペプチドのクリアランスを減少させる任意の基を含む薬物動態増強カーゴを含むことができる。例えば、本明細書では、作用強度増強カーゴを有する多量体骨格を含む組成物を開示しており、この場合、作用強度増強カーゴは、ステロ-ル(例えばコレステロール)、アルブミン、ポリエチレングリコール、糖、マルトース結合タンパク質、血清アルブミン、ユビキチン、ストレプトアビジン、免疫グロブリンDメイン、キーホールリンペットヘモシアニン、マッコウクジラ ミオ-オボアルブミン(myoalbumin)、ウシ膵臓トリプシン阻害剤、緑色蛍光タンパク質、金粒子、磁粉、アガロースビーズ、ラクトースビーズまたは脂肪酸である。他の実施形態において、作用強度増強カーゴは、(分子量を増やし、腎臓ろ過を減らすための)複数の三量体の連結などの、複数の多量体の結合であってもよい。よって、例えば、本明細書では、1つまたは複数のD-ペプチドポケット特異的侵入阻害剤(PIE)、多量体骨格および作用強度増強カーゴを含む組成物を開示し、この場合、作用強度増強カーゴはコレステロールまたはその類似体である。

【0054】

特定の実施形態において、本明細書に開示する組成物は、以下に例示する薬物動態増強カーゴを有するPIE12-三量体を含んでいる：

【0055】

【化5】



【0056】

また本明細書ではPEGリンカーも開示する。特定の実施形態において、多量体を製造するPEG化により、PEGリンカーの長さが様々となる。特定の実施形態において、このようなPEGリンカーの使用により、作用強度増強カーゴとD-ペプチドポケット標的侵入阻害剤との間に空間が提供される。PEGリンカーの長さは、IC₅₀および組成物の半減期を改善することができるかと理解され、本明細書ではそれが企図されている。しかしながらリンカーがかさ高くなりすぎると有害な影響を与えることもある。よって本明細書に開示する組成物において、PEGリンカーは、12~48のエチレングリコール反復単位を含む、作用強度増強カーゴとD-ペプチドポケット標的侵入阻害剤との間のリンカーである。従って本明細書では、それぞれPEG₁₂, PEG₁₃, PEG₁₄, PEG₁₅, PEG₁₆, PEG₁₇, PEG₁₈, PEG₁₉, PEG₂₀, PEG₂₁, PEG₂₂, PEG₂₃, PEG₂₄, PEG₂₅, PEG₂₆, PEG₂₇, PEG₂₈, PEG₂₉, PEG₃₀, PEG₃₁, PEG₃₂, PEG₃₃, PEG₃₄, PEG₃₅, PEG₃₆, PEG₃₇, PEG₃₈, PEG₃₉, PEG₄₀, PEG₄₁, PEG₄₂, PEG₄₃, PEG₄₄, PEG₄₅, PEG₄₆, PEG₄₇, PEG₄₈と称される、12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47および48のエチレングリコール反復単位を含むPEGリンカーを開示する。

【0057】

PEGリンカーはPIEアームを骨格に連結するために使用されることも理解されたい。特定の実施形態では、D-ペプチドポケット標的侵入阻害剤の骨格への連結において、PEGリンカーは2, 3, 4, 5, 6, 7または8のエチレングリコール反復単位を含むことができる。

【0058】

よって開示する組成物は、1つまたは複数のD-ペプチド、多量体骨格、作用強度増強カーゴ、D-ペプチドの隣接領域の修飾およびPEGリンカーなどの、本明細書に開示する全ての特徴を含んでいると理解されたい。従って、本明細書には、1つまたは複数のD-ペプチドおよび作用強度増強カーゴを含む組成物を開示し、この1つまたは複数のD-ペプチドは多量体骨格で連結され、この多量体骨格はD-ペプチドにPEGリンカーを介して連結され、この作用強度増強カーゴは多量体骨格にPEGリンカーを介して連結される。

【0059】

本明細書に開示する多量体骨格は、多量体D-ペプチド薬物最適化(ペプチドの幾何学的形状および共役局在化カーゴを介した活性化部位への局在化の両方)のための多量体骨格ベースの設計方法に使用してもよい。特定の実施形態において、多量体骨格ベースの設計により、種々のカーゴおよびケミストリー(例えば「クリック」ケミストリー)ならびにPEGアーム長さの迅速な最適化に対応するための骨格の変化が可能になる。例えばHIVやエボラのような、エンドソーム内で膜融合を行うウイルスに関しては、本明細書に開示する多量体骨格ベースの戦略を用いて、エンドソーム標的部分を同定して付着させ、阻害剤をウイルス部位に局在化させて阻害剤作用強度を増大させることができる。さらに、本明細書に開示する多量体骨格ベース戦略の特定の実施形態では、種々の作用強度増強

10

20

30

40

50

カーゴの同定および種々の作用強度増強カーゴへの抱合による薬物動態特性（例えば、大きく分岐したPEG、アルブミンまたはアルブミン結合ペプチド）の調節、および膜の局在化が可能である。

c) 多量体の結合活性

【0060】

本明細書には、本明細書に開示する多量体およびN-三量体分子を含む組成物を開示し、多量体はN-三量体分子と会合されると、N-三量体分子の単一のペプチドまたは対照（コントロール）ペプチドの親和性と比べて増大されたN-三量体分子への親和性を有している。単一のペプチドまたは対照ペプチドは、多量体の成分のうちの1つと同一であってもよい、または単一のペプチドは、多量体に含まれていない異なるペプチドであってもよい。

10

【0061】

多量体は、多量体のみ成分のうちの1つの親和性と比較した場合、約2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、25倍、30倍、40倍、50倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍または10,000倍の、N-三量体への親和性の増加を呈することができる。

【0062】

多量体は、本明細書に開示する特徴または特性の何れかを有することができる。本明細書に開示する多量体は何れも、本明細書に記載するような結合活性を有することができる、それらのうちの何れも、本明細書に開示するウイルス侵入の阻害を増大させる方法を用いて、使用することができる。

20

d) ペプチド変異体

【0063】

また本明細書には、本明細書に記載および本明細書において企図される、ペプチドの変異体も開示する。ペプチド変異体および誘導体は当業者に十分理解されており、アミノ酸配列修飾を含むことができる。ウイルス侵入の阻害に使用することのできる、本明細書に開示するペプチドは、そのようなアミノ酸配列修飾を含むことができる。当業者であれば、ペプチドの活性を保持するためにどの修飾を行えばよいのかすぐに決定することができるだろう。

【0064】

本明細書に開示するペプチドの類似体もまた企図される。これらの類似体には、ペプチド構造の1つまたは複数のD-アミノ酸が含まれ、これらは、本来のペプチドの特性が維持されるように、同族アミノ酸と置換される。特定の実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸残基において、保存アミノ酸置換を行うことができる。「保存アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が類似した側鎖を有するアミノ酸残基と交換されることである。類似した側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーには、当技術分野では、基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非電極側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分岐側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）があると定義されている。本明細書に開示するペプチドのペプチド構造において行うことのできる同族置換の非限定的例には、D-フェニルアラニンのD-チロシン、D-ピリジルアラニンまたはD-ホモフェニルアラニンとの置換、D-ロイシンのD-バリンまたはその他の脂肪族側鎖を有する天然または非天然アミノ酸との置換、および/またはD-バリンの脂肪族側鎖を有するD-ロイシンまたはその他の天然または非天然アミノ酸との置換が含まれる。これは例として示すものであり、制限することを意図するものではない。当業者であれば、D-ペプチドへの保存的置換を行うことができるだろう。

30

40

【0065】

50

本明細書に開示する各々のD-ペプチドは、gp41のN-三量体領域における深い溝のポケットと接触する特定の残基を含むと理解されたい。例えば、残基2, 3, 4, 8, 9, 11, 12および15はPIE7の接触残基であり、残基2, 3, 7, 8, 10, 11および14はPIE12の接触残基である。PIE7およびPIE12の両方において、E, WならびにWおよびLに対応する残基はコア配列EWXWL(配列ID番号: 30)を形成し、内部で最も接触する残基(internal most contact residues)(PIE7には残基8, 9, 11, 12およびPIE12には残基7, 8, 10, 11)が含まれている。本明細書では、接触残基で置換が行われると、深い溝に対するD-ペプチドの結合親和性に大きな影響を与えることができると企図されている。変化をより受け入れることのできる残基は、非接触残基ならびにペプチドのC-末端およびN-末端の接触残基である。

10

【0066】

記載する保存性突然変異および相同性は、変異体が保存性突然変異である特定の配列に対する少なくとも70%の相同性を有する実施形態のように、任意に組み合わせることができる。と理解されたい。

【0067】

自然に発生するペプチドの反対の立体異性体およびペプチド類似体の立体異性体を開示する。これらのアミノ酸は、最適なアミノ酸をtRNA分子に担持させること、およびアミノ酸類似体をペプチド鎖に部位特異的な方法で挿入するために、例えばアンバーコドンを用いる遺伝的構築体を操作することにより、ポリペプチドに容易に取り込ませることができる(Thorsonら、Methods in Molec. Biol. 77: 43-73(1991), Zoller, Current Opinion in Biotechnology, 3: 348-354(1992); Ibbá, Biotechnology & Genetic Engineering Reviews 13: 197-216(1995), Cahillら、TIBS, 14(10): 400-403(1989); Benner, TIB Tech, 12: 158-163(1994); IbbáおよびHennecke, Bio/technology, 12: 678-682(1994)これらは全て、少なくともアミノ酸類似体関連材料に関して、参照として本明細書に援用する)。

20

【0068】

ペプチドに似せた分子であるが、天然のペプチド結合を介して連結されないものを製造することができる。例えば、アミノ酸またはアミノ酸類似体への結合には、CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂-CH₂-, -CH=CH- (シスおよびトランス), -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- および -CHH₂SO- がある(これらの結合およびその他の結合は、下記に見つけることができる: Spatola, A. F. in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p. 267(1983); Spatola, A. F., Vega Data(March 1983), Vol. 1, Issue 3, Peptide Backbone Modifications (general review); Morley, Trends Pharm Sci (1980) pp. 463-468; Hudson, Dら、Int J Pept Prot Res 14: 177-185(1979) (-CH₂NH-, CH₂CH₂-); Spatolaら、Life Sci 38: 1243-1249(1986) (-CHH₂-S); Hann J. Chem. Soc Perkin Trans. 1307-314(1982) (-CH-CHH-, cis and trans); Almquistら、J. Med. Chem. 23: 1392-1398(1980) (-COCH₂-); Jennings-Whiteら、Tetrahedron Lett 23: 2533(1982) (-COCH₂-); Szelkeら、European Appln, EP 45665

30

40

50

CA (1982):97:39405(1982)(- - CH(OH)CH₂ - -); Holladayら、Tetrahedron. Lett 24:4401-4404(1983)(- - C(OH)CH₂ - -); および Hruby Life Sci 31:189-199(1982)(- CH₂ - - S -)。これらはそれぞれ参照として本明細書に援用する。代替的な非ペプチド結合は - - CH₂NH - - である。ペプチド類似体は結合原子の間に、b - アラニン、g - アミノブチル酸など、2以上の原子を有していると理解されたい。

【0069】

大抵のアミノ酸類似体およびペプチド類似体は、より経済的な製造、より大きな化学安定性、増強された薬理作用(半減期、吸収、作用強度、有効性など)、変化した特異性(例えば、生物活性の広いスペクトル)、低減された抗原性などの、増強された、または所望の特性を有している。

10

2. 医薬担体/医薬品の送達

【0070】

本明細書に開示するペプチドおよび多量体(あるいは組成物と称する)は、薬学的に許容可能な担体にインピボで投与することもできる。「薬学的に許容可能な」とは、生物学的に、またはその他の意味において望ましくない材料でない材料のことである。すなわち、そのような材料は、望ましくない生物学的効果を何れも引き起こすことなく、その材料が含まれる医薬組成物のその他の成分の何れとも有害に相互作用することなく、本明細書に開示するペプチドと共に被験者に投与することのできる材料である。当事者に周知のように、このような担体は、有効成分の分解を最小限に抑え、被験者の副作用を最小限に抑えるように、自然に選択される。

20

【0071】

組成物は、局所鼻腔内投与、吸入による投与を含む経口、非経口(例えば静脈注射)、筋肉注射、腹腔内注射、皮下注射、経皮的、体外的、局所的投与によって投与することができる。本明細書において使用する、「局所鼻腔内投与」とは、鼻孔の片方または両方を通して組成物を鼻および鼻腔に送達することであり、噴霧機構もしくは滴下機構またはエアロゾル化によるものを含んでいる。組成物の吸入による投与は、噴霧または滴下機構によって鼻または口に送達する。送達はまた、挿管を介して呼吸器系(例えば肺)などの部分にも直接行うことができる。必要とされる組成物の正確な量は、被験者の種、年齢、体重および全身状態、疾患の重症度、投与様式などにより、被験者によって異なる。よってあらゆる組成物について正確な量を特定するのは不可能である。しかしながら当業者は、本明細書に教示する日常的な実験を使って、適量を決定することができる。

30

【0072】

組成物の非経口投与は、一般的に注射によって行われる特徴がある。注入材料は、溶液または懸濁液、注射前の液体内の懸濁液に適切な固形、または乳濁液として、従来の形式によって調製することができる。近年見直された非経口投与の手法には、一定の用量が保たれるような、緩効性または徐放性のシステム(すなわちデポー(持効性製剤))の使用が含まれている。本明細書に参照として援用する米国特許第3,610,795号を参照されたい。

40

a) 薬学的に許容可能な担体

【0073】

ペプチドおよびその多量体を含む組成物は、薬学的に許容可能な担体と組み合わせて治療的に使用することができる。

【0074】

適切な担体およびそれらの製剤は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (19th ed.) ed. A. R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA 1995に記載されている。典型的には、適量の薬学的に許容可能な塩を製剤に使用して、製剤を等張にする。薬学的に許容可能な担体の例には、生理食塩水、リン

50

ゲル液およびブドウ糖液があるが、これらに限定されない。溶液のpHは約5～約8、あるいは約7～約7.5である。さらなる担体は、抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスなどの持続放出製剤を含んでおり、そのマトリックスは例えば、フィルム、リポソームまたは微粒子などの成形体の形状である。当業者にとって、例えば、投与ルートおよび投与される組成物の濃度により、特定の担体がより好適となることは明らかであろう。

【0075】

薬学的担体は当業者には周知である。最も典型的には、これらはヒトへ薬物投与を行うための標準的な担体であり、無菌水、生理食塩水および生理的pHの緩衝液が含まれる。組成物は、筋肉注射または皮下注射によって投与することができる。その他の化合物は当業者によって使用される標準的な手順に沿って投与される。

10

【0076】

薬学的組成物は、最適な分子に加え、担体、増粘剤、希釈剤、緩衝剤、防腐剤、界面活性剤などを含むことができる。薬学的組成物はまた、抗菌剤、消炎剤、麻酔剤などの1つまたは複数の有効成分も含むことができる。

【0077】

薬学的組成物は、局所的な処置が所望されるのか、全体的な処方が所望されるのか、または処置の行われる部分により、多くの方法で投与することができる。投与は、局所的（眼内、腔内、直腸内、鼻腔内を含む）、経口、吸入または点滴、皮下注射、腹腔内注入または筋肉注射などの非経口によって行うことができる。開示するペプチドおよびその多量体は、静脈注射、腹腔内注射または筋肉注射により、皮下、腔内または経皮で投与することができる。

20

【0078】

非経口投与の製剤として、無菌水または非水溶液、懸濁液および乳濁液がある。非水溶液の例には、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油およびオレイン酸エチルなどの注入可能な有機エステルがある。水性担体として、生理食塩水および緩衝化媒体を含む、水、アルコール/水溶液、乳濁液および懸濁液がある。非経口媒体には、塩化ナトリウム溶液、リンガー・デキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸加リンガー液または固定油がある。静脈内媒体には、流動体および栄養補給、電解質補給（リンガー・デキストロースに基づくもののような）などが含まれる。例えば、抗菌剤、抗酸化剤、照合剤、不活性ガスなどの防腐剤およびその他の添加剤も存在させることができる。

30

【0079】

局所投与の製剤には、軟膏、ローション、クリーム、ジェル、点滴剤、座薬、噴霧、液体および粉末が含まれる。従来の薬学的担体、水溶液、粉末または油性基剤、増粘剤などは必要または望ましい

【0080】

経口投与の組成物には、粉末または顆粒、懸濁液または水溶液、非水性媒体、カプセル、小袋または錠剤がある。増粘剤、香料、希釈液、乳化剤、分散補助剤または結合剤は望ましい。さらに本明細書において、経口投与のために設計された組成物は、消化管透過剤をさらに含むことができると企図されている。

40

【0081】

組成物の中には、塩酸、臭化水素酸、過塩素酸、硝酸、チオシアン酸、硫酸およびリン酸などの無機酸および/またはギ酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、乳酸、ピルビン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸およびフマル酸のような有機酸の反応、または水酸化ナトリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カリウムおよび/またはモノ-、ジ-、トリアルキルおよびアリアルアミンのような有機塩基との反応によって形成される、薬学的許容可能な酸または塩基付加塩として投与される可能性のあるものがある。

b) 治療上の使用

【0082】

50

本明細書に開示するペプチドおよびペプチドの多量体を含む、本明細書に開示する組成物を投与する場合の効果的な投与量および投与スケジュールは経験的に決定され、このような決定は、当業者が備えている技能の範囲内で決定されることができ。組成物の投与量の範囲は、症状/疾患が影響を受ける望ましい効果の製造に十分な範囲である。投与量は、好ましくない交差反応、アナフィラキシー反応のような副作用を引き起こすほど多量であってはならない。一般に投与量は患者の年齢、状態、性別および疾患の広がり、投与経路または投薬スケジュールに他の薬物が含まれているか否かによって変えられ、当事者によって決定されることができ。投与量は、禁忌の場合には、各医師によって調節することができる。投与量は変更でき、日々一回または複数回の投与を一日または数日間行うことができる。ガイダンスは、特定のクラスの医薬品、特にD-ペプチドの適切な投与量の文献で見つけることができる。このようなガイダンスの例は、文献全体で見つけることができる。例えば、FDA認証ペプチドFUZEON(登録商標)は、本明細書に開示するペプチドに必要なとされる投与量のガイドとして使用することができる。一実施形態では、単独で使用されるペプチドまたはペプチドの多量体の典型的な一日の投与量は、上述の要因により、体重の約1μGKg~100mGKgである。さらに、本明細書に開示するペプチドは、被験者の状態、治療のその他の方法などにより、一日、一週間、一ヶ月または一年に数回投与することができる。当業者であれば、適切な投与スケジュールが容易にわかるであろう。

10

【0083】

HIVなどのウイルス感染の治療、阻害または防止のための、ペプチドなどの開示する組成物の投与に続き、ペプチドまたはペプチドの多量体の有効性を、当業者に周知の種々の方法によって評価することができる。例えば当事者は、本明細書に開示するD-ペプチドなどの組成物がウイルス感染の治療または阻害に有効であることを、その組成物がウイルス侵入を阻害することを観察することによって理解するだろう。開示する組成物の投与の有効性は、感染した被験者内における感染していない細胞の数を測定することによっても決定することができる。被験者または患者における感染していない細胞の初期における、またはその後の減少を阻害する治療、または、例えばHIV陽性被験者における、未感染細胞数の増加となる治療は、有効な治療である。予防治療(すなわち予防薬)の有効性も、CD4+細胞カウント、抗ウイルス抗体レベルおよびウイルスRNAレベルを検出するPCRなどの、間接的な感染測定によっても評価することができる。

20

30

【0084】

本明細書に開示するウイルス侵入を阻害する組成物、すなわち殺菌剤は、HIVなどのウイルスにさらされるリスクのある、またはHIVに新たにさらされた患者または被験者に予防的に投与することができる、HIVなどのウイルスに新たにさらされたが、ウイルスの存在が血液中またはその他の体液中にまだ表れていない(ウイルス検出用のPCTまたはその他のアッセイでの測定による)被験者における、ペプチドまたはペプチドの多量体による治療には、本明細書に記載する組成物、ペプチドまたは多量体の治療的に有効な投与量を被験者に投与して、細胞に感染するウイルスの能力を部分的または完全に阻害することが含まれる。

【0085】

開示するペプチドは、ウイルス膜貫通タンパク質を阻害することによって、ウイルス侵入を阻害するために使用することができる。「ウイルス膜貫通タンパク質の阻害」という用語は、細胞内に侵入することのできるウイルス粒子数の低減を指している。これは完全な阻害を意味し、換言すれば、細胞に侵入することのできるウイルス粒子がないことであり、また、部分的な阻害を意味する。つまり、あるシステムにおいて、治療されていない、またはコントロール(対照)システムと比較して、細胞に侵入することのできるウイルス粒子数が低減した、または抑制されたことを意味する。細胞に侵入することのできるウイルス粒子数の低減には、1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39,

40

50

40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99または100%低減、あるいはこれらの量以上、以下またはこれらの量の間の量がある。さらに「ウイルス侵入を阻害する」とは、ウイルスの細胞への融合および侵入の低減を意味する。

3. チップおよびマイクロアレイ

【0086】

少なくとも1つのアドレスが、本明細書に開示する任意のペプチド配列に規定された配列または配列の一部であるチップを開示する。

10

【0087】

また、少なくとも1つのアドレスが、本明細書に開示する任意のペプチド配列に規定された配列の変異体または配列の一部であるチップも開示する。

4. コンピュータ読み取り可能な媒体

【0088】

開示するペプチドは、アミノ酸で構成される配列として表示されることができ理解されたい。これらの配列を表示する種々の様式があり、例えばアミノ酸バリンはValまたはVで表すことができる。当業者は、存在する種々の様式の何れかで任意のペプチド配列をどのように表示すればよいかを理解し、その各々は本明細書において考慮される。本明細書では特に、市販のフロッピーディスク、テープ、チップ、ハードドライブ、コンパクトディスクおよびビデオディスク、またはその他のコンピュータ読み取り可能な媒体などにおけるこれらの配列の表示について検討する。また、開示する配列の2進コードによる表示も開示する。当業者であればコンピュータ読み取り可能な媒体が何れであることを理解するだろう。よってコンピュータ読み取り可能な媒体にはペプチド配列が記録、格納または保存される。

20

5. 開示する組成物によるスクリーニングによって同定される組成物

a) コンビナトリアルケミストリー

【0089】

開示するペプチドは、所望の様式で、開示する組成物と相互作用する分子または高分子分子を同定する、任意のコンビナトリアル技術の標的として使用することができる。本明細書に開示するペプチドおよび関連分子は、コンビナトリアル手法の標的として使用することができる。また、例えば配列ID番号：1～36に開示される組成物またはその一部分が、コンビナトリアルまたはスクリーニングプロトコルにおいて鑄型として使用される、コンビナトリアル技術またはスクリーニング技術プロトコルによって同定される組成物も開示する。

30

【0090】

開示する組成物をコンビナトリアル技術またはスクリーニング方法で使用する場合、高分子分子などの分子は、gp41相互作用の阻害または刺激などの特定の望ましい特性を有するものとして同定される。その他のペプチドなどの、開示する組成物を使って同定、単離される分子も開示する。よって、コンビナトリアル手法またはスクリーニング手法を使って製造される、ペプチドなどの開示する組成物を含む製造物も、本明細書において考慮される。

40

b) コンピュータを使った薬物設計

【0091】

開示するペプチドおよびペプチドの多量体は、任意の分子モデリング技術の標的として、開示するペプチドまたは多量体の何れかの構造の同定、または所望の様式で開示する組成物と相互作用する、小分子のような潜在的または実際の分子を同定するために使用することができる。本明細書に開示するペプチドおよび関連分子は、任意の分子モデリングプログラムまたは手法において標的として使用することができる。

50

【 0 0 9 2 】

開示する組成物をモデリング技術で使用する場合、高分子分子などの分子は、ウイルス阻害などの特定の特徴を有するものとして同定されることを理解されたい。ペプチドおよびペプチドの多量体などの、開示する組成物を使って同定および単離される分子も開示する。よって、開示する組成物を含む分子モデリング手法を使って製造される製造物も、本明細書に開示されると考えられる。

【 0 0 9 3 】

一般に、最適な分子に結合する分子を単離する1つの方法は、合理的設計によるものである。これは、構造情報およびコンピュータモデリングによって達成される。コンピュータのモデリング技術により、選択された分子の三次元原子構造が可視化され、分子と相互作用する新しい化合物の合理的な設計が可能となる。三次元構造は、典型的には選択された分子のX線結晶学分析またはNMR分析からのデータに依存する。分子動力学シミュレーションは、力場データを必要とする。コンピュータグラフィックスシステムにより、新規化合物がどのように標的分子に連結するのかの予測が可能となり、結合特異性を完全なものにするために、化合物および標的分子の構造の実験的操作が可能となる。片方または両方において小さな変化が作製される場合の分子/化合物間の相互作用の予測には、通常、分子設計プログラムとユーザとの間の、ユーザーフレンドリーなメニュー方式のインターフェースと連結される、分子力学ソフトウェアおよび演算集約的コンピュータが必要である。

【 0 0 9 4 】

分子モデリングシステムの例として、CHARMMおよびQUANTAプログラム(Polygen Corporation, Waltham, MA)がある。CHARMMはエネルギーの最小化および分子動力学の機能を行う。QUANTAは分子構造の構成、グラフィックモデリングおよび分析を行う。QUANTAは双方向性構築、改変、可視化および相互の分子挙動の分析を可能にする。

【 0 0 9 5 】

多くの論文が、特定のタンパク質と相互作用するコンピュータモデリングについて記載しており、例えば、Rotivinenら、1988 Acta Pharmaceutica Fennica 97, 159~166; Ripka, New Scientist 54~57 (June 16, 1988); McKinallyおよびRossman, 1989 Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29, 111~122; PerryおよびDavies, QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships, in Drug Design pp. 189~193 (Alan R. Liss, Inc. 1989); LewisおよびDean, 1989 Proc. R. Soc. Lond. 236, 125~140および141~162があり、核酸成分のモデル酵素に関しては、Askewら、1989 J. Am. Chem. Soc. 111, 1082~1090がある。化学薬品をスクリーニングし、グラフィック描写するその他のコンピュータプログラムは、BioDesign, Inc., Pasadena, CA Allelix, Inc, Mississauga, Ontario, CanadaおよびHypercube, Inc., Cambridge, Ontarioから入手可能である。

【 0 0 9 6 】

結合を変化させ得る化合物の設計および製造に関して説明したが、天然物または合成化学薬品およびタンパク質を含む生物活性材料を含む、周知の化合物を含む化合物ライブラリーをスクリーニングすることができる。

6. キット

【 0 0 9 7 】

本明細書に開示する方法の実施に使用することのできる試薬に引き込むキットを開示する。これらのキットは、本明細書に論じるか、または開示する方法に必要とされるまたは

10

20

30

40

50

有益であると理解される任意の試薬または試薬の組み合わせを含むことができる。例えば、これらのキットは、本明細書に開示するペプチドまたはペプチドの多量体を含む薬学的組成物を含むことができる。例えば、本明細書に開示するペプチドまたはペプチドの多量体を含む薬学的組成物を含む、HIV治療用のキットを開示する。

7. 類似の機能を有する組成物

【0098】

本明細書に開示するペプチドは、ウイルス侵入の阻害など、特定の機能を有することを理解されたい。本明細書に開示するのは、開示する機能を行う特定の構造的な要求事項であり、開示する構造に関連する同じ機能を行うことのできる種々の構造があり、これらの構造は、例えばウイルス侵入阻害など、最終的に同じ結果を達成することを理解されたい。

10

C. 組成物の作製方法

【0099】

本明細書に開示する組成物および方法を行うために必要な組成物は、特に指定のない限り、その特定の試薬または化合物に関する、当業者に周知の方法によって作製することができる。

1. ペプチド合成

【0100】

本明細書に開示するペプチドは、例えばジスルフィド架橋結合によって結合することができる。例えば、本明細書に開示するD-ペプチドは、ペプチドを環状化させてより小さく構成されたペプチドを製造するジスルフィド結合によって結合された、2つのシステイン残基を有している。このジスルフィドは、増強された抗ウイルス特性を有していることが知られている。当業者に周知の、ペプチドを環状化する代替方法が多数ある。例えば、ペプチドはラクタムまたはその他の化学架橋、PEGまたはその他の化学架橋剤、ペプチドライゲーションまたファージセレン結合（セレノシステイン間）を使って環状化することができる。

20

【0101】

2つ以上のペプチドまたはポリペプチドは、タンパク質化学技術によって結合することができる。例えば、ペプチドまたはポリペプチドは、Fmoc（9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基）またはBoc（tert-ブチルオキシカルボニル基）を使った、現在利用可能な実験室設備を使って化学的に合成することができる（Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA）。当事者は、例えば開示するタンパク質に対応するペプチドまたはポリペプチドが、標準的な化学反応によって合成されることを容易に理解することができる。例えば、ペプチドまたはポリペプチドは合成することができ、その合成樹脂から開裂することはできないが、他のペプチドまたはタンパク質の断片は合成することができ、よって樹脂から開裂され、その結果、他の断片において機能的にブロックされている末端基をさす。ペプチド縮合反応により、これらの2つの断片は、ペプチド結合によってそれらのカルボキシルおよびアミノ末端のそれぞれにおいて共有結合され、抗体またはその断片を形成することができる（Grant GA (1992) *Synthetic Peptides: A User Guide*. W. H. Freeman and Co., N. Y. (1992); Bodansky MおよびTrost B., Ed. (1993) *Principles of Peptide Synthesis*. Springer Verlag Inc., NY、これらを少なくともペプチド合成に関する資料として、参照のため、本明細書に援用する）。一旦単離されると、同様のペプチド縮合反応により、これらの独立したペプチドまたはポリペプチドを連結して、ペプチドまたはその断片を形成することができる。

30

40

【0102】

例えば、クローン化または合成されたペプチドセグメントの酵素ライゲーションにより、比較的短いペプチドセグメントを結合させ、大きなペプチドセグメント、ポリペプチドまたは全タンパク質ドメインの製造が可能になる（Abrahmsen Lら、Biochemistry, 30:4151 (1991)）。あるいは、合成ペプチドの天然化学

50

ライゲーションを利用して、短いペプチドセグメントから大きなペプチドまたはポリペプチドを合成的構築することができる。この方法は、2つのステップの化学反応より構成される(Dawsonら、*Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. Science*, 266:776779(1994))。第1ステップでは、無保護の合成ペプチドチオエステルとアミノ末端システイン残基を含む別の無保護のペプチドセグメントとの官能基選択的反応により、最初の共有性製造物として、チオエステル結合中間体を製造する。反応条件の変更を行わずに、この中間体は自発性迅速分子内反応を経て、連結部位において本来のペプチド結合を形成する(Baggiolini Mら、(1992)、*FEBS Lett.* 307:97~101; Clark Lewis Iら、*J. Biol. Chem.*, 269:16075(1994); Clark Lewis Iら、*Biochemistry*, 30:3128(1991); Rajarathnam Kら、*Biochemistry* 33:6623~30(1994))。

【0103】

あるいは、化学ライゲーションの結果として、ペプチドセグメント間に形成される結合が非天然(非ペプチド)結合である場合は、無保護のペプチドセグメントを化学的に連結させる(Schnolzer, Mら、*Science*, 256:221(1992))。この技術は、タンパク質ドメインの類似体、および十分な生物学的活性を有する大量の比較的純粋なタンパク質の合成に用いられてきた(deLisle Milton R Cら、*Techniques in Protein Chemistry IV. Academic Press, New York, pp. 257~267(1992)*)。

【0104】

鏡像ファージディスプレイを使用して、N-三量体ポケットと結合してHIV侵入を穏やかな作用強度で阻害するD-ペプチドを発見することができる。例えば、D-ペプチドのスクリーニングにおける鏡像ファージディスプレイの使用において、第1D-ペプチドを、HIV糖タンパク質由来の第1L-ペプチドから合成することができる。この第1L-ペプチドは、自然発生するL-ペプチド、または設計されたペプチド配列および天然ペプチド配列のキメラとすることができる。この方法はさらに、第1D-ペプチドと特異的に結合する第2L-ペプチドのスクリーニングを含むことができ、その後第2L-ペプチドの鏡像である第2D-ペプチドを合成することができる。本明細書に記載するD-ペプチドスクリーニング方法の一態様では、N-三量体標的を先ずD-アミノ酸と合成させて、天然L-N-三量体標的の鏡像を製造する。D-N-三量体標的は、ファージディスプレイ、リボゾームディスプレイおよび/またはCISディスプレイなどの標準ペプチドベーススクリーンに使用して、D-N-三量体に結合するL-ペプチドを同定することができる。それから同定されたL-ペプチドはD-アミノ酸と合成させることができる。対称律により、結果として生じるD-ペプチドは天然のL-N-三量体と結合させ、HIVプレヘアピン中間体のN-三量体領域を標的とし、これによってHIV感染の治療または阻害を行う。このスクリーニング法は、Schumacherらによる、*Identification of D-peptide ligands through mirror-image phage display, Science*, 1996 Mar 29; 271(5257):1854~1857にも記載されており、この全体を本明細書において参照として援用する。

D. 組成物の使用方法

1. 組成物を研究ツールとして使用する方法

【0105】

本明細書に、10未満のコアの残基長のペプチドを含む組成物の能力を、細胞へのウイルス侵入阻害能力について評価する方法を開示し、この方法には、当該成分が相互作用するのに十分な条件において、組成物および細胞をインキュベーションするステップ; 当該成分をウイルスと接触させるステップ; およびウイルスの細胞内侵入を阻害する組成物の

能力を評価するステップを含んでいる。ペプチドは、7, 8, 9または10未満のコアアミノ酸残基を含むことができる。ペプチドは上述の開示のように、多量体として存在することができる。組成物は、HIV gp41などのウイルス貫通膜タンパク質と相互作用することにより、ウイルスの侵入を阻害することができる。ペプチドはD-ペプチドとすることができる。さらに、ウイルス侵入を阻害する組成物の能力の評価は、レポーター手段の検出によって行うことができる。このようなレポーター手段の例として、放射性同位体、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤または酵素があるが、これらに限定されない。ウイルス侵入を阻害する組成物の能力の評価は、その結合部位（gp41 N-三量体ポケット）から他の化合物（例えば、ペプチド、小分子、核酸、天然物）によって転位される組成物の能力を評価することによって行うことができる。「
10
転位される」とは、組成物が結合を阻害される、または結合部位とのその相互作用を妨害されることを意味する。これは、結合部位から試験組成物の5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95または100%転位において発生し得る。

【0106】

ウイルス侵入を阻害する組成物の能力は、ウイルス侵入アッセイまたは細胞間融合アッセイを使用して測定することができる。ウイルス侵入アッセイは、細胞間融合アッセイとして当事者に周知である。当事者は、試験組成物を他の結合部位から転位することのできる、その他の化合物を含む転位アッセイを使用することができる。例として、ペプチド、小分子、核酸または天然物が含まれるが、これらに限定されない。このような転位アッセイは当業者に周知である。
20

【0107】

また、単一ペプチドのうちの1つの親和性と比較して、N-三量体分子のために増大された親和性を有する多量体を同定する方法も開示し、この方法は、多量体およびN-三量体分子をインキュベーションするステップ；N-三量体分子の多量体の親和性を測定するステップ；およびN-三量体分子の多量体の親和性を単一ペプチドのN-三量体分子の親和性と比較するステップを含む。

【0108】

さらに、単一ペプチドの抗ウイルス活性と比べてN-三量体分子の増強された抗ウイルス活性を有する多量体を同定する方法を開示し、この方法は、多量体を細胞でインキュベーションするステップ；ステップ(a)の成分をウイルスと接触させるステップ；多量体の抗ウイルス活性を測定するステップ；および多量体の抗ウイルス活性を単一ペプチドの抗ウイルス活性と比較するステップを含んでいる。単一ペプチドは多量体の成分のうちの1つと同じであってもよいし異なってもよい。多量体はウイルスgp41のN-三量体ポケットと相互作用する、少なくとも1つのペプチドを含むことができる。
30

【0109】

gp41の複合体形成の阻害は、蛍光アッセイ（例えばFRET）などの手段により、複合体の2つのメンバーの結合の発生する程度を決定することによって評価することができる。この手段において、C34およびN36はそれぞれ、一組のドナーアクセプター分子のメンバーによって標識化される、またはペプチドのうちの1つのペプチドの片方の端部（例えば、C34のN-末端）がそのような対（EDANS）のうちの片方によって標識化される、そしてN36ペプチドに存在する天然の蛍光性トリプトファンが、ドナー/アクセプター対のもう片方のメンバーによって標識化される。C34とN36との結合は、アクセプターモデルから発光が生じる程度、および/または放出された光の波長スペクトルが変化する程度によって評価される。候補薬物による結合の阻止により、発光の程度が変化する、および/またはC34とN36の結合が発生した場合における波長の変化が阻止される。あるいは、C34は（例えば、キナーゼまたは放射性ATPで標識化することのできるキナーゼ認識部位を有する変異体C34を合成することにより）放射標識などの検出可能な標識によって標識化することができる。放射標識化されたC34および候補薬物は、固体面（例えば、ビーズまたはプラスチックウェル）に固定化されたN36と合
40
50

わせて、このようにして試験試料を製造する。標識化されたC34と固定化されたN36との結合発生の程度を決定し、候補薬物(対照試料内において)は存在しないが、試験試料が受ける条件と同じ条件下で、標識化されたC34の固定化されたN36との結合が生じる程度と比較する。典型的には、この評価は、C34とN36の結合が生じる適切な条件下で試料を十分な時間保持し、その後結合していないC34および薬物候補を洗浄して除去した後に行う。試験試料において、固定化されたN36に結合した放射標識が対照試料よりも少ないことによって明らかのように、試験試料において、結合が対照試料よりも少ない程度で生じた場合、その候補薬物はC34とN36の結合の阻害剤である。あるいは、C34における標識またはタグを結合対のメンバーとすることができ、もう片方のメンバーをN36への結合を検出するために使用することができる。例えば、C34はビオチンタグ付けすることができ(例えば、標準的な固相ペプチド合成によって)、これを候補薬物(試験試料)と共に、または候補薬物(対照薬物)を欠いた状態においてN36と合わせる。このN36は溶液状態であってもよいし、あるいはビーズ、ウェルまたは平坦/平面状の表面などの固体表面に結合させてもよい。C34のN36への結合は、標識化されたストレプトアビジン(例えば、ストレプトアビジン-HRP、ストレプトアビジン-APまたはヨウ素化ストレプトアビジン)を使用することにより、N36に会合するビオチンの存在を検出することによって評価することができる。ストレプトアビジンはC34上のビオチンを結合し、それ自身その標識化によって検出される。結合が候補薬物(試験試料)の存在する場合の方が候補薬物(対照試料)の存在しない場合よりも少なく生じた場合、試験試料内の方が対照試料内よりもN36に検出されるビオチンが少ないことによって示されるように、その候補薬物はC34/N36結合の阻害剤である。このような候補薬物は、例えば合成有機化合物またはランダムなペプチド配列のライブラリーから得ることができ、合成的に、または組換え技術によって製造することができる。

【0110】

同様に、C34/N36の結合を破壊する候補薬物の能力を評価して、C34/N36の阻害剤、よってHIV感染の阻害剤を同定することができる。本実施形態では、予め形成するC34/N36複合体を候補薬物と結合させ、これに関してこの結合を破壊する能力について評価し、そうすることによって試験試料を製造する。対照試料は試験試料と同じであるが、対照試料は候補薬物を含んでおらず、試験試料と同じ様に処理する。C34/N36結合が候補薬物の存在下で破壊され、対照試料の存在下では破壊されない場合、または複合体の破壊が対照試料内よりも試験試料内において多く発生する場合、その候補薬物はC34/N36の阻害剤(破壊剤)である。C34/N36結合の検出/阻止/妨害を検出するための結合破壊の検出は、上述の様にすることができる(例えばFRETまたは蛍光アッセイ、放射標識またはビオチンなどその他の検出可能標識の検出により)。

【0111】

別の実施形態において、本発明は、HIV gp41のN-ヘリックスコイルドコイルキャビティに結合する薬物を同定する方法に関するものである。この場合も、アッセイは結合の欠失または減少の評価に基づくものであるが、HIV gp41のN-ヘリックス領域によって形成される溝の任意の部分との相互作用を含む、または検出するより一般的なアッセイである、上述のC34/N36複合体アッセイとは異なり、本実施形態ではHIV gp41疎水性ポケット(N-ヘリックスコイルドコイルキャビティ)に注目している。本実施形態において、この方法は、HIV gp41のN-ヘリックスコイルドコイルキャビティに結合する能力について評価する候補薬物を、タンパク質のコイルドコイル領域の三量体形態およびHIV gp41キャビティを含むのに十分な部分のHIV gp41のN-ペプチド部分を含む融合タンパク質と、ペプチドまたはその他の分子による結合のためにHIV gp41キャビティを提示するのに適切な条件下において合わせるステップ;およびその候補薬物が融合タンパク質に結合するかどうかを決定するステップ(例えば、高処理スクリーニングによって)を含んでいる。結合が生じる場合、その候補薬物は「ヒット(hit)」であり、この候補薬物はHIV gp41のN-ヘリックスコイルドコイルキャビティに結合する薬物である可能性がある。結合が生じる場合、そ

10

20

30

40

50

の候補薬物はN-ヘリックスコイルドコイルと結合しており、コイルドコイルキャビティと結合していると決定することができる。このような「ヒット」は、細胞間融合アッセイおよびHIV感染性アッセイなどの二次アッセイでスクリーニングを行い、その候補薬物が薬物となるかどうかを決定する。あるいは、またはさらに、このような「ヒット」は、ポケット結合分子が結合しない他の融合タンパク質（またはペプチド）を用いた対照スクリーニングによって、さらに評価することができる。

【0112】

さらなる実施形態では競合アッセイを実行する。本実施形態では、HIV gp41のN-ヘリックスコイルドコイルキャビティに結合するペプチドまたはタンパク質を、候補薬物および融合タンパク質と合わせ、その候補薬物がHIV gp41キャビティに結合するかどうかを、HIV gp41のN-ヘリックスコイルドコイルキャビティと結合するペプチドの存在下で決定する。その候補薬物が融合タンパク質と結合する場合、それはHIV gp41キャビティに結合する薬物である。例えば、GCN4の三量体形態のコイルドコイル領域と、N-ヘリックスコイルドコイルキャビティを含むHIV gp41のN-ペプチドのC-末端とを含む融合タンパク質（IQN17）を、N-ヘリックスコイルドコイルキャビティと、HIV gp41のN-ヘリックスコイルドコイルキャビティに結合する能力を評価される候補薬物と結合する「参照」D-ペプチド（例えば、本明細書に記載する任意のD-ペプチドまたはその変異体）と合わせて試験試料を製造し、これをD-ペプチドのキャビティへの結合に適切な条件で維持する。候補薬物を除いて試験試料と同じ成分を含み、試験試料と同様に取り扱われる対照試料も評価する。両方の試料において、参照D-ペプチドの結合を評価する。参照D-ペプチドの結合が、候補薬物（試験試料内）の存在する方が、それが存在しない（対照試料内）よりも少なく発生する場合、その候補薬物はHIV gp41のN-ヘリックスコイルドコイルキャビティに結合する薬物である。結合の検出は、例えば本開示のC34/N36実施形態として上記に示すものと同じ様に評価する。例えば、D-ペプチドは放射標識または結合対の第1メンバー（例えばビオチン）などの検出可能な標識によって標識化し、N-ヘリックスコイルドコイルキャビティが標識化されている範囲（参照D-ペプチドのキャビティへの結合に適切な条件下で試料を維持した後に）を決定する。放射標識化を使用する場合、融合タンパク質が放射標識化されている範囲を試験試料内で評価し、対照試料において融合タンパク質が放射標識化されている範囲と比較する。検出可能な標識が結合対の第1メンバー（例えばビオチン）である場合、その対の第2メンバー（結合パートナー）を試料に加え、融合タンパク質が参照D-ペプチドに結合されている範囲を検出する。これは直接的または間接的に行うことができる（例えば、結合対の第2メンバーに結合する抗体またはその他の部分などの分子を付加することによって）。その候補薬物がD-ペプチドのキャビティへの結合を阻害する（全体的または部分的に）場合、融合タンパク質（N-ヘリックスコイルドコイルキャビティ）上にはより小さな範囲の標識が存在する。対照試料（候補薬物が存在しない）内よりも試験試料（候補薬物が存在する）内の方が少ない範囲で結合が起こる場合、その候補薬物はHIV gp41のN-ヘリックスコイルドコイルキャビティに結合する薬物である。

【0113】

D-エナンチオマーにおけるIQN17またはその変異体は、ライブラリーまたはコレクションのメンバーであり、gp41のN-ヘリックスコイルドコイルに結合する分子または化合物の同定に有益である。例えば、ファージディスプレイライブラリーなどの分子または化合物のライブラリーもしくはコレクションは、D-エナンチオマーにおいてIQN17でスクリーニングを行い、ポケットに結合するメンバーを同定することができる。これは本明細書に記載するように問題なく行われる。IQN17の鏡像またはその変異体は、標識分子として使用する。本明細書で使用する「ポリペプチドのD-エナンチオマー」および「D-ペプチド」という用語は、天然の掌体における分子の正確な鏡像を指す。よって、IleおよびThrなどの第2キラル中心を含むアミノ酸残基において、自然に発生するアミノ酸残基の正確な鏡像は、ポリペプチドのD形態の製造に使用される。また本

10

20

30

40

50

明細書で使用する「D - アミノ酸」および「L - アミノ酸」という用語は、どちらも非キラルアミノ酸グリシンを含むことを意味する。D - I Q N 1 7 は、結合対の片方のメンバー（例えばビオチン）をそれに付加し、さらに対のもう片方のメンバー（例えばストレプトアビジン）を固体表面に付加することなどにより、固体表面に固定化することができる。これら2つのメンバーの結合により、ファージパンニングなどのための、D - I Q N 1 7 の固定面へ固定化される。酵素認識部位（例えば、L - リジン残基が使用される G l y - L y s - G l y などのアミノ酸リンカー）であるリンカーを、D - I Q N 1 7 配列と結合対メンバーとの間（ビオチンとD - I Q N 1 7 との間）に配置して、酵素認識部位（この場合はトリプシン認識部位）を提供し、結合ファージを酸添加などの非特定溶出よりも、トリプシン消化によって溶出するようにする。ファージディスプレイライブラリーは、適切なファージ遺伝子に融合された任意の適切な長さのL - アミノ酸ペプチドのライブラリーとすることができる。一実施形態において、これはM 1 3 ファージの g I I I 遺伝子に融合されるL - アミノ酸ペプチドのファージディスプレイライブラリーである。一実施形態において、ペプチドは、システインまたはセリン側面に隣接する10のランダムにコード化されたアミノ酸残基を含んでいる。典型的には、一連のパンニングを数回行う。D - I Q N 1 7 特異的結合ファージを同定する。D - I Q N 1 7 の g p 4 1 領域のみに結合するファージは、抗原を欠くウェルに対するスクリーニング、および分子のパネルに対するさらなる試験などの、パンニング後の評価によって同定することができる。例えば、特異的なポケットに結合するファージには、D - I Q N 1 7 には結合するが、D - G C N 4 - p I Q I （I Q N 1 7 と同様に3つの表面突然変異がある）または疎水性ポケットに点突然変異のあるD - I Q N 1 7 の形態、グリシン39がトリプトファンに突然変異し、ポケット内へ大きく突出してしまうD - I Q N 1 7 （G 3 9 W）とは結合しないものが含まれる。このようにして同定されるD - ペプチドは、細胞間融合アッセイおよびH I V 感染性アッセイなどの周知のアッセイを使用して、H I V g p 4 1 を阻害する能力について評価することができる。本明細書に記載する鏡像ファージディスプレイ法は、I Q N 1 7 およびI Q N 1 7 （G 3 9 W）、ならびにそれらのD - エナンチオマーの、g p 4 1 ポケットに結合するH I V - 1 侵入阻害剤を同定する価値を実証した。同定された9つの特異的なポケット結合ファージ配列（D - I Q N 1 7 には結合するがD - I Q N 1 7 （G 3 9 W）には結合しないファージ）のうち、8つはコンセンサスE W X W L 配列を含んでおり、D - ペプチドとして試験した際に、H I V - 1 g p 4 1 により誘導されるシンシウム形成を阻害する。9番目のペプチドは細胞に有毒であったため、さらなる試験は行わなかった。

【 0 1 1 4 】

I Q N 1 7 およびI Q N 1 7 （G 3 9 W）のD形態を、天然酵素による酵素的分解を受けない他のポケット結合分子を発見するために、他の生物学的にコード化されたライブラリーと同様の方法で使用することができる。例えば、他のファージディスプレイライブラリーを使用して、新しいD - ペプチド阻害剤（例えば、両側に隣接するシステイン残基間で異なる数の残基を有するもの、および/またはシステイン残基の両側に隣接する領域の外にランダムにコード化されたアミノ酸残基を有するもの、および/または2つ以上のシステイン残基を有するもの）を同定することができる。ファージを使用せずにペプチドライブラリーをコード化するための戦略（例えば、コード化するm R N A をペプチドに付着させる）を、D - ペプチド阻害剤の同定に使用することができる。R N A またはD N A ライブラリーを使用して（例えばS E L E X 法により）、疎水性ポケットには結合するが、天然のヌクレアーゼの基質には結合しないL - リボ - スまたはL - デオキシリボース塩基R N A またはD N A アプタマーをそれぞれ同定することができる（例えば、W i l l i a m s ら、P N A S , 7 4 : 1 1 2 8 5 （ 1 9 9 7 ） 参照のこと）。

【 0 1 1 5 】

天然のL - 掌体にあるI Q N 1 7 およびI Q N 1 7 （G 3 9 W）の形態も同様に、生物学的にコード化されたライブラリーと共に使用することができるが、最も可能性のある適用は、他の非生物学的にコード化されたライブラリーとの使用であろう。例えば、（1ピ

10

20

30

40

50

ーズに1化合物の多様性を有する)ビーズにおける化学的なコンビナトリアルライブラリーを、(例えば、放射性または発色基により)標識化されたIQN17を用いてスクリーニングを行い、IQN17に結合する分子を含むビーズを同定することができる。この例において、IQN17(G39W)を対抗スクリーニングとして使用し、ビーズ上の分子がIQN17のポケットに結合するかどうかを決定することができる(分子がIQN17(G39W)に結合した場合、それらはポケット結合分子であるとは考えられない)。別の例として、IQN17が予め結合しているビーズを、潜在的なポケット結合分子の混合物(例えば、化学材料または天然抽出物の混合物)とインキュベーションすることができる。その後(ビーズに結合している)IQN17を混合物から分離し、洗浄し、次いで、ビーズ上のIQN17に結合している分子を溶出させる条件(例えば、有機溶媒、低pH、高温度)に供することができる。溶出された分子(すなわち潜在的なポケット結合分子)を分析化学的方法(例えば、HPLC、質量分析法)によって同定することができる。IQN17(G39W)を用いた対抗スクリーニングは、真のポケット結合分子の同定を助けるために有用である。

10

【0116】

上述の方法によって同定された薬物を、その後、HIV gp41の機能(膜融合)、すなわち細胞内侵入を(完全または部分的に)阻害するその能力についてさらに試験する。これは、本明細書中に記載するシンシチウムアッセイおよび/または感染性アッセイあるいは当業者に周知であるその他のアッセイなどのインビトロアッセイ、および/または適切な動物モデルもしくはヒトにおけるインビボアッセイをさらに使用して行う。

20

【0117】

本発明の一実施形態は、HIV gp41のN-ヘリックスコイルドコイル、特にN-ヘリックスコイルドコイルポケットに結合する薬物を同定する方法である。この方法は、HIV gp41のN-ヘリックスコイルドコイルポケットを結合する能力についての評価対象の候補薬物と、可溶性三量体のコイルドコイル、およびHIV gp41ポケットを含むために十分なHIV gp41のN-ペプチド部分を含むペプチドとを、分子または化合物(例えば薬物)による結合に関して、HIV gp41ポケットの提示に適切な条件下で合わせるステップ;および、その候補薬物がHIV gp41ポケットに結合するかどうかを決定するステップを含む。候補薬物とHIV gp41ポケットとの結合が生じた場合、その候補薬物は、HIV gp41のN-ヘリックスコイルドコイルのポケットを結合する薬物である。任意選択により、候補薬物の結合は、N-ヘリックスコイルドコイルポケットに結合するペプチド(ポケットに結合するペプチドとして以前に同定されたペプチド)を候補薬物およびペプチドと合わせることを除き、上記に記載するアッセイで評価することができる。このような競合アッセイにおいて、N-ヘリックスコイルドコイルのポケットに対する候補薬物の結合を、周知の結合部分(ポケットに結合する分子または化合物)の存在下で評価する。候補薬物の結合がその周知の結合部分の存在下で生じた場合、その候補薬物は、周知の結合部分と十分に競合する十分な親和性でN-ヘリックスコイルドコイルのポケットに結合する薬物である。この実施形態において使用する融合タンパク質は、可溶性三量体形態のコイルドコイル、例えば、タンパク質の可溶性三量体形態のコイルドコイル領域と、HIV gp41のキャピティを含むのに十分な部分のHIV gp41のN-ペプチドとを含む。あるいは、本明細書中に示すHIV gp41の配列変異体、ヒトウイルスの別の株(例えば、HIV-2)に由来する配列、または別の種(例えば、SIV、ネコ免疫不全症ウイルス、Visnaウイルス(M. Singhra, J. Mol. Biol., 290:1031(1999))に由来する配列を、融合タンパク質または可溶性モデルにおいて使用することができる。融合タンパク質は、任意のタンパク質の可溶性の三量体状のコイルドコイルを含むことができる。ただしそれがHIV成分を有する融合タンパク質にある場合、HIVキャピティは結合が得られるような方法で提供される。これは例えば、GCN4-pIQI、GCN4-pII、モロニ-マウス白血病ウイルス(Mo-MLV)またはABCヘテロ三量体の融合タンパク質であり得る。一実施形態において、融合タンパク質はD型のIQN17である。別の実施形態に

30

40

50

において、融合タンパク質は天然のL掌体のIQN17である。

【0118】

競合アッセイ形式において、N-ヘリックスコイルドコイルのキャビティに結合することが知られているペプチドはどれも、周知の結合部分として使用することができる。例えば、本明細書中に記載するペプチドの何れか、あるいはその変異体またはその一部を使用することができる。また、ペプチドでない任意のポケット結合分子を競合アッセイ形式において使用することができる。競合アッセイは溶液中、ビーズ上または固体表面で実行することができる。

【0119】

一実施形態において、候補薬物を検出可能に標識化し、候補薬物のHIV gp41のN-ヘリックスコイルドコイルへの結合を、HIV gp41のN-ヘリックスコイルドコイル上の検出可能な標識の存在を検出することによって決定する(標識化された候補薬物のN-ヘリックスコイルドコイルへの結合の結果として)。可溶性モデルのヘリックスコイルドコイルポケット上の標識の検出により、候補薬物のN-ヘリックスコイルドコイルのポケットへの結合が示され、候補薬物がN-ヘリックスコイルドコイルのポケットに結合する薬物であることが示される。標識化された候補薬物が融合タンパク質上で検出された場合、その候補薬物はN-ヘリックスコイルドコイルのキャビティに結合する薬物である。

【0120】

HIV gp41のN-ヘリックスコイルドコイルのポケットに結合する薬物を同定する方法の別の実施形態において、薬物による結合に利用できるような方法で、ポケットを提示する可溶性モデルを候補薬物と合わせ、候補薬物と可溶性モデルのN-ヘリックスコイルドコイルとの結合が生じるかどうかを決定する。結合が生じる場合、その候補薬物は、ポケットに結合する薬物である。この場合もまた、競合アッセイ形式を使用することができる。競合アッセイの成分(例えば、IQN17およびD-ペプチド)を、蛍光基/消光基の組み合わせを含む様々な検出可能な標識のうちの何れかによって標識化することができる。候補薬物を、上述の様に、様々な検出可能な標識のうちの何れかで標識化することができる。この実施形態において使用する可溶性モデル(融合タンパク質)の成分、および競合アッセイ形式において使用する競合部分もまた、上述の通りとすることができる。

【0121】

本発明はまた、HIV gp41のN-ヘリックスコイルドコイルポケットに結合する薬物を製造する方法に関するものである。一実施形態において、この方法を下記のように行う; HIV gp41のN-ヘリックスコイルドコイルのポケットを提示する可溶性モデル、または可溶性の三量体コイルドコイルを含む融合タンパク質を、薬物による結合のためのHIV gp41ポケットの提示に適切な条件下で、HIV gp41のN-ヘリックスコイルドコイルのポケットと結合させ、細胞内への侵入を阻害するその能力について評価される候補薬物と合わせる。その候補薬物がHIV gp41のポケットと結合するかどうかを決定し、この場合、候補薬物のHIV gp41におけるN-ヘリックスコイルドコイルのポケットへの結合が生じる場合、その候補薬物は、HIV gp41のN-ヘリックスコイルドコイルキャビティに結合する薬物である。本実施形態において、融合タンパク質として、可溶性三量体コイルドコイルと、HIV gp41のN-ヘリックスコイルドコイルのポケットを含むのに十分な部分のHIV gp41のN-ペプチドとを含む、本明細書中に記載するIQN17をこの方法において使用することができる; IQN17のDエナンチオマーもまた、(例えば、鏡像ファージ適用において)使用することができる。HIVの細胞内侵入を阻害するために製造された薬物の能力は、本明細書中に記載するように、例えば、シンシチウムアッセイおよび/または感染性アッセイにて評価する。そのような能力は、適切な動物モデル、またはヒトにおいてさらに評価することができる。

【0122】

本発明はまた、H I V g p 4 1のN - ヘリックスコイルドコイルのポケットに結合する薬物を製造する方法に関するものである。この方法は、H I V g p 4 1のN - ヘリックスコイルドコイルポケットの可溶性モデルを製造、または得るステップ；H I V g p 4 1のN - ヘリックスコイルドコイルのポケットに結合するその能力について評価する候補薬物（分子または化合物）と、H I V g p 4 1のN - ヘリックスコイルドコイルポケットの可溶性モデルとを合わせるステップ；およびその候補薬物がH I V g p 4 1のN - ヘリックスコイルドコイルのポケットに結合するかどうかを決定するステップを含む。その候補薬物がH I V g p 4 1のN - ヘリックスコイルドコイルのポケットに結合する場合、その候補薬物は、H I V g p 4 1のN - ヘリックスコイルドコイルのポケットに結合する薬物である。その結果、H I V g p 4 1のN - ヘリックスコイルドコイルキャ
 10
 ビティに結合する薬物を製造する。本実施形態において使用する融合タンパク質は本明細書中に記載されており、例えば、I Q N 1 7、I Q N 1 7のDエナンチオマー、またはその変異体であり得る。あるいは、H I V g p 4 1のN - ヘリックスコイルドコイルのポケットに結合して、H I Vの細胞内侵入を阻害する薬物は、下記のステップを含む方法によって製造することができる：本明細書中に記載する、H I V g p 4 1のN - ヘリックスコイルドコイルポケットの可溶性モデルを製造、または得るステップ；この可溶性モデルと、H I V g p 4 1のN - ヘリックスコイルドコイルのポケットを結合するその能力について評価される候補薬物とを合わせるステップ；その候補薬物が可溶性モデル（融合タンパク質）のN - ヘリックスコイルドコイルのポケットに結合するかどうかを決定する
 20
 ステップ、この場合、結合が生じる場合、その候補薬物は、H I V g p 4 1のN - ヘリックスコイルドコイルに結合する薬物である；およびN - ヘリックスコイルドコイルに結合してH I Vの細胞内侵入を阻害する薬物の能力を評価するステップ、この場合、その薬物がH I Vの細胞内侵入を阻害する場合、その薬物は、H I V g p 4 1のN - ヘリックスコイルドコイルポケットに結合してH I Vの細胞内侵入を阻害する薬物である。H I Vの細胞内侵入を阻害するその能力は、（例えば、シンシチウムアッセイ、感染性アッセイにおいて）インビトロで、あるいは（例えば、適切な動物モデルまたはヒトにおいて）インビボで評価することができる。可溶性モデルは、タンパク質の可溶性三量体コイルドコイルなどの可溶性三量体コイルドコイルおよび、H I V g p 4 1のポケットを含むのに十分な部分のH I V g p 4 1のN - ペプチドを含むペプチドであり得る。

【 0 1 2 3 】

本明細書中に記載する方法および他の方法によって同定または製造される薬物であって、H I V g p 4 1の特定のN - ヘリックスコイルドコイルに結合してH I Vの細胞内侵入を阻害する薬物もまた本発明の課題である。

【 0 1 2 4 】

本明細書中に記載する方法および他の方法によって同定または製造される薬物であって、H I V g p 4 1の2つ以上のN - ヘリックスコイルドコイルに結合して、H I Vの細胞内侵入を阻害する薬物もまた本発明の課題である。そのような薬物は、阻害の有効性を増大させるために、例えば、適切なリンカー（例えば、アミノ酸残基または他の化学的部分）を介して、2つ以上のポケット結合分子（薬物）を連結することによって得ることができる。連結されるポケット結合分子は同じであっても、異なってもよい。本明細書
 40
 中に記載する方法または他の方法によって同定または製造される薬物であって、H I V g p 1 2 0 , C D 4 , C C R 5 , C X C R 4 , またはH I V g p 4 1の非ポケット領域への結合に加え、H I V g p 4 1のN - ヘリックスコイルドコイルポケットに結合する薬物もまた本発明の課題である。

【 0 1 2 5 】

H I V g p 4 1を阻害する薬物はまた、本明細書中に示すI Q N 1 7と2 K - P I E 1との複合体のX線結晶構造を参照して設計または改善することができる。あるいは、またはさらに、H I V g p 4 1を阻害する薬物は、本明細書中に示す、遊離I Q N 1 7のX線結晶構造を参照して設計または改善することができる。

【 0 1 2 6 】

10

20

30

40

50

本明細書中に記載するようにして同定された化合物および分子（薬物）は、HIVの細胞内侵入を（部分的または完全に）阻害し、よって、未感染個体（ヒト）および感染個体において、（例えば、未感染個体における感染を防止または低減するために、感染個体におけるさらなる感染を低減または予防するために）治療的に有用であり、そして、gp41により誘導される膜融合の機構を研究するための研究用試薬、および個体によるウイルスクリアランス速度を評価するための研究用試薬の両方として有用であり、また、HIVの細胞内侵入を阻害する他の化合物および分子（薬物）を発見または開発するための試薬として有用である。本明細書中に記載するD-ペプチド（例えば、D10pep5, D10pep1）は、本明細書中に記載する感染性アッセイにより、細胞の感染を阻害することが分かっている。その他のD-ペプチドは、感染性を阻害するその能力について同様に評価することができる。

10

【0127】

上述の様に、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）を使って推定阻害剤を同定し、相互作用を迅速に同定することができる。この技術の根底にある理論は、2つの分子が空間的に接近している場合、すなわち、自然に存在するよりも近いレベルで相互作用する場合、信号が製造される、または信号をクエンチすることができるというものである。そして、例えば推定阻害剤の添加を含む、種々の実験を行うことができる。その阻害剤が2つの信号分子間の相互作用と競合する場合、それらの信号を空間で相互に取り除き、そうすることにより、使用する信号の種類に応じて信号が増減する。このような信号の増減は、推定阻害剤の存在または不在と関連づけることができる。任意の信号手段を使用することができる。例えば、開示する任意の2つの分子間の相互作用の阻害剤を特定する方法を開示する。この方法は下記のステップを含む；推定阻害剤の存在下で、第1分子と第2分子とを接触させるステップであって、第1分子または第2分子は蛍光ドナーを含み、ドナーを含まない第1分子または第2分子は、典型的には蛍光アクセプターを含むステップ；および、推定阻害剤の存在する場合と存在しない場合において蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）を測定するステップ。このステップにおいて、推定阻害剤が存在する場合のFRETの減少は、それが存在しない場合のFRET測定と比べて、推定阻害剤が2つの分子間の結合を阻害することを示している。このような方法は、細胞システムにおいても行うことができる。

20

【0128】

新規(*de novo*)活性化または修飾活性化を有するタンパク質を単離させる多くの方法がある。例えば、ファージディスプレイライブラリーは、特定の標的と相互作用する多数のペプチドを単離させるために使用されてきた。（例えば米国特許第6,031,071号、5,824,520号、5,596,079号および5,565,332号参照のこと。これらを、少なくともファージディスプレイ関連材料およびコンビナトリアルケミストリーに関する方法に関して、本明細書に参照として援用する。）

30

【0129】

当業者に周知である方法論を用い、種々のコンビナトリアルなライブラリーと併せて、所望の標的と結合または相互作用する小分子を単離し、特徴づけることができる。当業者に周知の競合的な結合研究を使って、これらの化合物の相対的結合親和性を比較し、最適な化合物を同定することができる。

40

【0130】

所望の標的に結合する分子を単離させるためのコンビナトリアルなライブラリーの作製およびコンビナトリアルなライブラリーのスクリーニング技術は当業者に周知である。代表的な技術および方法は、下記の米国特許に見つけることができるが、それらに限定されない；米国特許第5,084,824号、5,288,514号、5,449,754号、5,506,337号、5,539,083号、5,545,568号、5,556,762号、5,565,324号、5,565,332号、5,573,905号、5,618,825号、5,619,680号、5,627,210号、5,646,285号、5,663,046号、5,670,326号、5,677,195号、5,68

50

3, 899号、5, 688, 696号、5, 688, 997号、5, 698, 685号、5, 712, 146号、5, 721, 099号、5, 723, 598号、5, 741, 713号、5, 792, 431号、5, 807, 683号、5, 807, 754号、5, 821, 130号、5, 831, 014号、5, 834, 195号、5, 834, 318号、5, 834, 588号、5, 840, 500号、5, 847, 150号、5, 856, 107号、5, 856, 496号、5, 859, 190号、5, 864, 010号、5, 874, 443号、5, 877, 214号、5, 880, 972号、5, 886, 126号、5, 886, 127号、5, 891, 737号、5, 916, 899号、5, 919, 955号、5, 925, 527号、5, 939, 268号、5, 942, 387号、5, 945, 070号、5, 948, 696号、5, 958, 702号、5, 958, 792号、5, 962, 337号、5, 965, 719号、5, 972, 719号、5, 976, 894号、5, 980, 704号、5, 985, 356号、5, 999, 086号、6, 001, 579号、6, 004, 617号、6, 008, 321号、6, 017, 768号、6, 025, 371号、6, 030, 917号、6, 040, 193号、6, 045, 671号、6, 045, 755号、6, 060, 596号および6, 061, 636号。

【0131】

コンビナトリアルなライブラリーは、多くの様々な合成技術を使って、多岐にわたる分子から作製することができる。例えば、融合2, 4-ピリミジンジオン(米国特許第6, 025, 371号)、ジヒドロベンゾピラン(米国特許第6, 017, 768号および第5, 821, 130号)、アミドアルコール(米国特許第5, 976, 894号)、ヒドロキシアミノ酸アミド(米国特許第5, 972, 719号)、炭水化物(米国特許第5, 965, 719号)、1, 4-ベンゾジアゼピン-2, 5-ジオン(米国特許第5, 962, 337号)、サイクリック(米国特許第5, 958, 792号)、ピアリアルアミノ酸アミド(米国特許第5, 948, 696号)、チオフェン(米国特許第5, 942, 387号)、三環式テトラヒドロキノリン(米国特許第5, 925, 527号)、ベンゾフラン(米国特許第5, 919, 955号)、イソキノリン(米国特許第5, 916, 899号)、ヒダントインおよびチオヒダントイン(米国特許第5, 859, 190号)、インドール(米国特許第5, 856, 496号)、イミダゾールピリドインドールおよびイミダゾールピリドベンゾチオフェン(米国特許第5, 856, 107号)置換2-メチレン2, 3-ジヒドロチアゾール(米国特許第5, 847, 150号)、キノリン(米国特許第5, 840, 500号)、PNA(米国特許第5, 831, 014号)、含有タグ(米国特許第5, 721, 099号)、ポリケタイド(米国特許第5, 712, 146号)、モルフォリノーサブユニット(米国特許第5, 698, 685号および第5, 506, 337号)、スルファミド(米国特許第5, 618, 825号)およびベンゾジアゼピン(米国特許第5, 288, 514号)を含むライブラリーがある。

【0132】

本明細書では、コンビナトリアルな方法およびライブラリーを含む従来のスクリーニング法およびライブラリー、ならびに反復ステップにおいて使用される方法およびライブラリーを使用する。本発明によるペプチドは、研究ツールとして種々の様式で使用する事ができる。例えば、配列ID番号: 1~22などの本発明によるペプチドは、例えば、ウイルス侵入またはタンパク質の適切な折り畳みの阻害剤として作用することにより、gp41の研究に使用することができる。

2. ウイルス侵入阻害方法

【0133】

本明細書に、ウイルスの細胞への感染を阻害する方法、またはウイルス侵入を阻害する方法を開示し、これらの方法には、ウイルスを本明細書に開示する組成物、ペプチドまたは多量体にさらし、そうすることによってウイルスの細胞への感染を阻害するステップを含んでいる。ウイルスはHIVであり得る。ペプチドまたは多量体は薬学的組成物に含有させることができる。また、本明細書に記載する薬学的組成物を投与方法も開示する

【0134】

特定の実施形態において、本明細書に開示する、ウイルスの細胞への感染を阻害する方法は、ポリエチレングリコール（PEG）リンカーで作用強度増強カーゴに連結する、少なくとも1つのD-ペプチドを含む組成物を投与するステップを含む。特定の実施形態において、この方法は、少なくとも1つのD-ペプチドおよび作用強度増強カーゴを含む組成物を投与するステップを含んでおり、この少なくとも1つのD-ペプチドは配列ID番号：1～29のうちの少なくとも1つであり、作用強度増強カーゴは、コレステロール、脂肪酸およびアルカン鎖のうちの少なくとも1つである。このような一実施形態において、この方法はchol-PEG₂₄-PIE12を含む組成物を投与するステップを含んでいる。

10

【0135】

他の実施形態において、本明細書に開示する、ウイルスの細胞への感染を阻害する方法は、多量体骨格に連結する少なくとも3つのD-ペプチドを含む組成物を投与するステップを含んでおり、この少なくとも3つのD-ペプチドはPEGリンカーで多量体骨格に連結している。このような特定の実施形態において、この方法は、多量体骨格に連結する少なくとも3つのD-ペプチドを含む組成物を投与するステップを含んでおり、この少なくとも3つのD-ペプチドは、配列ID番号：1～29のうちの少なくとも1つを含んでいる。このような一実施形態において、これらの方法は、PEG₄-PIE12-三量体を含む組成物を投与するステップを含んでいる。

20

【0136】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示する、ウイルスの細胞への感染を阻害する方法は、多量体骨格に連結する少なくとも3つのD-ペプチドおよび少なくとも1つの作用強度増強カーゴを含む組成物を投与するステップを含んでいる。いくつかの特定の実施形態において、これらの方法は、多量体骨格に連結する少なくとも3つのD-ペプチドおよび少なくとも1つの作用強度増強カーゴを含む組成物を投与するステップを含んでおり、この場合、多量体骨格は、3つのNHSEステル基および4つめの直交基を含むヘテロ四量体骨格である。さらに別の実施形態において、これらの方法は、多量体骨格に連結する少なくとも3つのD-ペプチドおよび少なくとも1つの作用強度増強カーゴを含む組成物を投与するステップを含んでおり、ここで、少なくとも1つの作用強度増強基は、4つめの直交基を介して、PEGリンカーによって多量体骨格に連結している。いくつかの特定の実施形態において、これらの方法は、多量体骨格に連結する少なくとも3つのD-ペプチドおよび少なくとも1つの作用強度増強カーゴを含む組成物を投与するステップを含んでおり、ここで、少なくとも1つの作用強度増強基は、コレステロール、脂肪酸またはアルカン鎖である。このような実施形態において、これらの方法は、chol-PEG₁₂-PIE12-三量体、chol-PEG₁₆-PIE12-三量体、chol-PEG₂₄-PIE12-三量体、chol-PEG₃₆-PIE12-三量体、chol-PEG₅₇-PIE12-三量体、chol-PEG₁₃₂-PIE12-三量体、C8脂肪酸-PEG₂₄-PIE12-三量体、C16脂肪酸-PEG₂₄-PIE12-三量体、C18脂肪酸-PEG₂₄-PIE12-三量体、C8アルカン-PEG₂₄-PIE12-三量体、C16アルカンPEG₂₄-PIE12-三量体およびC18アルカン-PEG₂₄-PIE12-三量体のうちの少なくとも1つを含む組成物を投与するステップを含んでいる。

30

40

【0137】

本明細書に開示する方法は、他のウイルス療法すなわち抗ウイルス剤と併せて使用することができる。これらの抗ウイルス剤のうちの1つまたは複数を使用することができ、それらは本明細書に開示する組成物による治療の前、治療中または治療後に投与することができる。例えば、治療中、被験者には、本明細書に記載する組成物を他の処置と一緒に投与することができる、つまり他の処置は、本発明の組成物による処置の約48時間、24時間、12時間、8時間、4時間、2時間、1時間、30分、20分、10分、5分または1分前に投与することができる。他の方法の処置も、本明細書に開示する組成物で処置

50

を行う前に投与することができる。「治療前」とは、現在の治療の前に、別の形態による処置が与えられ、そして中止されることを意味する、または、現在の抗ウイルス剤の直前に与え、後から再度投与することも意味する。この場合、他の方法による抗ウイルス治療は、数年、数ヶ月、数週間、数日、数時間または数分前に行うことができる。他の方法による処置も、本明細書に開示する組成物による処置後に与えることもできる。「処置後」とは、現在の治療が行われた後に別の形態の処置を行うこと、または、現在の治療前にいき、後に再度行うことを意味する。この追加の抗ウイルス剤は、現在の治療後、数年、数ヶ月、数週間、数日、数時間または数分後に与えることができる。

【0138】

さらなる抗ウイルス剤はウイルス複製阻害剤、ウイルスプロテアーゼ阻害剤、ウイルス逆転写酵素阻害剤、ウイルス侵入阻害剤、ウイルスインテグラーゼ阻害剤、ウイルスRev阻害剤、ウイルスTat阻害剤、ウイルスNef阻害剤、ウイルスVpr阻害剤、ウイルスVpu阻害剤およびウイルスVif阻害剤からなる群より選択することができる。

【0139】

抗ウイルス化合物のさらなる例として、インフルエンザおよびその関連症状の治療に用いられる、アマンタジン、リマンタジンおよびオセルタミビル(タミフル)があるが、これらに限定されない。HIVの治療に有益な抗ウイルス化合物には、Combivir(登録商標)(ラミブジン/ジドブジン)、CRIXIVAN(登録商標)(インジナビル)、EMTRIVA(登録商標)(エムトリシタピン)、EPIVIR(登録商標)(ラミブジン)、FORTOVASE(登録商標)(サキナビル-sg)、HIVID(登録商標)(ザルシタピン)、INVIRASE(登録商標)(サキナビル-hg)、KALETRA(登録商標)(ロピナビル/リトナビル)、LEXIVA(商標)(ホスアンブレナビル)、NORVIR(登録商標)(リトナビル)、RITROVIR(登録商標)(ジドブジン)、SUSTIVA(登録商標)(エファビレンツ)、VEDEX EC(登録商標)(ジダノシン)、VIDEX(登録商標)(ジダノシン)、VIRACEPT(登録商標)(ネルファナビル)、VIRAMUNE(登録商標)(ネビラピン)、ZERIT(登録商標)(スタブジン)、ZIAGEN(登録商標)(アバカビル)、FUZEON(登録商標)(エンフビルチド)、RESCRIPTOR(登録商標)(デラビルジン)、REYATAZ(登録商標)(アタザナビル)、TRIZIVIR(登録商標)(アバカビル/ラミブジン/ジドブジン)、VIREAD(登録商標)(テノホビルジソプロキシルフマル酸塩)、ISENTRESS(登録商標)(ラルテグラビル)、SELZENTRY(登録商標)(マラビロク)およびAGENERASE(登録商標)(アンブレナビル)がある。

【0140】

ウイルス感染の例には、(マイナス鎖RNAウイルス、プラス鎖RNAウイルス、二重鎖RNAウイルスおよびレトロウイルスを含む)あらゆるRNAウイルスおよびDNAウイルスによって生じる感染があるが、これらに限定されない。ウイルスの例には、(HIV-1およびHIV-2を含む)HIV、パルボウイルス、パピロ-マウイルス、麻疹、フィロウイルス(例えば、エボラ、マールブルク)、SARS(重症急性呼吸器症候群)ウイルス、ハンタウイルス、インフルエンザウイルス(例えば、インフルエンザA、BおよびCウイルス)、肝炎ウイルスA~G、カリシウイルス、アストロウイルス、レオウイルス、コロナウイルス(例えば、ヒト呼吸器多核体ウイルスおよびSARS多核体ウイルス(SARS-CoV)、ピコルナウイルス(例えば、ヒトライノウイルスおよびエンテロウイルス)、エボラウイルス、ヒトヘルペスウイルス(例えば、帯状疱疹を含むHSV-1-9、エプスタインバ-およびヒトサイトメガロウイルス)、口蹄疫ウイルス、ヒトアデノウイルス、アデノ関連ウイルス、呼吸系発疹ウイルス(RSV)、天然痘ウイルス(痘瘡)、牛痘、サル痘、ワクシニア、ポリオ、ウイルス性髄膜炎およびハンタウイルスがあるが、これらに限定されない。

【0141】

動物に関しては、ウイルスには、任意の上述のヒトウイルスの動物対応ウイルス、トリ

10

20

30

40

50

インフルエンザ（例えば、H5N1, H5N2, H7N1, H7N7およびH9N2株）およびサル免疫不全ウイルス、トリ免疫不全ウイルス、偽牛痘、ウシ免疫不全ウイルス、ネコ免疫不全ウイルス、ウマ伝染性貧血ウイルス、ヤギ関節炎脳炎ウイルスなどの動物レトロウイルスがあるが、これらに限定されない。

E. 実施例

【0142】

下記の例は、本明細書に記載する化合物、組成物、物品、装置および/または方法をいかに作製して評価するかを当業者に提供するものであり、純粋に例示的な提示を意図し、開示を制限することを意図していない。数字（例えば、数量、温度など）に関する正確性を確保するための努力を行ったが、多少の誤記や誤差は考慮されるべきである。他に記載のない限り、部分とは重量部のことであり、温度は周囲温度（ ）であり、圧力は大気圧または大気圧近傍である。

10

例1：阻害D-ペプチド

a) ペプチド合成

【0143】

本実施例では、全ての合成ペプチドをN-末端アセチル基とC-末端アミド基とでキャップし、それらの質量をMALDI-TOFで確認した。粗ペプチドをC18カラム（Vydac）上で逆相HPLC（RP-HPLC）によって洗浄し、凍結乾燥した。D-ペプチド阻害剤を（0.4 mg/mL）で一晩、37、50 mM トリス中、pH 8.0、2% DMSOで酸化し、RP-HPLCを使って再洗浄した。

20

【0144】

PEG-(PDE7)₂を、新鮮に調製した架橋剤（Bis-dPEG₉（商標）、NHSエステル、Quanta BioDesign, #10246）で、1:0.6（ペプチド:PEG）のモル比で、50 mMのNaHPO₄中で、pH 7. 室温で0、2時間、PIE7（~2 mM）をインキュベーションして作製した。PEG-(PIE2-AAA)₂を同様のプロトコルを使って製造した。PEG-PIE7を、同様のプロトコルで、NHS-m-dPEG（商標）（Quanta BioDesign, #10260）を使い、モル比1:2（ペプチド:PEG）で作製した。

b) ウイルス感染性アッセイ:

【0145】

この研究にはHIV HXB株およびHIV JRFL株の使用が含まれる。ウイルス感染性は主に先に記載されているように（Hamburger 2005）、いくつかの修飾によって測定した。全てのアッセイにおいて、8 μg/mLのDEAE-Dextranを融合促進剤として使用した。感染後22~26時間で媒体を変えた。正規化データを次の式： $y = 1 / (1 + [\text{阻害剤}] / IC_{50})$ に適合させてIC₅₀値を計算した。フィットを、最低許容誤差を1%に設定した4点からの絶対semによりウェイトした。溶解にDMSOを必要とする試料（D10-p5, PEG-(PIE2-AAA)₂, PEG-(PIE7)₂およびPEG-PIE7)を、1%の最終DMSO濃度で試験し、1% DMSOを含む非阻害のコントロールに正規化した。下記の試薬をNIH（アメリカ国立衛生研究所）、NIAID（国立アレルギー-感染症研究所）、AIDS部門、AIDS Research Reference Reagent Programより、そしてTA 779およびT-20（FUZEON（登録商標））を、NIAID and Rocheよりそれぞれ調達した。

30

40

c) 結果と考察

【0146】

本明細書で考察するペプチドは、ポケット特異的侵入阻害剤（PIE）のD-ペプチドである。例として、PIE7-GK（GACDYPEWQWLCAAGK、配列ID番号：23）がある。このペプチドは、リジンがC-末端に移動しているのを除き、PIE7と同じである。この移動により、作用強度が僅かに増強され、それらのC-末端を介したペプチドの架橋が可能になる。

50

【0147】

PIE7 - GKK (GACDYPEWQWLCAAGKK, 配列ID番号: 24): これはPIE7 - GKの二重リジン変異体であり、三量体PIE7において中心ペプチドとして機能する(中心PIE7 - GKKは2つの両側に隣接するPIE7 - GKペプチドに結合される)。これらの結合は全てC - 末端を介して行われる。

【0148】

K - PIE7 - GK (KGACDYPEWQWLCAAGK, 配列ID番号: 25): これはPIE7 - GKの二重リジン変異体であり、三量体PIE7において中心ペプチドとして機能する(中心K - PIE7 - GKは両側に隣接するペプチドPIE7 - GKおよびPIE7に結合される)。これらの結合により、N - 末端は両側に隣接するペプチドのC - 末端に連結する。

10

【0149】

PIE7 - GK - PEG4 (PEG₄の付着したPIE7 - GK): このペプチドは、PEGの付加により、D - ペプチドのC - 末端においてどれくらい耐えるかを決定するためのコントロール(対照)である。このペプチドから、このような付加により耐性が向上することがわかった。

【0150】

新しいペプチドの下記のグループは、隣接配列の最適化によって発生した:

HPCDYPEWQWLCELGK (配列ID番号: 26)

HPCDYPEWQWLCKLGK (配列ID番号: 27)

HPCDYPEWQWLCRLGK (配列ID番号: 28)

HACDYPEWQWLCELGK (配列ID番号: 29)

20

【0151】

本明細書に開示する多量体は結合活性を有することがわかった。より詳細には、二量体阻害剤PEG - (PIE - AAA)₂およびPEG - (PIE7)₂は、21 nMおよび1.9 nMのIC₅₀をそれぞれ有している(表2)。これらの値は対応する単量体よりも70 ~ 325倍の改善を示している。これらのデータはまた、ファージディスプレイにおいてもみられるように、単量体阻害剤の作用強度の穏やかな改善が、二量体の結合活性によって拡大されたことを示している。PEG - (PIE7)₂の作用強度はFUZEON(登録商標)(表2)に匹敵するものである。改善された二量体の作用強度は、PEGのウイルス、細胞またはD - ペプチドとの相互作用に起因するものではなく、N - 三量体

30

【0152】

HXB2およびJRF L偽ウイルス侵入に対するD - ペプチドの阻害能力

【表2】

試料	IC ₅₀ (nM) [†] (HXB2)	IC ₅₀ (nM) (JRFL)
D10-p5	9.5	>25,000
2K-PIE1	2.2	>100,000
2K-PIE2	2.6	ND
PIE2-AAA	1.4	ND
PIE2	1.3	66,000
PIE8	1.7	~110,000
PIE7	620	24000
PIE7-GK	390	15800
PIE7-GKK	380	19100
K-PIE7-GK	ND	14800
PIE7-GK-PEG ₄	350	13100
PIE12	37	578
PIE13	41	1470
PIE14	33	1050
PIE15	67	1450
N ₂ N(PIE7) ₂	1.9	2300
N ₂ C(PIE7) ₂	0.33	310
C ₂ C(PIE7-GK) ₂	0.35	220
N ₂ N(PIE7) ₂	1.1	1410
N ₂ G(PIE7) ₂	0.58	300
C ₂ C(PIE7-GK) ₂	0.36	200
N ₂ N(PIE7) ₂	0.80	1090
N ₂ C(PIE7) ₂	0.53	400
C ₂ C(PIE12) ₂	0.29	14
PEG ₅ -(PIE13) ₂	ND	15
N ₂ N(PIE7) ₃	0.25	220
C ₂ C(PIE7-GK) ₃	0.13	6.7
C ₂ C(PIE12) ₃	ND	2.8
C ₂ C(PIE7-GK) ₃	0.12	16.1
PIE7-GK 長い爪	0.12	20.6
PIE7-GK 短い爪	0.23	86.6
C37	1.4	13.0
FUZEON®	3.7	5.0

† 全ての値に対する二重アッセイに関して、IC_{50 sem}は20%未満、
K_{D sem}は5%未満。

ND = 未検出

【0153】

本明細書に開示するペプチドの使用は、同じPIE構造を利用して、HIVクレード全体に大きな効果をもたらした。例えば、PIE12-三量体は、10 μMまでの投与量に対して無毒性を維持しながら、エンベロープサブタイプA, B, C, D, E, FおよびGをカバーする複製可能なHIV株に対して、10 nM以下のIC₅₀を示した(表3)。比較すると、FUZEON(登録商標)のIC₅₀は、3つのみの株(クレードB, Eのみ)において、10 nM以下であり、これらの場合、PIE12-三量体より6~100倍強度が低かった。実際、FUZEON(登録商標)は、HIVサブタイプAウイルスに対して、100倍少ない阻害性を持ち、サブタイプBウイルスに対しては、6~250倍少なく、サブタイプCウイルスに対しては60倍少なく、サブタイプDウイルスに対しては40~100倍少なく、サブタイプF株に対しては25~150倍少なく、サブタイプG株に対しては20~100倍少なかった。

【0154】

複製能を有するウイルスおよびPBMC標的細胞に対する阻害幅

【表3】

HIV-1分離株	エンベロープ サブタイプ	PIE12	IC50 三量体 Fuzeon (nM)
IIB	B		0.78 28.3
Ba-L	B		0.27 19.7
JR-CSF	B		0.08 7.03
JR-FL	B		0.26 1.65
92UG029	A		0.69 191
92UG037	A		0.21 41.45
93IN101	C		0.38 22.4
92BR025	C		5.19 305
92UG001	D		4.45 182
92UG046	D		1.2 130
CMU02	AE		0.35 43.8
93TH073	E		0.84 198
CMU06	E		0.38 5.65
93BR019	BF		4.72 >1,000
93BR020	F		0.37 58.5
93BR029	F		0.79 18.6
G3	G		1.21 23.3
RU570	G		0.36 37

10 μMまで毒性みられず

10

20

【0155】

例2：コレステロールカーゴ

a) D-ペプチドのコレステロールカーゴとの合成

【0156】

コレステロール作用強度増強カーゴを有するD-ペプチド単量体を、ヘテロ二官能性PEG-NHSエステル/マレイミド架橋剤を使って製造し、チオコレステロール(そのヒドロキシ基を置換したチオールを有するコレステロール)をPIE12-GKの末端リン(この場合、PEGはポリエチレングリコールで、NHSはN-ヒドロキシスクシンイミド; Quanta BioDesign, カタログ番号10994)に抱合する。D-ペプチド三量体の作用強度増強コレステロールカーゴとの合成に関しては、PIE12-GK(11 mM)をFmoc-N-アミド-dPEG₄-NHSエステルと1.05:1(ペプチド:PEG)のモル比で、トリエチルアミンで緩衝したジメチルアセトアミド(TEA, 200 mM)内において、40分間、室温(RT)で反応させた。製造物をC18逆相(RP)HPLCで洗浄し、凍結乾燥させた。次いでこの製造物を20%ピペリジン(ジメチルアセトアミド内)で再懸濁してFmoc保護基を取り除き、脱保護された製造物をC18RP-HPLCで洗浄した。この材料(PIE12-GK-PEG₄-NH₂, 10 mM)をMal-dPEG_{1,2}-Tris(NHS)₃(Quanta BioDesign, カタログ番号10676)と、3.2:1(ペプチド:骨格)のモル比で、トリエチルアミン200 mMで緩衝したジメチルアセトアミド内において、RTで40分間反応させた。反応進行をRP-HPLCで監視した。この反応物に対して、チオコレステロール(ジメチルアセトアミド90%、クロロホルム10%、TEA 200 mM中の25 mMストック溶液)を最終濃度4 mMになるように添加した。最終製造物をRP-HPLCによって洗浄し、凍結乾燥させ、そのアイデンティティを質量分析(mass 8061.81 Da)によって確認した。

30

40

【0157】

3つのNHSエステルアーム(PIE結合のために使用)の長さは、Fmoc-N-a

50

mido-dPEGx-NHSエステルを使って修飾することができ、この場合、xは1~36（離散的PEG長として）またはそれより長くすることができる（特定の平均長さを有する多分散PEGとして）。PEGは連続分子として合成してもよいし、またはより小さなPEGを使って縫合してもよい。例えば、PEG₁₂アーム上のマレイミド基をシステイン残基と反応させると、マレイミドが一級アミンに変換され、これをNHSエステルPEG-マレイミドと使用して、PEGアーム長を伸ばし、マレイミド基をその末端に戻すことができる。これは表4において星印を付したPEGの製造に使用する戦略である。

b) 結果

【0158】

表4は、HXB2およびJRFLの2つのHIV株による膜侵入阻害における、コレステロールカーゴのPIE12単量体またはPIE12三量体への抱合の結果を示す。PIE12単量体に関しては、chol-PEG₂の添加は著しく弱い阻害剤をもたらしたが、PEG₁₂リンカーは作用強度の3倍近い増強をもたらした。予測外に、PEG₂₄リンカーはPIE12単量体の作用強度を100倍増強させた。PEG₂₄のPIE12三量体への適用は、さらに大きな作用強度の増強（~250倍）をもたらした。表4において、星印は、2つのより小さなPEG鎖（例えば、PEG₂₄* = 直列結合された2つのPEG12鎖）を結合することによって組みつけられたPEG鎖を指す。

【0159】

コレステロール作用強度増強カーゴを用いた場合の、HXB2およびJRFL偽ウイルス侵入に対するD-ペプチドの阻害的作用強度

【表4】

試料	IC50 (nM) (HXB2)	IC50(nM) (JRFL)	IC50 (nM) E560K/V570IHXB2	IC50 (nM) Q577R HXB2
PIE12	37	530	240	10200
Chol-PEG ₂ -PIE12 (単量体)	58			
Chol-PEG ₁₂ -PIE12 (単量体)	11	200		
Chol-PEG ₂₄ -PIE12 (単量体)	0.40			
CSC-PIE12-三量体	0.33	2.8	0.84	2930
Chol-PEG ₁₂ -PIE12-三量体		0.044		
Chol-PEG ₂₄ -PIE12-三量体		0.020		
Chol-PEG ₂₄ *-PIE12-三量体		0.011		
Chol-PEG ₂₄ -PIE12-三量体	0.0054	0.011	0.0045	2.7
Chol-PEG ₂₄ -PIE12-三量体		0.0142		

【0160】

図1および図2に示すように、gp41ポケット領域は細胞表面からおよそ57~60離れている。従って、比較的長いリンカーを使って、膜とPIE（例えば図2のPIE12）との間のこの距離を架橋することができる。本発明の試験を行う前は、このように長いリンカーアームがコレステロールの局所的な濃縮効果を減少させる可能性があると考えていたが、驚くことにそうではなかった。表4からわかるように、長いPEGアーム（例えば、57を架橋するのに十分な長さであると予測される24または26ユニット）によって単量体PIE12または三量体PIE12に結合されるコレステロールによって、100倍以上に増強された作用強度を有する阻害剤が製造された。

【0161】

表4はまた、PIE7-二量体（E560K/V570I）およびPIE12-三量体（Q577R）について発見された2つの耐性突然変異を示している。この耐性突然変異はコレステロール連結PIE12-三量体に同様の比較影響を与えるが、コレステロール

10

20

30

40

50

連結ペプチドの大幅に増強された作用強度により、これらのペプチドは、これらの耐性株に対してさえも優れた阻害活性を維持することができる。

例3：モジュラーホモ三量体骨格

【0162】

ホモ三量体骨格は、単一容器反応におけるD-ペプチドへの抱合のために、3つのNHSEステルアーム(三量体トリメチルエステル *tri*NHS)を含有して設計された。種々の長さのPEGリンカーは、D-ペプチドに付加され、様々なPEG長さのD-ペプチド三量体の簡易な製造が可能となる。

a) ペプチド合成

【0163】

ペプチドをPTI PS3ペプチドシンセサイザーまたはRS合成によって合成し、PIE12-GKまたはHP-PIE12-GK(2つのN-末端残基、D-HisおよびD-Proが欠如しているもの)を製造した(Welch, 2007および2010)。PIE12-dPEG_{4/5}-NH₂(PIE12-三量体合成の前駆材料)を下記のように合成した: PIE12-GK(ジメチルアセトアミドDMAC内に10mM)を250mMのFmoc-N-amido-dPEG_{4/5}-NHSエステル(Quanta BioDesign 10994および10053)と、乾燥DMAC(Across Organics, 分子ふるいでシ-ルされた中隔)において、1:1のモル比で、トリエチルアミン(200mM, pH7.5)で緩衝し、60分間、RTで反応させた。この反応物を酢酸を加えて5%にクエンチし、Waters BEH X-Bridge 100μm, 300 C₁₈カラム(RP-HPLC)上で、逆相HPLC(0.1%TFAにおいて水/アセトニトリル勾配)で洗浄した。洗浄した製造物を凍結乾燥させ、DMAC内において20%ピペリジンで20分間再懸濁してFmocを取り除いてPIE12-PEG_{4/5}-NH₂を製造し、次いでこれをRP-HPLCで洗浄した。

b) 三量体合成

【0164】

PIE12-PEG_{4/5}-NH₂(10mM)を、トリメチロールエタン-*tri*NHSエステル(図3a, Quanta BioDesign 10674)250mMと、トリエチルアミン(200mM, pH7.5)で緩衝したDMAC内で、3.3:1(ペプチド:骨格)のモル比で、60分間、RTで反応させた。製造物をRP-HPLCで洗浄した。全ての質量をESI-MS(AB Sciex API-3000)によって確認した。

【0165】

コレステロールPIE12-三量体およびアルキル-PIE12-三量体を下記のように合成した: PIE12-PEG₄-NH₂(10mM)をマレイミド-PEG₂₄-*tri*NHSエステル(Quanta BioDesign 10676, DMAC内で250mM)またはマレイミド-PEG₂₄-*tri*NHSエステル(図3b, Quanta BioDesign 10680, DMAC内で250mM)と、3.3:1(ペプチド:骨格)の比で、トリエチルアミン(200mM, pH7.5)で緩衝したDMAC内で、45分間、RTで、それぞれ炭素中心多量体骨格を用いて反応させた。次いでチオコレステロール(Sigma-Aldrich, 136115, クロロホルム内250mM)、1-オクタチオール(Sigma-Aldrich, 471836)、1-ヘキサデカンチオール(Sigma-Aldrich, 52270)または1-オクタデカンチオール(Sigma-Aldrich, 01858)を添加して最終濃度を4.5mMとし、さらに60分反応させた。PEG₁₆に関しては、PIE12-PEG₄-NH₂をD-システイン(5mM)と反応させた後、最初にMal-PEG₁₂-*tri*NHSエステルと反応させ、(PIE12-PEG₄)₃-PEG₁₂-Cysを製造した。この製造物は次いで、chol-PEG₂₄-PIE12-三量体の製造に使用するものと同じ条件下において、マレイミド-PEG₄-NHSとチオコレステロールとの逐次反応前に、RP-HPLCによって洗浄した。PEG₃₆、PEG₅₇およびPEG₁₃₂-

10

20

30

40

50

三量体は、PIE12-PEG₄-NH₂のマレイミド-PEG₂₄-triNHSエステルへの抱合後、D-システインを添加することによって製造した。次いでこの中間体は、Mal-PEG₁₂-NHSエステル(Quanta Biodesign, 10284)、Mal-PEG_{2K}-NHSエステル(Creative PEGWorks, PHB-950, ~120 PEGユニット)またはMal-PEG_{5K}-NHSエステル(Creative PEGWorks, PHB-952, ~120 PEGユニット)と抱合させて、Chol-PEG₃₆-PIE12-三量体、Chol-PEG₅₇-PIE12-三量体およびChol-PEG₁₃₂-PIE12-三量体をそれぞれ製造した。この反応は、RP-HPLCによる洗浄前に、酢酸を加えることによって5%にクエンチした。

c) ウイルス感染性アッセイ

【0166】

偽ウイルス感染性アッセイを、HIV HXB2株およびHIV JRFL株、ルシフェラーゼレポーター偽ウイルス(NL4-3株)ならびにHOS-CD4-CXCR4(HXB2用)またはHOS-CD4-CCR5(JRFL用)標的細胞(Welch, 2007および2010)を使用して行った。4通りで測定した6つの濃度点を使って阻害曲線を作成し、ルシフェラーゼのカウントを非阻害のコントロールに正規化した。KaleidaGraph(商標)(Synergy Software)を使い、阻害曲線を標準IC₅₀方程式($1 - c / (IC_{50} + c)$)を用いて、各濃度点をその標準エラーによって加重して適合させた。報告されたIC₅₀の値は少なくとも2つの独立したアッセイの平均値である。

d) 結果

【0167】

D-ペプチド単量体間のPEG結合を最適化しつつ、ホモ三量体骨格を使ってD-ペプチド三量体の合成を成功させる結果となった。以前は、PIE12-GKにbis-NHSエステルPEG₅スペーサを付着することによってPIE12-三量体を合成していた。洗浄後、これらのペグ化された単量体のうちの2つを中心PIE12-GKK単量体(2つの一級アミン)と反応させてPIE12-三量体を製造した(Welch, 2010)。この方法は大規模な製造にとっては厄介である、というのもこれには三量体を組み立てるための2つの別個のD-ペプチドの合成と、連続したHPLCによる洗浄が必要であり、産出量が低くなるからである。さらにPIE12の結晶構造は、PEGリンカーが短くなると、両側に隣接するポケットと適切に架橋し、結合活性が増強されることを示している。この方法による欠点を克服するために、PIE12-GK(図3a)との抱合などの、単一容器反応においてD-ペプチド単量体に抱合するための3つのNHSエステルアームを含むホモ三量体骨格を設計した。種々の長さのPEGリンカーをPIE12-GKKペプチドに付加することにより、様々なPEG長さを有するPIE12-三量体の簡易な製造が可能になる。

【0168】

N-三量体のPIE12-三量体の推定sub-fM親和性は、直接的な比較のためのKD測定(例えば、表面プラスモン共鳴による)をやりがいいものにする。抗ウイルス作用強度は親和性の作用強度の代用として使用することができるが、PIE12-三量体プラト-は親和性の大きな変化さえもマスクすることができる。この問題を克服するために、PIE12変異体を弱めた親和性で設計し、阻害剤作用強度を測定することによる異なる三量体の幾何学的形状の比較的な評価を可能にした。PIE12の2つのN-末端残基は、N-三量体と重要な接触を行い、これは、これらの残基(D-HisおよびD-Pro)の欠失が、gp41ポケットに結合しているPIE12の全体的な配向、またはC-末端PEG連結部位の局所的な構造を破壊せずに、結合親和性を著しく減少させると考えた。HP-PIE12はPIE12(表5)よりも84倍弱い。ホモ三量体骨格において、PEG₅リンカーを介して結合されるHP-PIE12は、HXB2(標準的なラボ適応株)に対して380 nMのIC₅₀を有しており、従って、作用強度プラト-(HXB2は~500 pM)外である。AHP-PIE12-三量体を使用すると、親和性

10

20

30

40

50

を僅かに変えるリンカーの変化により、作用強度の変化を検出することができよう。

【0169】

D - ペプチド阻害データ

【表5】

阻害剤	IC ₅₀ (nM)	
	HXB2	JRFL
PIE12*	37 ± 2.3	580 ± 21.4
AHP-PIE12	3100 ± 783	nd
Chol-PEG ₂ -PIE12-単量体	69 ± 11	nd
Chol-PEG ₁₂ -PIE12-単量体	12 ± 3.6	nd
Chol-PEG ₂₄ -PIE12-単量体	0.64 ± 0.25	nd
C34	1.4 ± 0.3	13.4 ± 0.1
C34-PEG ₂ -Chol	0.044 ± 0.0004	0.05 ± 0.01
C34-PEG ₁₁ -Chol	0.021 ± 0.0014	0.024 ± 0.005
C34-PEG ₈₀ -Chol	0.022 ± 0.0004	0.1 ± 0.045
PEG ₄ -AHP-PIE12-三量体	300 ± 7.2	nd
PEG ₅ -AHP-PIE12-三量体	380 ± 13	nd
PEG ₄ -PIE12-三量体	0.72 ± 0.04	2.1 ± 0.28
Chol-PEG ₁₂ -PIE12-三量体	0.052 ± 0.02	0.06 ± 0.004
Chol-PEG ₁₆ -PIE12-三量体	0.02 ± 0.002	0.017 ± 0.0002
Chol-PEG ₂₄ -PIE12-三量体	0.013 ± 0.0013	0.019 ± 0.003
Chol-PEG ₃₆ -PIE12-三量体	0.011 ± 0.0015	0.015 ± 0.005
Chol-PEG ₅₇ -PIE12-三量体	0.007 ± 0.0013	0.013 ± 0.003
Chol-PEG ₁₃₂ -PIE12-三量体	0.012 ± 0.0015	0.025 ± 0.002
C8-PEG ₂₄ -PIE12-三量体	0.42 ± 0.01	nd
C16-PEG ₂₄ -PIE12-三量体	0.09 ± 0.014	0.11 ± 0.012
C18-PEG ₂₄ -PIE12-三量体	0.054 ± 0.018	0.087 ± 0.012

HXB2およびJRFL HIV-1株に対する抗ウイルス作用強度 (*20から)

【0170】

例4：モジュラーヘテロ四量体骨格およびPEGリンカーの最適化

【0171】

作用強度増強カーゴ基のPIE12-三量体への抱合を可能にするために、ヘテロ四量体骨格を設計した。このヘテロ四量体骨格は、PIE12-PEG₄-NH₂を付加するためのNHSエステル基を有する3つのより短いPEGアーム、炭素中心、および作用強度増強カーゴ(すなわち薬物動態増強および/または膜局在化カーゴ(図3b))を付加するために、マレイミド、直交反応基と官能性を持つ、様々な長さの第4のPEGアームで構成される。

【0172】

ヘテロ四量体骨格について研究する作用強度増強カーゴの1つは、コレステロールである。本明細書で開示するのは、PIE12D-ペプチドを有するコレステロールカーゴを使って、C-ペプチドのN-末端を膜に隣接させながらPIE12は細胞膜から60以内の距離にあるポケットを標的とする考察である(例えば図1参照)。この距離に架かるために、様々な長さの可動性PEGリンカーを使用した。PEG₁₂は、ピンと張られた状態では十分に長い、典型的に、PEGの平均的な長さはその完全に延びた長さの約半分の長さである。

【0173】

D-ペプチドへのコレステロール(chol)抱合の作用強度効果を調べるため、そしてコレステロールとD-ペプチド間のPEGリンカーの長さの最適化のために、単量体PIE12を使用した、これは作用強度プラトーではないので、最適なPEGリンカー長さの高感度のレポーターであるはずである。Chol-PEG_x-PIE12抱合は、ヘテ

10

20

30

40

50

ロニ官能性 PEG₂, PEG₁₂ および PEG₂₄ NHS エステル / マレイミド 架橋剤を使用して生成し、チオコレステロール (チオールをそのヒドロキシル基と置換したコレステロール) を PIE 12 の C - 末端リジン (その唯一の一級アミン) に抱合するために製造した。chol - PEG₂ - PIE 12 抱合は短すぎて、膜とポケットの間の距離を架橋できず、抱合されていない PIE 12 と比較すると、2 倍の作用強度 (HXB 2 株) の損失が発生したことがわかった (表 5)。反対に chol - PEG₁₂ - PIE 12 は、3 倍に増強された作用強度を示したが、一方で chol - PEG₂₄ - PIE 12 は、PIE 12 のみの場合と比較して、さらに大きな 5.8 倍の作用強度の増大を示した (表 5)。

【0174】

比較のために、種々の長さの C - ペプチド (C34) コレステロール抱合体を合成した (表 5)。結果は、短い PEG₂ リンカーを使った場合、40 倍に増強された作用強度となったが、驚くことに、より長いリンカー (PEG₁₁) はさらに 2 倍の作用強度の増強を提供し、さらに長いリンカー (PEG₈₀) は同じ作用強度 (HXB 2 株) を維持した。同様のパターンは JRF L 株でも見られたが、大変長い PEG リンカー長さでは著しい減衰が生じた (最適な PEG 長さの 4 倍劣る)。

10

【0175】

これらの作用強度の増大に基づき、本明細書に開示するヘテロ四量体骨格を使って、PIE 12 - 三量体をコレステロールに抱合した。3 つの NHS エステル (PIE 12) アームのために予め決定した最適な PEG₄ リンカーを使って、chol - PIE 12 - 三量体を種々の第 4 アーム (マレイミド) 長さで合成し、単量体で見られた PEG 長さ と作用強度との関係を確認した。この感度は期待されたものであった、というのも、膜局在化は、親和性の変化よりも会合速度に影響を与えるからである (耐性コンデンサによるマスク)。第 4 アームの長さは 12 ~ 132 PEG ユニットの間に変化し、60 ~ 480 (全長) をカバーした。

20

【0176】

コレステロール抱合は、HXB 2 および JRF L 侵入に対する PEG₄ - PIE 12 - 三量体の作用強度を劇的に増強させた (160 倍まで、表 5)。chol - PIE 12 - 三量体の種々の第 4 アーム長さを比較することにより、PEG₂₄ ~ PEG₅₇ の最適の範囲で阻害剤作用強度が穏やかに変化したことが示された。図 4 a に示すように、短い PEG₁₂ リンカーは PEG₂₄ および PEG₃₆ リンカーよりも弱い。最長 (PEG₁₃₂) のリンカー (図示せず) では、作用強度の僅かな減少がみられたただだった。その合成のしやすさと単分散 PEG₂₄ が可能なことにより、chol - PEG₂₄ - PIE 12 - 三量体をさらなる研究のために選択した。さらに、単分散 PEG₂₄ 骨格により、chol - PIE 12 - 三量体の純度、代謝、薬物動態および安定性の前臨床研究がより容易になるだろう。重要なことは、コレステロール抱合により、高い水溶解度 (mM) が保持されることである。

30

【0177】

作用強度の増強と D - ペプチド阻害剤の膜への局在化における別の戦略として、第 4 アームに脂肪酸カーゴを有するヘテロ四量体骨格の使用がある。本明細書に記載するものと同じヘテロ四量体骨格戦略を利用して、PIE 12 - 三量体を合成し、第 4 アームで、8, 16 または 18 炭素の何れかの脂肪酸鎖を有する脂肪酸カーゴ (C8 / C16 / C18 脂肪酸 - PEG₂₄ - PIE 12 - 三量体) に抱合した。C8 脂肪酸抱合は PIE 12 - 三量体作用強度にほぼ影響を与えなかったが、C16 脂肪酸および C18 脂肪酸はどちらも作用強度の増強を与えた。ただしコレステロールで見られたものよりは小さかった (図 4 b および表 5)。C18 脂肪酸 - PEG₂₄ - PIE 12 - 三量体は、C16 脂肪酸 - PEG₂₄ - PIE 12 - 三量体より僅かに強力だった (図 4 b)。

40

【0178】

これらの結果は、モジュラー多量体骨格に基づく設計のペプチド薬物最適化への適用がうまくいったことを示すものである (ペプチド幾何学的形状および抱合膜局在化カーゴを介した作用部位への局在化のどちらにおいても)。この手法により、種々のカーゴおよび

50

ケミストリー（例えば、「クリック」ケミストリー）への適応のための骨格の変更およびリンカー長さの迅速な最適化が可能になる。エボラなど、エンドソーム内で膜融合するウイルスにこの戦略を用いてエンドソーム標的部分を接着して、阻害剤をウイルス侵入部位に局在化させ、阻害作用強度を増強することができよう。さらに、多量体骨格は種々のカーゴへのD-ペプチド抱合を可能にし、作用強度、薬物動態特性（例えば大きな分岐PEG、アルブミンまたはアルブミン結合ペプチド）を調節して膜の局在化を可能にする。

実施例5：膜局在化の耐性コンデンサへの影響

【0179】

薬剤耐性は、HIV阻害剤の効果にとって絶え間ない脅威である。PIE12-三量体およびその変異体は、一部は魅力的な薬物候補である、というも、耐性コンデンサが強く、そのため耐性への高度な遺伝的バリアを提供するからである(Welch, 2010)。耐性コンデンサは、PIE12-三量体のgp41との結合の拡散制限会合速度に依存する。本明細書に記載するコレステロールとC16/18アルカン鎖との抱合戦略は、この速度の障壁を、ウイルス侵入部位への阻害剤の局在化によって突破する(すなわち、有効な阻害剤濃度を増やし、拡散速度の制限を克服する)。理論上、この作用強度の増強は耐性コンデンサを弱めるという犠牲を伴う。この可能性を試験するために、以前同定した耐性突然変異に対して、chol-およびC16/C18アルカン鎖に抱合したPIE12-三量体の作用強度を測定した(Welch, 2010)。

10

【0180】

PIE7-二量体(D-ペプチド阻害剤の前の世代)への耐性に対する以前の選択においては、E560K/V570Iを製造し、これはPIE12-三量体の作用強度に最小限の影響を与えたが、PIE7-二量体の作用強度を劇的に減少させた。PIE12-三量体への耐性の選択にはウイルス継代に一年以上を要したが、最終的にはQ577R突然変異となり、これによってPIE12-三量体の作用強度が1000倍以上減少した(Welch, 2010)。cholおよびC16/18アルカン鎖-PIE12-三量体作用強度に関するこれらの耐性の突然変異の効果を表6に示す。両方の耐性突然変異の相対的有效性は、PIE12-三量体およびコレステロール/アルカン抱合PIE12-三量体と類似している。しかしながら、抱合PDE12-三量体の著しく増強された作用強度により、これらの阻害剤は、深刻なQ577R耐性突然変異に対してもnM作用強度を維持する。さほど深刻でないE560K/V570I耐性突然変異の影響は、全ての抱合PIE12-三量体および通常のPIE12-三量体によって吸収される。これらのデータは、C16/C18アルカン鎖およびコレステロール抱合による作用強度の増強により、有効な耐性コンデンサを維持するための十分に過剰な結合エネルギーが保持されることを示している。

20

30

【0181】

耐性株に対する抗ウイルス作用強度

【表6】

阻害剤	IC ₅₀ (nM)		
	WT HXB2	E560K/V570I	Q577R
PEG ₄ -PIE12-三量体	0.72	0.89	>3 μM
Chol-PEG ₂₄ -PIE12-三量体	0.013	0.01	10.1
C8-PEG ₂₄ -PIE12-三量体	0.42	0.86	452
C16-PEG ₂₄ -PIE12-三量体	0.09	0.045	39
C18-PEG ₂₄ -PIE12-三量体	0.054	0.035	32.5

40

同定された耐性株に対する抗ウイルス作用強度 (HXB2バックグラウンド)。全ての試料に関して、平均値のIC₅₀。標準エラーは35%未満

【0182】

50

例6：D-ペプチド阻害剤の薬物動態特性

【0183】

作用強度増強カーゴを有していないPIE12-三量体は所望の抗ウイルス特性を有しているが、それは比較的小さい(～8kD)ため、腎臓ろ過による短い血清半減期をもたらす。これらの作用強度増強効果に加え、コレステロールおよびアルキル抱合のどちらも、腎クリアランスを遅くする細胞膜およびアルブミンとの相互作用を介して、これらのD-ペプチド阻害剤の薬物動態(PK)特性または薬物動態の増強を導くと仮定される。アルブミンはコレステロールおよび脂肪酸の両方の担体として機能し、腎臓ろ過の速度を低下させる。膜表面への付着も皮下腔内からのD-ペプチド阻害剤の吸収を遅くし、徐放貯蔵効果によって、持続的な投薬が可能になる。このタイプの投薬は、非分解性のD-ペプチドには特に魅力的であろう。

10

【0184】

コレステロール抱合D-ペプチドのPK特性を評価するために、chol-PIE12-三量体およびPIE12-三量体をラットに皮下投与(1mg/kg)した。皮下投与後、PEG₂₄リンカーによって抱合されたコレステロールを有するchol-PIE12-三量体は、PIE12-三量体よりも優れたプラズマ半減期を示した。より具体的には、chol-PIE12-三量体の半減期は3.7時間で、PIE12-三量体の2.7時間よりも長かった。さらに、chol-PIE12-三量体は、PIE12-三量体のクリアランス572mL/hr/kgよりも少ないクリアランス24mL/時間/kgを示した。図5に示すように、chol-PIE12-三量体は、ラットへの皮下投与後、PIE12-三量体と比べて改善された結合時間プロファイルを示した。

20

【0185】

(参照文献)

1. Lu, M., Blacklow, S.C. & Kim, P.S. A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat Struct Biol* 2, 1075-82 (1995).
2. Chan, D.C., Fass, D., Berger, J.M. & Kim, P.S. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89, 263-73 (1997).
3. Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S.C., Skehel, J.J. & Wiley, D.C. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 387, 426-30 (1997).
4. Tan, K., Liu, J., Wang, J., Shen, S. & Lu, M. Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 12303-8 (1997).
5. Wild, C., Oas, T., McDanal, C., Bolognesi, D. & Matthews, T. A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 10537-41 (1992).
6. Jiang, S., Lin, K., Strick, N. & Neurath, A.R. HIV-1 inhibition by a peptide. *Nature* 365, 113 (1993).
7. Eckert, D.M. & Kim, P.S. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem* 70, 777-810 (2001).
8. Chan, D.C. & Kim, P.S. HIV entry and its inhibition. *Cell* 93, 681-4 (1998).
9. Furuta, R.A., Wild, C.T., Weng, Y. & Weiss, C.D. Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41. *Nat Struct Biol* 5, 276-9 (1998).
10. Root, M.J. & Steger, H.K. HIV-1 gp41 as a target for viral entry inhibition. *Curr Pharm Des* 10, 1805-25 (2004).
11. Eckert, D.M., Malashkevich, V.N., Hong, L.H., Carr, P.A. & Kim, P.S. Inhibiting HIV-1 entry: discovery of D-peptide inhibitors that target the gp41 coiled-coil pocket. *Cell* 99, 103-15 (1999).

30

40

50

12. Root , M.J. , Kay , M.S. & Kim , P.S. Protein design of an HIV-1 entry inhibitor. *Science* 291 , 884-8 (2001).
13. Chan , D.C. , Chutkowski , C.T. & Kim , P.S. Evidence that a prominent cavity in the coiled coil of HIV type 1 gp41 is an attractive drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 , 15613-7 (1998).
14. Eckert , D.M. & Kim , P.S. Design of potent inhibitors of HIV-1 entry from the gp41 N-peptide region. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 , 1187-92 (2001).
15. Louis , J.M. , Nesheiwat , I. , Chang , L. , Clore , G.M. & Bewley , C.A. Covalent trimers of the internal N-terminal trimeric coiled-coil of gp41 and antibodies directed against them are potent inhibitors of HIV envelope-mediated cell fusion. *J Biol Chem* 278 , 20278-85 (2003). 10
16. Wild , C.T. , Shugars , D.C. , Greenwell , T.K. , McDanal , C.B. & Matthews , T.J. Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 , 9770-4 (1994).
17. Rimsky , L.T. , Shugars , D.C. & Matthews , T.J. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41 -derived inhibitory peptides. *J Virol* 72 , 986-93 (1998).
18. Wei , X. et al. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 46 , 1896-905 (2002). 20
19. Milton , R.C. , Milton , S.C. & Kent , S.B. Total chemical synthesis of a D-enzyme : the enantiomers of HIV-1 protease show reciprocal chiral substrate specificity. *Science* 256 , 1445-8 (1992).
20. Sadowski , M. et al. A synthetic peptide blocking the apolipoprotein E/beta-amyloid binding mitigates beta-amyloid toxicity and fibril formation in vitro and reduces beta A Amyloid plaques in transgenic mice. *Am J Pathol* 165 , 937-48 (2004).
21. Pappenheimer , J.R. , Dahl , C.E. , Karnovsky , M.L. & Maggio , J.E. Intestinal absorption and excretion of octapeptides composed of D amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 , 1942-5 (1994). 30
22. Pappenheimer , J.R. , Karnovsky , M.L. & Maggio , J.E. Absorption and excretion of undegradable peptides : role of lipid solubility and net charge. *J Pharmacol Exp Ther* 280 , 292-300 (1997).
23. Schumacher , T.N. et al. Identification of D-peptide ligands through mirror-image phage display. *Science* 271 , 1854-7 (1996).
24. Judice , J.K. et al. Inhibition of HTV type 1 infectivity by constrained alpha-helical peptides : implications for the viral fusion mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 , 13426-30 (1997).
25. Jin , B.S. , Ryu , J R. , Ahn , K. & Yu , Y.G. Design of a peptide inhibitor that blocks the cell fusion mediated by glycoprotein 41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16 , 1797-804 (2000). 40
26. Sia , S.K. , Carr , P.A. , Cochran , A.G. , Malashkevich , V.N. & Kim , P.S. Short constrained peptides that inhibit HIV-1 entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 , 14664-9 (2002).
27. Ernst , J.T. et al. Design of a protein surface antagonist based on alpha-helix mimicry : inhibition of gp41 assembly and viral fusion. *Angew Chem Int Ed Engl* 41 , 278-81 (2002).
28. Stephens , O.M. et al. Inhibiting HIV fusion with a beta-peptide foldamer. *J Am Chem Soc* 127 , 13126-7 (2005). 50

29. Debnath, A.K., Radigan, L. & Jiang, S. Structure-based identification of small molecule antiviral compounds targeted to the gp41 core structure of the human immunodeficiency virus type 1. *J Med Chem* 42, 3203-9 (1999).
30. Ferrer, M. et al. Selection of gp41-mediated HIV-1 cell entry inhibitors from biased combinatorial libraries of non-natural binding elements. *Nat Struct Biol* 6, 953-60 (1999).
31. Zhao, Q., Ernst, J.T., Hamilton, A.D., Debnath, A.K. & Jiang, S. XTT formazan widely used to detect cell viability inhibits HIV type 1 infection in vitro by targeting gp41. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18, 989-97 (2002).
32. Jiang, S. et al. N-substituted pyrrole derivatives as novel human immunodeficiency virus type 1 entry inhibitors that interfere with the gp41 six-helix bundle formation and block virus fusion. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 4349-59 (2004).
33. Frey, G. et al. Small molecules that bind the inner core of gp41 and inhibit HIV envelope-mediated fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 13938-43 (2006).
34. Barbas, C.F. *Phage Display: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory Press, New York, 2001).
35. Cole, J.L. & Garsky, V.M. Thermodynamics of peptide inhibitor binding to HIV-1 gp41. *Biochemistry* 40, 5633-41 (2001).
36. Harris, J.M. & Chess, R.B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov* 1, 214-21 (2003).
37. Steger, H.K. & Root, M.J. Kinetic dependence of HIV-1 entry inhibition. *J Biol Chem* 281, 25813-21 (2006).
38. Miller, M.D. et al. A human monoclonal antibody neutralizes diverse HIV-1 isolates by binding a critical gp41 epitope. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 14759-64 (2005).
39. Bianchi, E. et al. Covalent stabilization of coiled coils of the HIV gp41 N region yields extremely potent and broad inhibitors of viral infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 12903-8 (2005).
40. Piatt, E.J., Durnin, J.P. & Kabat, D. Kinetic factors control efficiencies of cell entry, efficacies of entry inhibitors, and mechanisms of adaptation of human immunodeficiency virus. *J Virol* 79, 4347-56 (2005).
41. Choudhry, V. et al. Increased efficacy of HIV-1 neutralization by antibodies at low CCR5 surface concentration. *Biochem Biophys Res Commun* 348, 1107-15 (2006).
42. Chong, P., Sia, C., Tripet, B., James, O. & Klein, M. Comparative immunological properties of enantiomeric peptides. *Letters in Peptide Science* 3, 99-106 (1996).
43. Hamburger, A.E., Kim, S., Welch, B.D. & Kay, M.S. Steric accessibility of the HIV-1 gp41 N-trimer region. *J Biol Chem* 280, 12567-72 (2005).
44. Otwinowski, Z. & Minor, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods in Enzymology* 276, 307-326 (1997).
45. McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Storoni, L.C. & Read, R.J. Likelihood-enhanced fast translation functions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 61, 458-64 (2005).
46. CCP4 (Collaborative Computational Project), N. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50, 760-3 (1994).
47. Brunger, A.T. et al. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54

, 905-21 (1998).

48. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 60, 2126-32 (2004).

49. Noren, K.A. & Noren, C.J. Construction of high-complexity combinatorial phage display peptide libraries. Methods 23, 169-78 (2001).

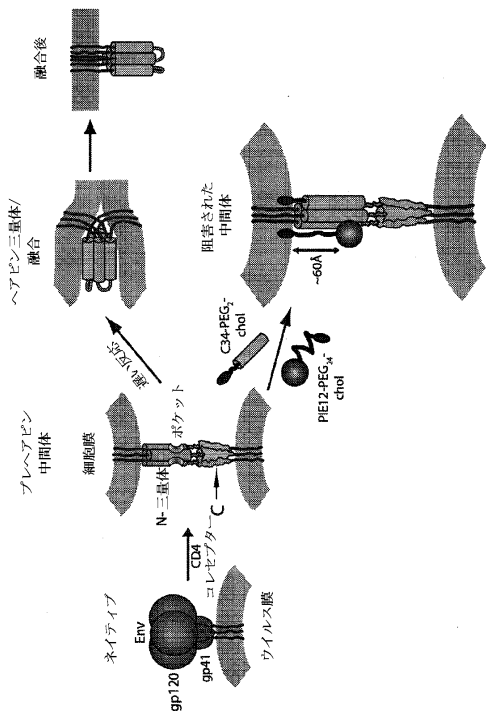
50. Sidhu, S.S., Lowman, H.B., Cunningham, B.C. & Wells, J.A. Phage display for selection of novel binding peptides. Methods Enzymol 328, 333-63 (2000).

51. Welch, B. D., Francis, J. N., Redman, J. S., Paul, S., Weinstock, M. T⁺ Reeves, J. D., Lie, Y. S., Whitby, F. G., Eckert, D. M., Hill, C. P., Root, M. J., and Kay, M. S. (2010) Design of a potent D-peptide HIV-1 entry inhibitor with a strong barrier to resistance. J Virol 84, 11235-44.

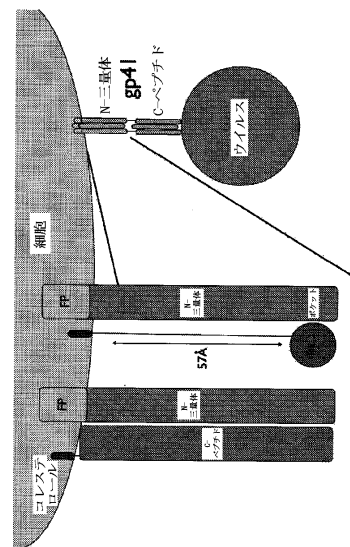
52. Welch, B. D., VanDemark, A. P., Heroux, A., Hill, C. P., and Kay, M. S. (2007) Potent D-peptide inhibitors of HIV-1 entry. Proc Natl Acad Sci USA 104, 16828-33.

10

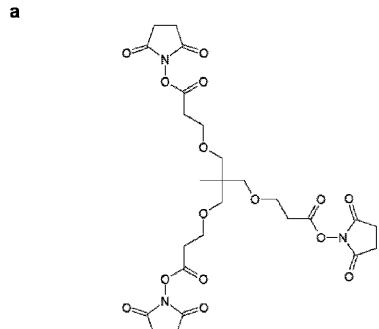
【図1】



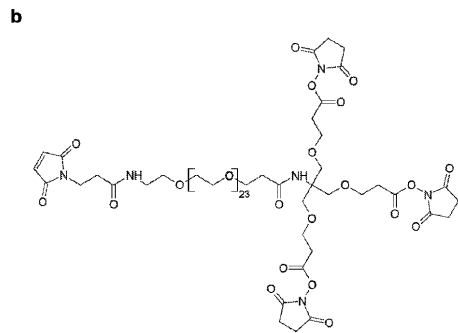
【図2】



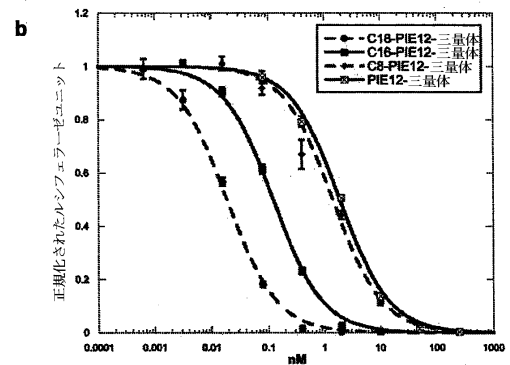
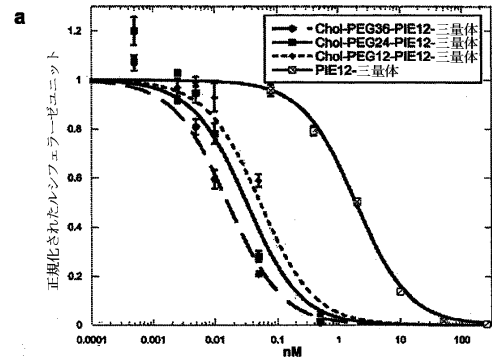
【 図 3 a 】



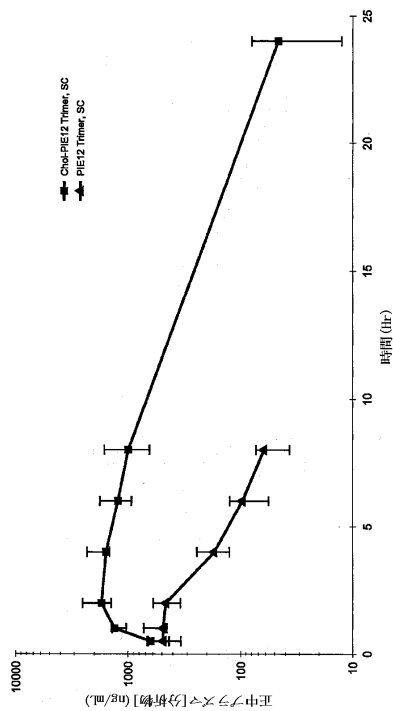
【 図 3 b 】



【 図 4 】



【 図 5 】



(注記：エラーバーは絶対最小および最大濃度に等しく、各時点でn = 3、ただし24時間時点でn = 2)

フロントページの続き

- (72)発明者 ジェー ニコラス フランシス
 アメリカ合衆国 ユタ州 84112 5650 ソルトレークシティー ノース メディカル
 ドライブ イースト 15 ルーム 4100 ユニバーシティー オブ ユタ スクール オブ
 メディシン デPARTMENT オブ バイオケミストリー
- (72)発明者 ジョセフ エス レッドマン
 アメリカ合衆国 ユタ州 84112 5650 ソルトレークシティー ノース メディカル
 ドライブ イースト 15 ルーム 4100 ユニバーシティー オブ ユタ スクール オブ
 メディシン デPARTMENT オブ バイオケミストリー
- (72)発明者 マイケル エス ケイ
 アメリカ合衆国 ユタ州 84112 5650 ソルトレークシティー ノース メディカル
 ドライブ イースト 15 ルーム 4100 ユニバーシティー オブ ユタ スクール オブ
 メディシン デPARTMENT オブ バイオケミストリー

審査官 天野 貴子

- (56)参考文献 国際公開第2009/092612(WO, A1)
 米国特許第07129227(US, B1)
 米国特許出願公開第2010/0184663(US, A1)
 Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007年, vol.104, no.43, p.16828-16833
 Journal of Virology, 2010年, vol.84, no.21, p.11235-11244
 Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010年, vol.54, no.1, p.134-142
 Bioconjugate Chemistry, 2003年, vol.14, no.1, p.86-92
 Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009年, vol.106, no.14, p.5801-5806

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 47/00 - 47/69
 A61K 9/00 - 9/72
 A61P 31/12
 A61P 31/18
 A61K 38/10
 C07K 7/08
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
 CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)