

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-525796

(P2006-525796A)

(43) 公表日 平成18年11月16日(2006.11.16)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4B063
C07K 14/11 (2006.01)	C07K 14/11	4B065
C07K 16/10 (2006.01)	C07K 16/10	4C084
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4C085
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 90 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-502644 (P2006-502644)
 (86) (22) 出願日 平成16年2月24日 (2004.2.24)
 (85) 翻訳文提出日 平成17年10月26日 (2005.10.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/IL2004/000182
 (87) 国際公開番号 W02004/076621
 (87) 国際公開日 平成16年9月10日 (2004.9.10)
 (31) 優先権主張番号 60/449,863
 (32) 優先日 平成15年2月27日 (2003.2.27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 502379147
 イェダ リサーチ アンド デベロップメント
 カンパニー リミテッド
 イスラエル, 76100 レホボト,
 ピー. オー. ボックス 95, アット
 ザ ウェイズマン インスティテュート
 オブ サイエンス
 (74) 代理人 100103816
 弁理士 風早 信昭
 (74) 代理人 100120927
 弁理士 浅野 典子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インフルエンザウイルス感染を処置および検出するために有用な核酸分子、ポリペプチド、抗体、およびそれらを含有する組成物

(57) 【要約】

細胞のインフルエンザウイルス感染に関係するポリペプチド、及び本発明のポリペプチドと特異的に結合することができるポリヌクレオチド配列を含む核酸分子。インフルエンザウイルス感染を診断、処置及び防止するためにかかる核酸分子、ポリヌクレオチド及びそれらに対して指向された抗体を使用する方法も提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞のインフルエンザウイルス感染に関係するポリペプチドと特異的に結合することができるポリヌクレオチド配列を含む核酸分子。

【請求項 2】

前記ポリヌクレオチド配列は、配列番号 1 1 および配列番号 1 2 からなる群から選択される請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 3】

前記ポリペプチドはインフルエンザウイルスのポリペプチドである請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 4】

前記ポリペプチドは、血球凝集素、ノイラミニダーゼ、RNA 指向 RNA ポリメラーゼコアタンパク質、M 1 マトリックスタンパク質、M 2 マトリックスタンパク質および NS タンパク質からなる群から選択される請求項 3 に記載の核酸分子。

【請求項 5】

前記ポリヌクレオチド配列は、配列番号 1 のアミノ酸位置 9 1 ~ 2 6 1 によって規定される血球凝集素の領域と結合することができる請求項 3 に記載の核酸分子。

【請求項 6】

前記ポリペプチドは宿主細胞のポリペプチドである請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 7】

前記宿主細胞のポリペプチドはシアル酸受容体である請求項 6 に記載の核酸分子。

【請求項 8】

前記ポリヌクレオチド配列は一本鎖である請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 9】

前記ポリヌクレオチド配列は DNA である請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 10】

前記ポリヌクレオチド配列は RNA である請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 11】

検出可能な標識をさらに含む請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 12】

前記ポリヌクレオチド配列は 2' - フルオロ (2' - F) 修飾ヌクレオチドを含む請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 13】

前記ポリヌクレオチド配列は 1 0 ヌクレオチド ~ 3 5 ヌクレオチドの間の長さを有するポリヌクレオチド配列から選択される請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 14】

インフルエンザウイルス感染を阻害することができる分子を作製する方法であって、以下のステップを含む方法：

(a) 複数の核酸分子を、細胞のインフルエンザウイルス感染に関係するポリペプチドと接触させること；

(b) 前記ポリペプチドと特異的に結合することができる少なくとも 1 つの核酸分子を前記複数の核酸分子から同定すること；および

(c) 前記ポリペプチドと結合することができる少なくとも 1 つの核酸分子を単離し、それにより、インフルエンザウイルス感染を阻害することができる分子を作製すること。

【請求項 15】

前記ポリペプチドは、血球凝集素、ノイラミニダーゼ、RNA 指向 RNA ポリメラーゼコアタンパク質、M 1 マトリックスタンパク質、M 2 マトリックスタンパク質および NS タンパク質からなる群から選択される請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 16】

前記複数の核酸分子は一本鎖である請求項 1 4 に記載の方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 17】
前記複数の核酸分子は DNA 分子である請求項 14 に記載の方法。
- 【請求項 18】
前記複数の核酸分子は RNA 分子である請求項 14 に記載の方法。
- 【請求項 19】
前記複数の核酸分子の各々は検出可能な標識をさらに含む請求項 14 に記載の方法。
- 【請求項 20】
前記複数の核酸分子の各々は 2' - フルオロ (2' - F) 修飾ヌクレオチドを含む請求項 14 に記載の方法。
- 【請求項 21】 10
前記複数の核酸分子は 10ヌクレオチド ~ 35ヌクレオチドの間の長さを有するポリヌクレオチド配列から選択される請求項 14 に記載の方法。
- 【請求項 22】
ステップ (a) に先だって、コンビナトリアル合成法を使用して前記複数の核酸分子を作製することをさらに含む請求項 14 に記載の方法。
- 【請求項 23】
ステップ (a) の前、またはステップ (c) の後で、前記複数の核酸分子を修飾することをさらに含む請求項 14 に記載の方法。
- 【請求項 24】 20
ステップ (a) ~ ステップ (c) を繰り返すことをさらに含む請求項 14 に記載の方法。
- 【請求項 25】
細胞のインフルエンザウイルス感染に関係するポリペプチドと特異的に結合することができるポリヌクレオチド配列を含む核酸分子と、生理学的に許容され得るキャリアとを含む医薬組成物。
- 【請求項 26】
前記ポリヌクレオチド配列は、配列番号 11 および配列番号 12 からなる群から選択される請求項 25 に記載の医薬組成物。
- 【請求項 27】 30
前記ポリペプチドはインフルエンザウイルスのポリペプチドである請求項 25 に記載の医薬組成物。
- 【請求項 28】
前記ポリペプチドは、血球凝集素、ノイラミニダーゼ、RNA 指向 RNA ポリメラーゼコアタンパク質、M1マトリックスタンパク質、M2マトリックスタンパク質およびNSタンパク質からなる群から選択される請求項 27 に記載の医薬組成物。
- 【請求項 29】
前記ポリヌクレオチド配列は、配列番号 1 のアミノ酸位置 91 ~ 261 によって規定される血球凝集素の領域と結合することができる請求項 27 に記載の医薬組成物。
- 【請求項 30】 40
前記ポリペプチドは宿主細胞のポリペプチドである請求項 25 に記載の医薬組成物。
- 【請求項 31】
前記宿主細胞のポリペプチドはシアル酸受容体である請求項 30 に記載の医薬組成物。
- 【請求項 32】
前記ポリヌクレオチド配列は一本鎖である請求項 25 に記載の医薬組成物。
- 【請求項 33】
前記ポリヌクレオチド配列は DNA である請求項 25 に記載の医薬組成物。
- 【請求項 34】
前記ポリヌクレオチド配列は RNA である請求項 25 に記載の医薬組成物。
- 【請求項 35】 50
検出可能な標識をさらに含む請求項 25 に記載の医薬組成物。

- 【請求項 36】
前記ポリヌクレオチド配列は 2' -フルオロ (2' - F) 修飾ヌクレオチドを含む請求項 25 に記載の医薬組成物。
- 【請求項 37】
前記ポリヌクレオチド配列は 10ヌクレオチド ~ 35ヌクレオチドの間の長さを有するポリヌクレオチド配列から選択される請求項 25 に記載の医薬組成物。
- 【請求項 38】
さらに薬剤を含む請求項 25 に記載の医薬組成物。
- 【請求項 39】
包装材料と、前記包装材料に含有される、インフルエンザ感染を処置または防止するために特定された医薬組成物とを含む製造物であって、前記医薬組成物は、細胞のインフルエンザウイルス感染に関係するポリペプチドと特異的に結合することができるポリヌクレオチド配列を含む核酸分子を有効成分として含む製造物。 10
- 【請求項 40】
前記ポリヌクレオチド配列は、配列番号 11 および配列番号 12 からなる群から選択される請求項 39 に記載の製造物。
- 【請求項 41】
前記ポリペプチドはインフルエンザウイルスのポリペプチドである請求項 39 に記載の製造物。
- 【請求項 42】
前記ポリペプチドは、血球凝集素、ノイラミニダーゼ、RNA 指向 RNA ポリメラーゼコアタンパク質、M1 マトリックスタンパク質、M2 マトリックスタンパク質および NS タンパク質からなる群から選択される請求項 41 に記載の製造物。 20
- 【請求項 43】
前記ポリヌクレオチド配列は、配列番号 1 のアミノ酸位置 91 ~ 261 によって規定される血球凝集素の領域と結合することができる請求項 41 に記載の製造物。
- 【請求項 44】
前記ポリペプチドは宿主細胞のポリペプチドである請求項 39 に記載の製造物。
- 【請求項 45】
前記宿主細胞のポリペプチドはシアル酸受容体である請求項 44 に記載の製造物。 30
- 【請求項 46】
前記ポリヌクレオチド配列は一本鎖である請求項 39 に記載の製造物。
- 【請求項 47】
前記ポリヌクレオチド配列は DNA である請求項 39 に記載の製造物。
- 【請求項 48】
前記ポリヌクレオチド配列は RNA である請求項 39 に記載の製造物。
- 【請求項 49】
検出可能な標識をさらに含む請求項 39 に記載の製造物。
- 【請求項 50】
前記ポリヌクレオチド配列は 2' -フルオロ (2' - F) 修飾ヌクレオチドを含む請求項 39 に記載の製造物。 40
- 【請求項 51】
前記ポリヌクレオチド配列は 10ヌクレオチド ~ 35ヌクレオチドの間の長さを有するポリヌクレオチド配列から選択される請求項 39 に記載の製造物。
- 【請求項 52】
前記医薬組成物はさらに薬剤を含む請求項 39 に記載の製造物。
- 【請求項 53】
前記薬剤は、免疫調節剤、抗生物質、抗ウイルス剤、アンチセンス分子およびリボザイムからなる群から選択される請求項 52 に記載の製造物。
- 【請求項 54】

インフルエンザウイルス感染を処置または防止する方法であって、その必要性のある対象に、細胞のインフルエンザウイルス感染に関係するポリペプチドと特異的に結合することができるポリヌクレオチド配列を含む核酸分子の治療効果的な量を与え、それにより、インフルエンザウイルス感染を処置または防止することを含む方法。

【請求項 5 5】

前記ポリヌクレオチド配列は、配列番号 1 1 および配列番号 1 2 からなる群から選択される請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記ポリペプチドはインフルエンザウイルスのポリペプチドである請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記ポリペプチドは、血球凝集素、ノイラミニダーゼ、RNA 指向 RNA ポリメラーゼコアタンパク質、M 1 マトリックスタンパク質、M 2 マトリックスタンパク質および NS タンパク質からなる群から選択される請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記ポリヌクレオチド配列は、配列番号 1 のアミノ酸位置 9 1 ~ 2 6 1 によって規定される血球凝集素の領域と結合することができる請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記ポリペプチドは宿主細胞のポリペプチドである請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記宿主細胞のポリペプチドはシアル酸受容体である請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記ポリヌクレオチド配列は一本鎖である請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記ポリヌクレオチド配列は DNA である請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記ポリヌクレオチド配列は RNA である請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 6 4】

検出可能な標識をさらに含む請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記ポリヌクレオチド配列は 2' - フルオロ (2' - F) 修飾ヌクレオチドを含む請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記ポリヌクレオチド配列は 1 0 ヌクレオチド ~ 3 5 ヌクレオチドの間の長さを有するポリヌクレオチド配列から選択される請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記核酸分子を与えることに先立って、前記核酸分子を与えることと同時に、又は前記核酸分子を与えることの後に抗ウイルス剤を与えることをさらに含む請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記与えることは、(i) 前記核酸分子の投与 ; および / または (i i) 前記核酸分子を発現するポリヌクレオチドを投与することによって行われる請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 6 9】

生物学的サンプルにおけるインフルエンザウイルスを同定する方法であって、以下のステップを含む方法 :

(a) 生物学的サンプルを、インフルエンザウイルスのポリペプチドと特異的に結合することができるポリヌクレオチド配列を含む核酸分子と接触させること ; および

(b) 生物学的サンプル中の前記インフルエンザウイルスポリペプチドに結合した前記核酸分子を検出し、それにより、インフルエンザ感染を同定すること。

【請求項 7 0】

10

20

30

40

50

前記ポリヌクレオチド配列は、配列番号 1 1 および配列番号 1 2 からなる群から選択される請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記インフルエンザウイルスのポリペプチドは、血球凝集素、ノイラミニダーゼ、RNA 指向 RNA ポリメラーゼコアタンパク質、M 1 マトリックスタンパク質、M 2 マトリックスタンパク質および NS タンパク質からなる群から選択される請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記ポリヌクレオチド配列は、配列番号 1 のアミノ酸位置 9 1 ~ 2 6 1 によって規定される血球凝集素の領域と結合することができる請求項 6 9 に記載の方法。

10

【請求項 7 3】

前記ポリヌクレオチド配列は一本鎖である請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記ポリヌクレオチド配列は DNA である請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記ポリヌクレオチド配列は RNA である請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記核酸分子は検出可能な標識をさらに含む請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記ポリヌクレオチド配列は 2' - フルオロ (2' - F) 修飾ヌクレオチドを含む請求項 6 9 に記載の方法。

20

【請求項 7 8】

前記ポリヌクレオチド配列は 1 0 ヌクレオチド ~ 3 5 ヌクレオチドの間の長さを有するポリヌクレオチド配列から選択される請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 9】

抗ウイルス剤をインフルエンザウイルス感染組織に標的化する方法であって、その必要性のある対象に、インフルエンザウイルスのポリペプチドと特異的に結合することができるポリヌクレオチド配列を含む核酸分子にコンジュゲート化された抗ウイルス剤の治療効果的な量を投与し、それにより、抗ウイルス剤をインフルエンザ感染組織に標的化することを含む方法。

30

【請求項 8 0】

前記ポリヌクレオチド配列は、配列番号 1 1 および配列番号 1 2 からなる群から選択される請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記インフルエンザウイルスのポリペプチドは、血球凝集素、ノイラミニダーゼ、RNA 指向 RNA ポリメラーゼコアタンパク質、M 1 マトリックスタンパク質、M 2 マトリックスタンパク質および NS タンパク質からなる群から選択される請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記ポリヌクレオチド配列は、配列番号 1 のアミノ酸位置 9 1 ~ 2 6 1 によって規定される血球凝集素の領域と結合することができる請求項 7 9 に記載の方法。

40

【請求項 8 3】

前記ポリヌクレオチド配列は一本鎖である請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記ポリヌクレオチド配列は DNA である請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記ポリヌクレオチド配列は RNA である請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記核酸分子は検出可能な標識をさらに含む請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 7】

50

前記ポリヌクレオチド配列は 2' -フルオロ (2' - F) 修飾ヌクレオチドを含む請求項 79 に記載の方法。

【請求項 88】

前記ポリヌクレオチド配列は 10ヌクレオチド ~ 35ヌクレオチドの間の長さを有するポリヌクレオチド配列から選択される請求項 79 に記載の方法。

【請求項 89】

細胞のインフルエンザウイルス感染に関係するポリペプチドと特異的に結合することができるポリヌクレオチド配列を含む核酸分子にコンジュゲート化された抗ウイルス剤を含む組成物。

【請求項 90】

前記ポリヌクレオチド配列は、配列番号 11 および配列番号 12 からなる群から選択される請求項 89 に記載の組成物。

【請求項 91】

前記ポリペプチドはインフルエンザウイルスのポリペプチドである請求項 89 に記載の組成物。

【請求項 92】

前記ポリペプチドは、血球凝集素、ノイラミニダーゼ、RNA 指向 RNA ポリメラーゼコアタンパク質、M1 マトリックスタンパク質、M2 マトリックスタンパク質および NS タンパク質からなる群から選択される請求項 91 に記載の組成物。

【請求項 93】

前記ポリヌクレオチド配列は、配列番号 1 のアミノ酸位置 91 ~ 261 によって規定される血球凝集素の領域と結合することができる請求項 91 に記載の組成物。

【請求項 94】

前記ポリペプチドは宿主細胞のポリペプチドである請求項 89 に記載の組成物。

【請求項 95】

前記宿主細胞のポリペプチドはシアル酸受容体である請求項 94 に記載の組成物。

【請求項 96】

前記ポリヌクレオチド配列は一本鎖である請求項 89 に記載の組成物。

【請求項 97】

前記ポリヌクレオチド配列は DNA である請求項 89 に記載の組成物。

【請求項 98】

前記ポリヌクレオチド配列は RNA である請求項 89 に記載の組成物。

【請求項 99】

検出可能な標識をさらに含む請求項 89 に記載の組成物。

【請求項 100】

前記ポリヌクレオチド配列は 2' -フルオロ (2' - F) 修飾ヌクレオチドを含む請求項 89 に記載の組成物。

【請求項 101】

前記ポリヌクレオチド配列は 10ヌクレオチド ~ 35ヌクレオチドの間の長さを有するポリヌクレオチド配列から選択される請求項 89 に記載の組成物。

【請求項 102】

インフルエンザウイルスに対するワクチン接種のために有用なポリペプチドであって、Smith および Waterman のアルゴリズムを利用する Wisconsin 配列解析パッケージの BestFit ソフトウェアを使用して決定されたとき (この場合、ギャップ生成ペナルティーが 8 に等しく、ギャップ伸長ペナルティーが 2 に等しい)、配列番号 13 に対して少なくとも 60% の相同性であるアミノ酸配列を含む (ただし、このポリペプチドはインフルエンザウイルスの HA2 ドメインを含まない) ポリペプチド。

【請求項 103】

前記ポリペプチドは配列番号 13 ~ 配列番号 15 に示される通りである請求項 102 に記載のポリペプチド。

10

20

30

40

50

【請求項104】

前記アミノ酸配列は配列番号13～配列番号15に示される通りである請求項102に記載のポリペプチド。

【請求項105】

前記アミノ酸配列は配列番号1のアミノ酸位置91～261によって規定される請求項102に記載のポリペプチド。

【請求項106】

前記アミノ酸配列は配列番号1のアミノ酸位置116～261によって規定される請求項102に記載のポリペプチド。

【請求項107】

前記アミノ酸配列は配列番号1のアミノ酸位置116～245によって規定される請求項102に記載のポリペプチド。

【請求項108】

SmithおよびWatermanのアルゴリズムを利用するWisconsin配列分析パッケージのBestFitソフトウェアを使用して決定されたとき(この場合、ギャップ生成ペナルティーが8に等しく、ギャップ伸長ペナルティーが2に等しい)、配列番号13に対して少なくとも60%の相同性であるアミノ酸配列を含むポリペプチド(ただし、このポリペプチドはインフルエンザウイルスのHA2ドメインを含まない)と、医薬的に許容され得るキャリアまたは希釈剤とを含む医薬組成物。

【請求項109】

前記ポリペプチドは配列番号13～配列番号15に示される通りである請求項108に記載の医薬組成物。

【請求項110】

前記アミノ酸配列は配列番号13～配列番号15に示される通りである請求項108に記載の医薬組成物。

【請求項111】

前記アミノ酸配列は配列番号1のアミノ酸位置91～261によって規定される請求項108に記載の医薬組成物。

【請求項112】

前記アミノ酸配列は配列番号1のアミノ酸位置116～261によって規定される請求項108に記載の医薬組成物。

【請求項113】

前記アミノ酸配列は配列番号1のアミノ酸位置116～245によって規定される請求項108に記載の医薬組成物。

【請求項114】

SmithおよびWatermanのアルゴリズムを利用するWisconsin配列分析パッケージのBestFitソフトウェアを使用して決定されたとき(この場合、ギャップ生成ペナルティーが8に等しく、ギャップ伸長ペナルティーが2に等しい)、配列番号13に対して少なくとも60%の相同性であるアミノ酸配列を含むポリペプチド(ただし、このポリペプチドはインフルエンザウイルスのHA2ドメインを含まない)を特異的に認識する抗原結合部位を含む抗体または抗体フラグメント。

【請求項115】

前記ポリペプチドは配列番号13～配列番号15に示される通りである請求項114に記載の抗体または抗体フラグメント。

【請求項116】

前記アミノ酸配列は配列番号13～配列番号15に示される通りである請求項114に記載の抗体または抗体フラグメント。

【請求項117】

前記アミノ酸配列は配列番号1のアミノ酸位置91～261によって規定される請求項114に記載の抗体または抗体フラグメント。

10

20

30

40

50

【請求項 118】

前記アミノ酸配列は配列番号1のアミノ酸位置116～261によって規定される請求項114に記載の抗体または抗体フラグメント。

【請求項 119】

前記アミノ酸配列は配列番号1のアミノ酸位置116～245によって規定される請求項114に記載の抗体または抗体フラグメント。

【請求項 120】

固体支持体に取り付けられている請求項114に記載の抗体または抗体フラグメント。

【請求項 121】

SmithおよびWatermanのアルゴリズムを利用するWisconsin配列分析パッケージのBestFitソフトウェアを使用して決定されたとき(この場合、ギャップ生成ペナルティーが8に等しく、ギャップ伸長ペナルティーが2に等しい)、配列番号13に対して少なくとも60%の相同性であるアミノ酸配列を含むポリペプチド(ただし、このポリペプチドはインフルエンザウイルスのHA2ドメインを含まない)をコードする単離されたポリヌクレオチド。 10

【請求項 122】

前記ポリペプチドは配列番号13～配列番号15に示される通りである請求項121に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 123】

前記アミノ酸配列は配列番号13～配列番号15に示される通りである請求項121に記載の単離されたポリヌクレオチド。 20

【請求項 124】

前記アミノ酸配列は配列番号1のアミノ酸位置91～261によって規定される請求項121に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 125】

前記アミノ酸配列は配列番号1のアミノ酸位置116～261によって規定される請求項121に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 126】

前記アミノ酸配列は配列番号1のアミノ酸位置116～245によって規定される請求項121に記載の単離されたポリヌクレオチド。 30

【請求項 127】

請求項121の単離されたポリヌクレオチドを含む核酸構築物。

【請求項 128】

請求項127の核酸構築物を含む宿主細胞。

【請求項 129】

SmithおよびWatermanのアルゴリズムを利用するWisconsin配列分析パッケージのBestFitソフトウェアを使用して決定されたとき(この場合、ギャップ生成ペナルティーが8に等しく、ギャップ伸長ペナルティーが2に等しい)、配列番号13に対して少なくとも60%の相同性であるアミノ酸配列を含むポリペプチド(ただし、このポリペプチドはインフルエンザウイルスのHA2ドメインを含まない)をコードするポリヌクレオチドと、医薬的に許容され得るキャリアまたは希釈剤とを含む医薬組成物。 40

【請求項 130】

前記ポリペプチドは配列番号13～配列番号15に示される通りである請求項129に記載の医薬組成物。

【請求項 131】

前記アミノ酸配列は配列番号13～配列番号15に示される通りである請求項129に記載の医薬組成物。

【請求項 132】

前記アミノ酸配列は配列番号1のアミノ酸位置91～261によって規定される請求項 50

129に記載の医薬組成物。

【請求項133】

前記アミノ酸配列は配列番号1のアミノ酸位置116～261によって規定される請求項129に記載の医薬組成物。

【請求項134】

前記アミノ酸配列は配列番号1のアミノ酸位置116～245によって規定される請求項129に記載の医薬組成物。

【請求項135】

インフルエンザウイルス感染を処置または防止する方法であって、SmithおよびWatermanのアルゴリズムを利用するWisconsin配列分析パッケージのBestFitソフトウェアを使用して決定されたとき(この場合、ギャップ生成ペナルティーが8に等しく、ギャップ伸長ペナルティーが2に等しい)、配列番号13に対して少なくとも60%の相同性であるアミノ酸配列を含むポリペプチド(ただし、このポリペプチドはインフルエンザウイルスのHA2ドメインを含まない)の治療効果的な量を、その必要性のある対象に与えることを含む方法。

10

【請求項136】

前記ポリペプチドは配列番号13～配列番号15に示される通りである請求項135に記載の方法。

【請求項137】

前記アミノ酸配列は配列番号13～配列番号15に示される通りである請求項135に記載の方法。

20

【請求項138】

前記アミノ酸配列は配列番号1のアミノ酸位置91～261によって規定される請求項135に記載の方法。

【請求項139】

前記アミノ酸配列は配列番号1のアミノ酸位置116～261によって規定される請求項135に記載の方法。

【請求項140】

前記アミノ酸配列は配列番号1のアミノ酸位置116～245によって規定される請求項135に記載の方法。

30

【請求項141】

前記与えることは、(i)前記ポリペプチドの投与;および/または(ii)前記ポリペプチドを発現するポリヌクレオチドを投与することによって行われる請求項135に記載の方法。

【請求項142】

インフルエンザウイルス感染を処置または防止する方法であって、SmithおよびWatermanのアルゴリズムを利用するWisconsin配列分析パッケージのBestFitソフトウェアを使用して決定されたとき(この場合、ギャップ生成ペナルティーが8に等しく、ギャップ伸長ペナルティーが2に等しい)、配列番号13に対して少なくとも60%の相同性であるアミノ酸配列を含むポリペプチド(ただし、このポリペプチドはインフルエンザウイルスのHA2ドメインを含まない)を特異的に認識する抗原結合部位を含む抗体または抗体フラグメントの治療効果的な量を、その必要性のある対象に与えることを含む方法。

40

【請求項143】

前記ポリペプチドは配列番号13～配列番号15に示される通りである請求項142に記載の方法。

【請求項144】

前記アミノ酸配列は配列番号13～配列番号15に示される通りである請求項142に記載の方法。

【請求項145】

50

前記アミノ酸配列は配列番号1のアミノ酸位置91～261によって規定される請求項142に記載の方法。

【請求項146】

前記アミノ酸配列は配列番号1のアミノ酸位置116～261によって規定される請求項142に記載の方法。

【請求項147】

前記アミノ酸配列は配列番号1のアミノ酸位置116～245によって規定される請求項142に記載の方法。

【請求項148】

前記与えることは、(i)前記抗体または抗体フラグメントの投与；および/または(ii)前記抗体または抗体フラグメントをコードするポリヌクレオチドを投与することによって行われる請求項142に記載の方法。 10

【請求項149】

生物学的サンプルにおけるインフルエンザウイルスを同定する方法であって、以下のステップを含む方法：

(a)生物学的サンプルを、SmithおよびWatermanのアルゴリズムを利用するWisconsin配列分析パッケージのBestFitソフトウェアを使用して決定されたとき(この場合、ギャップ生成ペナルティーが8に等しく、ギャップ伸長ペナルティーが2に等しい)、配列番号13に対して少なくとも60%の相同性であるアミノ酸配列を含むポリペプチド(ただし、このポリペプチドはインフルエンザウイルスのHA2ドメインを含まない)を特異的に認識する抗原結合部位を含む抗体または抗体フラグメントと接触させること；および 20

(b)生物学的サンプルにおける前記抗体または抗体フラグメントを含む免疫複合体を検出し、それにより、生物学的サンプルにおけるインフルエンザウイルスを同定すること。

【請求項150】

前記ポリペプチドは配列番号13～配列番号15に示される通りである請求項149に記載の方法。

【請求項151】

前記アミノ酸配列は配列番号13～配列番号15に示される通りである請求項149に記載の方法。 30

【請求項152】

前記アミノ酸配列は配列番号1のアミノ酸位置91～261によって規定される請求項149に記載の方法。

【請求項153】

前記アミノ酸配列は配列番号1のアミノ酸位置116～261によって規定される請求項149に記載の方法。

【請求項154】

前記アミノ酸配列は配列番号1のアミノ酸位置116～245によって規定される請求項149に記載の方法。

【請求項155】 40

前記抗体または抗体フラグメントはさらに標識を含む請求項149に記載の方法。

【請求項156】

前記免疫複合体を検出することは、ステップ(b)の後で標識の強度を定量することによって行われる請求項155に記載の方法。

【請求項157】

配列番号11または配列番号12に示されるような核酸分子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、脊椎動物(例えば、鳥類、ブタおよびヒトなど)におけるインフルエンザウ 50

ウイルス感染を処置および検出するために利用することができる核酸分子、ポリペプチド、抗体、およびそれらを含む医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

インフルエンザウイルスは現在まで、記録された歴史を通して人類における主要な死因および疾病原因の1つである。インフルエンザの流行が一定の間隔で発生しており、さらにインフルエンザの流行は重篤度が大きく異なっている。しかし、最も高頻度には高齢者においてではあるが、著しい死亡数および罹患者を常に生じさせている。インフルエンザの感染は、頭痛、咳、発熱および全身的倦怠感を含む一群の急性症状をもたらす。以前から存在する肺疾患または心臓血管疾患を伴う重症例または重篤な状況では、入院が必要となる。直接的なウイルス感染による肺炎、または二次的な細菌侵入もしくはウイルス侵入による肺炎は、最も頻発する合併症である。インフルエンザウイルス感染の臨床的局面についての総説については、Douglas (1990)、New England Journal of Medicine、322:443~450を参照のこと。

10

【0003】

インフルエンザウイルスは現在、内部の抗原性タンパク質の違いに基づいて、A型、B型およびC型の3つのタイプに分けられる：A型およびB型は近い関係にあり、ほとんどの感染を占める一方で、C型インフルエンザウイルスは、疾患を引き起こす潜在的可能性においては関連性の低い第3のウイルスであり、おそらくは公衆衛生ではほとんど問題とならない。全体的な遺伝子相同性はA型およびB型の間で30%未満であるが、これらのウイルスは共通の祖先を有し、マイナス鎖センス極性の8個のRNAを含む。血球凝集素(HA)およびノイラミニダーゼ(NA)が、脂質を含むウイルス粒子の表面に発現し、インフルエンザウイルスにおいて観測される抗原性変化に主に関わっている。

20

【0004】

抗原ドリフトにより生じるインフルエンザの新しい株が、一定の頻度で、通常的には毎年現れ、感染サイクルを開始し、世界中に広がる。個々の発生がどのように開始されるかについてはほとんど知られていない。多くの新しいサブタイプのインフルエンザがあまり大きくない頻度で現れるが、大流行をもたらす得る。

【0005】

人口の20%までがインフルエンザ感染をある年には発症することがあり、また、インフルエンザの流行は、合衆国では毎年、20000名の死者の原因となっていることが理解される [Palese (2002)、J. Clin. Invest.、110:9~13]。過去100年の間におけるインフルエンザのこれまでにない最悪の影響が1918年の大発生であった。これにより、合衆国では500000人以上が犠牲になり、平均寿命がほぼ10年低下した [Heilman (1990)、Clin. North Am.、37:669~688]。

30

【0006】

個人および社会に対するインフルエンザの影響を考えた場合、現在の課題は、感染の危険性が相当に高い対象(例えば、若年小児および高齢者など)におけるインフルエンザ感染を防止するために使用することができる非常に強力な予防ツールを作製することである。

40

【0007】

いくつかの取り組みが、新規な抗インフルエンザ剤を発見するために着手されている。

【0008】

不活性化インフルエンザウイルスワクチン - 重篤な合併症の危険性がある集団についてインフルエンザウイルスに対処するための最も効果的な方法は予防によるものである。効果的であるために、現行のワクチンは、A型ウイルス成分、B型ウイルス成分、および好ましくはC型ウイルス成分を含むしなければならない。ワクチンを調製するために、それらのウイルス株が孵化卵において成長させられ、その後、ウイルスが精製され、化学的不活性化によって非感染性にされる。利用可能なインフルエンザワクチンの使用は、集団に

50

おける死亡数を低下させるための効果的な方法である。しかしながら、ウイルスの常に変化し続ける性質のために、現在広まっているウイルス株から保護するための適切な組成を有するワクチンの開発は複雑であり、費用がかかる。そのうえ、ワクチンを受ける際の患者の協力は一般に非常に低い。従って、インフルエンザウイルスからの重篤な合併症の危険性がある非常に多数の患者が保護されないでいる。

【0009】

低温適合化インフルエンザウイルスワクチン - 温度感受性インフルエンザウイルスを生ワクチンとして作製することが、動物および哺乳動物における病原性が著しく弱められるので試みられている [Wareing (2001)、Vaccine、19:3320~3330; Maasab (1990)、Adv. Biotechnol. Processes、14:203~242]。典型的には、低温適合化ウイルスを作製するために、インフルエンザウイルスは、その成長を25℃で適合させるために、ニワトリ腎臓細胞および孵化卵において継代培養される。従って、毎年適合したワクチン配合物を、現在の株に見出される抗原を反映する主要なウイルス表面抗原(すなわち、HAおよびNA)をコードする2つの遺伝子を含むために遺伝子操作することができ、これに対して、残る6個の遺伝子は低温適合化親株に由来する。そのような生ウイルスワクチンは、化学的に不活性化されたウイルス調製物によって誘発されるよりも長く持続する交差反応的免疫性に関連し得る局所的な中和免疫性および細胞媒介の免疫応答を誘導することができる。しかしながら、生ワクチンの使用では、毒性の復帰変異体の拡大から生じるかもしれない予期されない合併症に対する広範囲のモニターリングが要求され、このことは、本質的には、合衆国ではそのような治療のための免許交付がないことを明らかにしている。

10

20

【0010】

遺伝子操作された生インフルエンザウイルスワクチン - RNAウイルスのゲノムにおける部位特異的な変化を操作するための様々な技術の出現は、新しいワクチン法を開発することを可能にした [Enami (1990)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87:3802~3805; Garcia-Sastre (1998)、Trends. Biotechnol.、16:230~235]。従って、1回だけの複製サイクルを受けるウイルス粒子の作製がWatanabeおよび共同研究者 [(2002)、J. Virol.、76:767~773]によって明らかにされている。NEP発現遺伝子(NS2)を有しないウイルス粒子の調製物による細胞の感染はウイルスタンパク質の産生をもたらすが、感染性粒子の形成を生じさせない。従って、このような調製物は、感染性ウイルスの複製を可能にすることなく、保護的な抗体応答を誘導し、かつ強力な細胞媒介の免疫応答を刺激する。ウイルス弱毒化のための別の方法は、M2遺伝子が除去されている複製欠陥株の作製である。そのような欠失変異体は組織培養で効率的に成長するが、マウスにおいて不良に成長するだけであり、従って、潜在的な生ウイルスワクチン候補となる [Watanabe (2001)、J. Virol.、75:5656~5662]。しかしながら、高頻度ではあるが、そのような操作されたウイルスの感染力価は低すぎて、臨床的状况では有用になり得ない。

30

【0011】

DNAワクチン接種 - この方法では、1つまたは複数のインフルエンザタンパク質をコードするプラスミドDNAの局所的な投与または注射による投与が伴う。しかしながら、今日まで、インフルエンザに対するDNAワクチン接種に関する報告は動物モデルにおける研究に限られており、治療効力はヒト対象では明らかにされていない [Donnelly (1995)、Nat. Med.、1:583~587; Ljungberg (2000)、268:244~250; Kodihalli (2000)、Vaccine、18:2592~2599]。

40

【0012】

抗ウイルス剤 - 4つの抗ウイルス剤が現在、合衆国では承認されている: アマンタジンおよびリマンチジンは、ウイルスの脱外被に関与するイオンチャネルM2タンパク質の化学的に関連する阻害剤であり [Hay (1985)、EMBO J.、4:3021~30

50

24]、ザナミビルおよびオセルタミビルはNA阻害剤であり[Palesse(1976)、J. Gen. Virol., 33:159~63]、細胞質膜からのインフルエンザウイルス粒子の正確な放出を妨げる。これらの抗ウイルス薬は、インフルエンザに対する何らかの医学的介入のための重要な補助であり、ウイルスに対する予防において使用することができる(未だ承認されていないザナミビルを除く)。さらに、これらの薬剤は、ワクチンが開発されていない新しい大発生株が出現した場合には非常に貴重であり得る。

【0013】

全体的な利点にもかかわらず、現在利用可能な抗ウイルス剤の広範囲に及ぶ使用は、副作用、患者の協力、および薬剤耐性変化体の起こり得る出現に関する問題によって制限されている。

10

【0014】

アンチセンス-アンチセンスオリゴヌクレオチドを使用するインフルエンザウイルスの阻害への試みが報告されている。Leiterおよび共同研究者はホスホジエステルオリゴヌクレオチドおよびホスホロチオアートオリゴヌクレオチドをA型インフルエンザウイルスおよびC型インフルエンザウイルスに対して標的化している。Leiter, J., Agrawal, S., Palesse, P. & Zamecnik, P. C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:3430~3434(1990)。この研究において、ポリメラーゼPB1の遺伝子およびmRNAがvRNAの3'領域およびmRNAの5'領域においてそれぞれ標的化された。A型インフルエンザの配列特異的な阻害は観測されなかったが、C型インフルエンザのある程度の特異的な阻害が認められた。他のインフルエンザウイルスセグメントまたはmRNAは標的化されなかった。

20

【0015】

従って、上記の制限を有しない、インフルエンザウイルスの感染を診断および処置するために使用することができる組成物が必要であることが広く認識されており、そのような組成物を有することは非常に好都合である。

【発明の開示】

【0016】

本発明の1つの局面によれば、細胞のインフルエンザウイルス感染に関係するポリペプチドと特異的に結合することができるポリヌクレオチド配列を含む核酸分子が提供される。

30

【0017】

下記に記載される本発明の好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、ポリヌクレオチド配列は、配列番号11および配列番号12からなる群から選択される。

【0018】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、ポリペプチドはインフルエンザウイルスのポリペプチドである。

【0019】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、ポリヌクレオチド配列は、配列番号1のアミノ酸位置91~261によって規定される血球凝集素の領域と結合することができる。

40

【0020】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、ポリペプチドは宿主細胞のポリペプチドである。

【0021】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、宿主細胞のポリペプチドはシアル酸受容体である。

【0022】

本発明の別の局面によれば、インフルエンザウイルス感染を阻害することができる分子を作製する方法が提供され、この方法は、(a)複数の核酸分子を、細胞のインフルエンザウイルス感染に関係するポリペプチドと接触させること；(b)前記ポリペプチドと特

50

異的に結合することができる少なくとも1つの核酸分子を前記複数の核酸分子から同定すること；および(c)前記ポリペプチドと特異的に結合することができる少なくとも1つの核酸分子を単離し、それにより、インフルエンザウイルス感染を阻害することができる分子を作製することを含む。

【0023】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、この方法はさらに、(a)に先だって、コンビナトリアル合成法を使用して複数の核酸分子を作製することを含む。

【0024】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、この方法はさらに、(a)の前、または(c)の後で、複数の核酸分子を修飾することを含む。

【0025】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、この方法はさらに、ステップ(a)～ステップ(c)を繰り返すことを含む。

【0026】

本発明のなお別の局面によれば、細胞のインフルエンザウイルス感染に関するポリペプチドと特異的に結合することができるポリヌクレオチド配列を含む核酸分子と、生理学的に許容され得るキャリアとを含む医薬組成物が提供される。

【0027】

本発明のさらに別の局面によれば、包装材と、前記包装材に含有される、インフルエンザ感染を処置または防止するために特定された医薬組成物とを含む製造物が提供され、この場合、医薬組成物は、細胞のインフルエンザウイルス感染に関するポリペプチドと特異的に結合することができるポリヌクレオチド配列を含む核酸分子を有効成分として含む。

【0028】

本発明のさらなる局面によれば、インフルエンザウイルス感染を処置または防止する方法が提供され、この方法は、その必要性のある対象に、細胞のインフルエンザウイルス感染に関するポリペプチドと特異的に結合することができるポリヌクレオチド配列を含む核酸分子の治療効果的な量を与え、それにより、インフルエンザウイルス感染を処置または防止することを含む。

【0029】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、与えることは、(i)前記核酸分子の投与；および/または(ii)前記核酸分子を発現するポリヌクレオチドを投与することによって行われる。

【0030】

本発明のなおさらなる局面によれば、生物学的サンプルにおけるインフルエンザウイルスを同定する方法が提供され、この方法は、(a)生物学的サンプルを、インフルエンザウイルスのポリペプチドと特異的に結合することができるポリヌクレオチド配列を含む核酸分子と接触させること；および(b)生物学的サンプル中のインフルエンザウイルスポリペプチドに結合した前記核酸分子を検出し、それにより、インフルエンザ感染を同定することを含む。

【0031】

本発明のさらにさらなる局面によれば、抗ウイルス剤をインフルエンザウイルス感染組織に標的化する方法が提供され、この方法は、その必要性のある対象に、インフルエンザウイルスのポリペプチドと特異的に結合することができるポリヌクレオチド配列を含む核酸分子にコンジュゲート化された抗ウイルス剤の治療効果的な量を投与し、それにより、抗ウイルス剤をインフルエンザ感染組織に標的化することを含む。

【0032】

本発明のさらなる局面によれば、細胞のインフルエンザウイルス感染に関するポリペプチドと特異的に結合することができるポリヌクレオチド配列を含む核酸分子にコンジュ

10

20

30

40

50

ゲート化された抗ウイルス剤を含む組成物が提供される。

【0033】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、ポリペプチドはインフルエンザウイルスのポリペプチドである。

【0034】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、ポリペプチドは、血球凝集素、ノイラミニダーゼ、RNA指向RNAポリメラーゼコアタンパク質、M1マトリックスタンパク質、M2マトリックスタンパク質およびNSタンパク質からなる群から選択される。

【0035】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、ポリヌクレオチド配列は、配列番号1のアミノ酸位置91~261によって規定される血球凝集素の領域と結合することができる。

【0036】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、ポリペプチドは宿主細胞のポリペプチドである。

【0037】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、宿主細胞のポリペプチドはシアル酸受容体である。

【0038】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、ポリヌクレオチド配列は一本鎖である。

【0039】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、ポリヌクレオチド配列はDNAである。

【0040】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、ポリヌクレオチド配列はRNAである。

【0041】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、核酸分子はさらに、検出可能な標識を含む。

【0042】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、ポリヌクレオチド配列は2'-フルオロ(2'-F)修飾ヌクレオチドを含む。

【0043】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、10ヌクレオチド~35ヌクレオチドの間の長さを有するポリヌクレオチド配列が選択される。

【0044】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、医薬組成物はさらに薬剤を含む。

【0045】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、薬剤は、免疫調節剤、抗生物質、抗ウイルス剤、アンチセンス分子およびリボザイムからなる群から選択される。

【0046】

本発明のなおさらなる局面によれば、インフルエンザウイルスに対するワクチン接種のために有用なポリペプチドが提供され、このポリペプチドは、SmithおよびWatermanのアルゴリズムを利用するWisconsin配列分析パッケージのBestFitソフトウェアを使用して決定されたとき(この場合、ギャップ生成ペナルティーが8に等しく、ギャップ伸長ペナルティーが2に等しい)、配列番号13に対して少なくとも

10

20

30

40

50

60%の相同性であるアミノ酸配列を含む(ただし、このポリペプチドはインフルエンザウイルスのHA2ドメインを含まない)。

【0047】

本発明のさらにさらなる局面によれば、SmithおよびWatermanのアルゴリズムを利用するWisconsin配列分析パッケージのBestFitソフトウェアを使用して決定されたとき(この場合、ギャップ生成ペナルティーが8に等しく、ギャップ伸長ペナルティーが2に等しい)、配列番号13に対して少なくとも60%の相同性であるアミノ酸配列を含むポリペプチド(ただし、このポリペプチドはインフルエンザウイルスのHA2ドメインを含まない)と、医薬的に許容され得るキャリアまたは希釈剤とを含む医薬組成物が提供される。

10

【0048】

本発明のさらにさらなる局面によれば、SmithおよびWatermanのアルゴリズムを利用するWisconsin配列分析パッケージのBestFitソフトウェアを使用して決定されたとき(この場合、ギャップ生成ペナルティーが8に等しく、ギャップ伸長ペナルティーが2に等しい)、配列番号13に対して少なくとも60%の相同性であるアミノ酸配列を含むポリペプチド(ただし、このポリペプチドはインフルエンザウイルスのHA2ドメインを含まない)を特異的に認識する抗原結合部位を含む抗体または抗体フラグメントが提供される。

【0049】

本発明のさらにさらなる局面によれば、SmithおよびWatermanのアルゴリズムを利用するWisconsin配列分析パッケージのBestFitソフトウェアを使用して決定されたとき(この場合、ギャップ生成ペナルティーが8に等しく、ギャップ伸長ペナルティーが2に等しい)、配列番号13に対して少なくとも60%の相同性であるアミノ酸配列を含むポリペプチド(ただし、このポリペプチドはインフルエンザウイルスのHA2ドメインを含まない)をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供される。

20

【0050】

本発明のさらにさらなる局面によれば、SmithおよびWatermanのアルゴリズムを利用するWisconsin配列分析パッケージのBestFitソフトウェアを使用して決定されたとき(この場合、ギャップ生成ペナルティーが8に等しく、ギャップ伸長ペナルティーが2に等しい)、配列番号13に対して少なくとも60%の相同性であるアミノ酸配列を含むポリペプチド(ただし、このポリペプチドはインフルエンザウイルスのHA2ドメインを含まない)をコードする単離されたポリヌクレオチドを含む核酸構築物が提供される。

30

【0051】

本発明のさらにさらなる局面によれば、前記核酸構築物を含む宿主細胞が提供される。

【0052】

本発明のさらにさらなる局面によれば、SmithおよびWatermanのアルゴリズムを利用するWisconsin配列分析パッケージのBestFitソフトウェアを使用して決定されたとき(この場合、ギャップ生成ペナルティーが8に等しく、ギャップ伸長ペナルティーが2に等しい)、配列番号13に対して少なくとも60%の相同性であるアミノ酸配列を含むポリペプチド(ただし、このポリペプチドはインフルエンザウイルスのHA2ドメインを含まない)をコードするポリヌクレオチドと、医薬的に許容され得るキャリアまたは希釈剤とを含む医薬組成物が提供される。

40

【0053】

本発明のさらにさらなる局面によれば、インフルエンザウイルス感染を処置または防止する方法が提供され、この方法は、SmithおよびWatermanのアルゴリズムを利用するWisconsin配列分析パッケージのBestFitソフトウェアを使用して決定されたとき(この場合、ギャップ生成ペナルティーが8に等しく、ギャップ伸長ペナルティーが2に等しい)、配列番号13に対して少なくとも60%の相同性であるアミ

50

ノ酸配列を含むポリペプチド（ただし、このポリペプチドはインフルエンザウイルスのHA2ドメインを含まない）の治療効果的な量を、その必要性のある対象に与えることを含む。

【0054】

本発明のさらにさらなる局面によれば、インフルエンザウイルス感染を処置または防止する方法が提供され、この方法は、SmithおよびWatermanのアルゴリズムを利用するWisconsin配列分析パッケージのBestFitソフトウェアを使用して決定されたとき（この場合、ギャップ生成ペナルティーが8に等しく、ギャップ伸長ペナルティーが2に等しい）、配列番号13に対して少なくとも60%の相同性であるアミノ酸配列を含むポリペプチド（ただし、このポリペプチドはインフルエンザウイルスのHA2ドメインを含まない）を特異的に認識する抗原結合部位を含む抗体または抗体フラグメントの治療効果的な量を、その必要性のある対象に与えることを含む。

10

【0055】

本発明のさらにさらなる局面によれば、生物学的サンプルにおけるインフルエンザウイルスを同定する方法が提供され、この方法は、（a）生物学的サンプルを、SmithおよびWatermanのアルゴリズムを利用するWisconsin配列分析パッケージのBestFitソフトウェアを使用して決定されたとき（この場合、ギャップ生成ペナルティーが8に等しく、ギャップ伸長ペナルティーが2に等しい）、配列番号13に対して少なくとも60%の相同性であるアミノ酸配列を含むポリペプチド（ただし、このポリペプチドはインフルエンザウイルスのHA2ドメインを含まない）を特異的に認識する抗原結合部位を含む抗体または抗体フラグメントと接触させること；および（b）生物学的サンプルにおける前記抗体または抗体フラグメントを含む免疫複合体を検出し、それにより、生物学的サンプルにおけるインフルエンザウイルスを同定することを含む。

20

【0056】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、ポリペプチドは配列番号13～配列番号15に示される通りである。

【0057】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、アミノ酸配列は配列番号13～配列番号15に示される通りである。

【0058】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、アミノ酸配列は配列番号1のアミノ酸位置91～261によって規定される。

30

【0059】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、アミノ酸配列は配列番号1のアミノ酸位置116～261によって規定される。

【0060】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、アミノ酸配列は配列番号1のアミノ酸位置116～245によって規定される。

【0061】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、抗体または抗体フラグメントはさらに標識を含む。

40

【0062】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、免疫複合体を検出することは、（b）の後で標識の強度を定量することによって行われる。

【0063】

本発明のさらにさらなる局面によれば、配列番号11または配列番号12に示されるような核酸分子が提供される。

【0064】

本発明は、インフルエンザウイルス感染を診断および処置するために使用することができる核酸分子、ポリペプチド、それに対して作製された抗体、およびそれらを含む組

50

成物を提供することによって、現在知られている形態の欠点に対処することに成功している。

【0065】

別途定義されない場合、本明細書中で使用されるすべての技術的用語および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書中に記載される方法および材料と同様または同等である方法および材料を本発明の実施または試験において使用することができるが、好適な方法および材料が下記に記載される。矛盾する場合には、定義を含めて、本特許明細書が優先する。また、材料、方法および実施例は例示にすぎず、限定であることは意図されない。

【0066】

図面の簡単な記述

本発明は、例としてだけであるが、添付されている図面を参照して、本明細書中に記載される。次に図面を詳しく具体的に参照して、示されている細目は、例としてであり、また、本発明の好ましい実施形態の例示的な議論のためだけのものであり、従って、本発明の原理および概念的局面の最も有用かつ容易に理解された記述であると考えられるものを提供するために示されていることが強調される。これに関して、記述を図面と一緒に理解することにより、本発明のいくつかの形態が実際にどのように具体化され得るかが当業者には明らかになるので、発明の構造的詳細を、発明の基本的な理解のために必要であるよりも詳細に示すことは試みられていない。

図1aは、本発明の核酸分子に取り込むことができる核酸の修飾を表す、Eaton (1997)、Curr. Opin. Chem. Biol.、1:10~16から改変された概略図であり、5位が修飾された2'-デオキシウリジンおよびウリジンを示す。

図1bは、本発明の核酸分子に取り込むことができる核酸の修飾を表す、Eaton (1997)、Curr. Opin. Chem. Biol.、1:10~16から改変された概略図であり、8位が修飾された2'-デオキシアデニン、アデニンおよびグアノシンを示す。

図1cは、本発明の核酸分子に取り込むことができる核酸の修飾を表す、Eaton (1997)、Curr. Opin. Chem. Biol.、1:10~16から改変された概略図であり、2'-修飾ウリジンを示す。

図2a~図2bは、ELISAによって測定されたときの、本発明の教示に従って作製されたインフルエンザ特異的アプタマー(A21およびA22)およびコントロールの一本鎖アプタマーの完全なインフルエンザウイルスまたはHA₉₁₋₂₆₁ペプチドに対する結合レベルを表すヒストグラムである。コントロール核酸と比較した場合、ウイルスペプチドに対するA21およびA22の著しい結合(それぞれ、 $p = 0.042$ および $p = 0.0008$)、ならびに、A22アプタマーと比較した場合、完全なウイルスに対するA21の結合の著しい低下($p = 0.017$)に留意すること。図2c~図2eは、DNA Drawソフトウェア(18)によって作製されるような、A22アプタマーの提案される二次構造(図2c)、A21アプタマーの提案される二次構造(図2d)、および、NP147~158をコードするコントロールオリゴヌクレオチドの提案される二次構造(図2e)の概略図である。

図3aは、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミド(MTT)アッセイを使用して測定されたときの、インフルエンザウイルスで処理されたMDC K細胞の生存性に対する本発明のA22アプタマーの効果を示す用量応答曲線である。最も大きな保護効果が、A22を50 pmol~100 pmolの濃度範囲で使用して達成されたことに留意すること。

図3bは、H3N2感染MDC K細胞およびH2N2感染MDC K細胞に対する本発明の(それぞれ50 pmolでの)A21アプタマーおよびA22アプタマーの保護効果を表すヒストグラム表示である。

図3cは、MTTアッセイによって測定されたときの、宿主細胞タンパク質とは無関係なA22の細胞保護効果を図示するヒストグラム表示である。MDC K細胞を、示された

10

20

30

40

50

時間について 50 pmol の A22 による処理の後 60 分間、インフルエンザウイルスとインキュベーションした。処理群およびコントロール群の間に大きな差がないことに留意すること (30 分については $p = 0.237$ 、60 分については $p = 0.09$)。同様に、細胞生存性における大きな差がないことが 2 つのインキュベーション時間の間において明らかであった ($p > 0.05$)。

図 3 d は、MTT アッセイによって測定されたときの、感染 MDC K 細胞に対する A22 の保護効果を図示するヒストグラムである。MDC K 細胞を、 50 pmol の A22 による 60 分間の処置の前の 30 分間または 60 分間、インフルエンザウイルスとインキュベーションした。非感染細胞と比較したとき、60 分のウイルス処置 MDC K 細胞に対する A22 の大きくない効果が明らかであったが、30 分のウイルス処置 MDC K 細胞に対する A22 の著しい保護効果が認められたことに留意すること。 10

図 4 は、インフルエンザによる細胞の感染に対する A22 の効果を表す顕微鏡写真である (図 4 a ~ 図 4 f)。図 4 a ~ 図 4 c は、インフルエンザによる感染後の MDC K 細胞 (図 4 a)、A22 による前処理の後の MDC K 細胞 (図 4 b)、または非感染 MDC K 細胞の光学顕微鏡画像である。図 4 d ~ 図 4 f は、インフルエンザウイルスとの 2 日間のインキュベーションの後 (図 4 d)、インフルエンザウイルスおよび A22 との 2 日間のインキュベーションの後 (図 4 e)、または A22 単独との 2 日間のインキュベーションの後 (図 4 f) における MDC K 細胞の免疫蛍光画像である。

図 5 は、A22 の存在下または非存在下でのインフルエンザウイルス感染 BALB/c マウスの肺切片を示す顕微鏡写真である (図 5 a ~ 図 5 f)。様々な処置群におけるマウスを、インフルエンザウイルスを鼻腔内接種した 6 日後に屠殺し、その肺の小さい一部を取り出し、組織学的検査のために緩衝化された 10% 中性ホルマリンに入れた。染色を、ヘマトキシリンおよびエオシンを用いて行った。図 5 a - 非感染マウスから得られた肺切片；図 5 b - インフルエンザウイルス感染マウスから得られた肺切片；図 5 c - ウイルス感染の 1 日前に A22 アプタマーで処置された「-1 日」群のマウスから得られた肺切片；図 5 d - ウイルス感染と同時に A22 で処置された「0 日」群のマウス肺切片；図 5 e ~ 図 5 f - 感染後 2 日目に A22 で処置された「+2 日」群の肺から得られた 2 つの異なる切片である。マウスの肺の約 60% が、図 5 f では、非感染コントロールの組織学と類似するパターンに対応し、これに対して、肺の 40% が単核細胞の大量の拡大を含有した (図 5 e) ことが推定される。 20 30

図 6 は、体重 (図 6 a) および肺のウイルス負荷量 (図 6 b) によって測定されたときのインフルエンザウイルス感染マウスに対する A22 の保護効果を図示するグラフである。マウスに 100 HAU の A/Port Chalmers/1/73 を鼻腔内接種によって感染させた。-1 日群 - ウイルス接種の 1 日前に 2.5 nmol の A22 で処置されたマウス；+2 日群 - ウイルス接種後 2 日目に 2.5 nmol の A22 で処置されたマウス；0 日群 - ウイルス接種と同時に A22 で処置されたマウス。感染させた非処置マウスの体重が、それぞれの時間間隔について、A22 で処置されたマウスの体重と比較された (図 6 a)。あるいは、A22 の保護能力を、肺のウイルス負荷量を測定することによって調べた (図 6 b)。

図 7 a は、A22 アプタマーを使用したときの、インフルエンザのいくつかの株を (それぞれ 10 HAU で) 用いたマウス感染の阻害を表すグラフである。 40

図 7 b は、本発明の A21 アプタマーおよび A22 アプタマー、ならびにコントロールのオリゴヌクレオチドおよび抗インフルエンザ薬オセルタミビルを使用したときの、A/Texas/1/77 インフルエンザ株によるマウス感染の阻害を表すグラフである。

図 8 は、ELISA によって測定されたときの、組換え HA₉₁₋₂₆₁ フラグメントに対する抗体と様々なインフルエンザウイルス株との交差反応効果を図示するグラフである (図 8 a ~ 図 8 e)。IgG レベルが免疫化マウス (黒記号) および非免疫化マウス (白記号) の血清サンプルにおいて ELISA によって測定された。図 8 a - Port Chalmers/1/73 感染マウス；図 8 b - PR/8/34 感染マウス；図 8 c - Texas/1/77 感染マウス；図 8 d - Japanese/57 感染マウス；および 50

、図 8 e は、完全な A / T e x a s / 1 / 7 7 ウイルス（ひし形）、A / P o r t C h a l m e r s / 1 / 7 3 ウイルス（三角）、A / P R / 8 / 3 4 ウイルス（丸）および A / J a p a n e s e / 5 7 ウイルス（十字）によって誘導される株特異的な免疫応答を示す。

図 9 a は、N i - N T A カラムによって精製された H A_{9 1 - 1 0 8} ペプチドの S D S - P A G E 分析を表す顕微鏡写真である。M - 分子量マーカー；1 - 1 0 μ g の H A_{9 1 - 1 0 8} ペプチド；2 - 2 0 μ g の H A_{9 1 - 1 0 8} ペプチド。

図 9 b は、E L I S A アッセイによって測定されたときの H A_{9 1 - 1 0 8} ペプチドの抗原性を表すグラフである。H A_{9 1 - 2 6 1} ペプチドを E L I S A プレートに被覆し、H A_{9 1 - 1 0 8} ペプチドに対するウサギ抗血清（黒四角）または完全な A / T e x a s / 7 7 インフルエンザウイルスに対するウサギ抗血清（白丸）と反応させた。コントロールの血清なしがアスタリスクによって示される。 10

図 1 0 a ~ 図 1 0 b は、E L I S A アッセイによって測定されたときの本発明の H A_{9 1 - 2 6 1} ペプチドの免疫原性を表すグラフ表示である。鼻腔内（三角）または肉趾（ひし形）のいずれかにより H A_{9 1 - 2 6 1} ペプチドで免疫化されたマウス、あるいはペプチドに対応する D N A ワクチン（黒丸）で免疫化されたマウスからの示された血清希釈物を、H A_{9 1 - 2 6 1} ペプチド（図 1 0 a）または完全なウイルス（図 1 0 b）で被覆されたマイクロタイプレートと接触させ、E L I S A アッセイを行った。D N A プライミング - タンパク質追加抗原刺激によって免疫化されたマウスからの血清が黒四角によって示され、また、非免疫化マウスからの血清がアスタリスクによって示される。コントロールの空ベクター p C D N A 3 . 1 で免疫化されたマウスからの血清が白丸で示される。 20

図 1 0 c は、抗 H A_{9 1 - 2 6 1} ペプチドと多数のインフルエンザウイルス株との交差反応性を表すヒストグラムである。

図 1 1 は、肺ホモジネート物の E L I S A アッセイによって測定されたときの、H A_{9 1 - 2 6 1} ペプチド（黒三角）または D N A ワクチン（黒四角）によるマウスの鼻腔内免疫化の後における本発明の H A_{9 1 - 2 6 1} ペプチド（図 1 1 a）または A / T e x a s / 7 7 ウイルス（図 1 1 b）との反応性を有する I g A 抗体の産生を図示するグラフである（図 1 1 a ~ 図 1 1 b）。一緒にされた D N A プライミング - タンパク質フラグメント追加抗原刺激が黒四角によって示され、非免疫化コントロールマウスがアスタリスクによって示される。ベクター p C D N A 3 . 1 で免疫化コントロールが白四角によって示される。 30

図 1 2 は、H A_{9 1 - 2 6 1} ペプチド（図 1 2 a）またはウイルス粒子（図 1 2 b）によるインビトロ刺激に应答した H A_{9 1 - 2 6 1} D N A および / または H A_{9 1 - 2 6 1} ペプチドによる免疫刺激マウスから得られた脾臓細胞の増殖を表すヒストグラムである。増殖がチミジン取り込みによってモニターされ、培地コントロールと比較して刺激指数として表された。

図 1 3 は、インフルエンザウイルス刺激に应答した脾臓細胞によるサイトカイン分泌を表すヒストグラムである（図 1 3 a ~ 図 1 3 b）。マウスを 3 週間の間隔で 3 回免疫化し、取り出したその脾臓細胞を不活性化インフルエンザウイルスによりインビトロで刺激した。精製サイトカインの標準曲線との比較により定量された平均サイトカイン濃度が示される。 40

図 1 4 は、本発明のペプチドワクチンおよび / または D N A ワクチンで免疫化されたマウスにおける C T L 応答を表すヒストグラムである（図 1 4 a ~ 図 1 4 b）。B A L B / c マウスを p H A_{9 1 - 2 6 1} D N A またはペプチドで免疫化し、脾臓細胞をウイルス特異的 C T L 活性についてアッセイした。それぞれの群についてのデータは、2 0 : 1（図 1 4 a）および 5 0 : 1（図 1 4 b）のエフェクター対標的比での^{5 1} C r 標識された標的細胞の溶解によって表される。

図 1 5 は、本発明の p H A_{9 1 - 2 6 1} D N A 構築物またはペプチド構築物で免疫化されたマウスにおける致死量未満のインフルエンザウイルス抗原投与感染に対する保護を表すヒストグラムである（図 1 5 a ~ 図 1 5 b）。マウスは最後の免疫化の 4 週間後に抗原 50

投与され、5日後に屠殺された。それぞれの群から得られた肺ホモジネートの 10^{-8} 希釈物を赤血球凝集アッセイによってウイルスの存在についてアッセイした。結果が、 10^{-8} のホモジネート希釈度での各群におけるウイルス陽性肺の百分率として表され(図15a)、そしてまた Log EID_{50} として表される(図15b)。アスタリスクは統計学的有意差($p < 0.05$)を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0067】

本発明は、脊椎動物(例えば、鳥類、ブタおよびヒトなど)におけるインフルエンザウイルス感染を処置および検出するために使用することができる核酸分子、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および医薬組成物に関する。

10

【0068】

本発明の原理および操作は、図面および付随する記述を参照してより良く理解することができる。

【0069】

本発明の少なくとも1つの実施形態を詳しく説明する前に、本発明は、その適用において、下記の説明において示される細部、または実施例によって例示される細部に限定されないことを理解しなければならない。本発明は他の実施形態が可能であり、または様々な方法で実施することが可能であり、または様々な方法で実行される。また、本明細書中で用いられる表現法および用語法は記述のためであり、限定であるとして見なしてはならない。

20

【0070】

インフルエンザは、臨床的な病的状態、死亡者および大きい経済的損失を発生する毎年引き起こす主要な公衆衛生問題である。今日まで、ワクチン接種法は、インフルエンザ抑制の基礎となっているが、危険性が高い集団における罹患者および死亡者を防止することに向けられてきている。しかしながら、インフルエンザウイルスの表面タンパク質(すなわち、血球凝集素およびノイラミニダーゼ)の迅速かつ予測できない変化のために、新しいウイルス株が出現するので、効果的なワクチンの開発は複雑であり、費用がかかる。

【0071】

現在、利用可能な抗ウイルス薬には、ウイルスM2イオンチャネル遮断剤のアマンタジンおよびリマンタジン、ならびにノイラミニダーゼ遮断剤のザナミビル(Relenza(商標))およびオセルタミビル(Tamiflu(商標))が含まれ、これらはウイルス粒子の放出および出芽を妨げている。M2イオンチャネル遮断剤は、M2タンパク質をコードしないB型インフルエンザウイルスに対しては効果がなく、また、重篤な副作用および獲得された耐性によって制限される一方で、ザナミビルの使用は気道抵抗を伴い、オセルタミビルの使用は非常に費用がかかる。

30

【0072】

本明細書中上記に記載されるように、インフルエンザウイルスは2つの表面抗原[ノイラミニダーゼおよび血球凝集素(HA)]をコードしており、これらはゆっくりした変化(すなわち、抗原シフトおよび抗原ドリフト)を受け、インフルエンザにおける大きな抗原性変化を生じさせている。HA分子(75kD~80kD、GenBankアクセシオン番号AF092062、配列番号1)は、種々のウイルス株の血清学的特異性を規定する際の最も重要な抗原であり、これには、複数の抗原決定基が含まれており、そのいくつかは、異なる株において配列変化を受ける領域に存在し(すなわち、株特異的な決定基)、他の決定基が、多くのHA分子に共通する領域に存在する(すなわち、共通決定基)。

40

【0073】

本発明を実施に移しているとき、本発明者らは、HAポリペプチドにおける保存された配列と結合するように設計されたオリゴヌクレオチド(例えば、アプタマー)は、宿主細胞に対するウイルス結合を防止するために利用できることを発見している。本明細書中下記および下記の実施例の節において例示されるように、本発明者らは、入念な実験によって、インフルエンザウイルス感染を診断および処置するために使用することができるアプ

50

タマー核酸分子を始めて提供している。そのようなアプタマー分子はウイルス交差反応性を示し、そのため、インフルエンザウイルスに対する万能的なワクチンとして使用することができる。

【0074】

アプタマーは、目的とするポリペプチドと特異的に結合し、その指定された機能を阻害するために選択される、三次構造を有する核酸配列である。アプタマーおよびその作用機構のさらなる記載が、Osborne他、Curr. Opin. Chem. Biol., 1997, 1(1): 5~9; および Patel, D. J., Curr. Opin. Chem. Biol., Jun. 1997, 1(1): 32~46によって示される。

【0075】

従って、本発明の1つの局面によれば、細胞のインフルエンザウイルス感染に関係するポリペプチドと特異的に結合することができるポリヌクレオチド配列を含む核酸分子が提供される。

10

【0076】

細胞のインフルエンザウイルス感染に関係するポリペプチドと特異的に結合する本発明のこの局面の核酸分子の能力は、インフルエンザウイルス感染の治療および診断におけるその使用を可能にする。

【0077】

本明細書中で使用される「細胞のインフルエンザウイルス感染に関係するポリペプチド」は、A型~C型のインフルエンザウイルス株を含むオルトミクソウイルス科ウイルスによってコードされるポリペプチド、宿主細胞のポリペプチド、またはそれらのペプチドフラグメントを示す。

20

【0078】

細胞のウイルス感染に関係するインフルエンザウイルスポリペプチドの例には、限定されないが、血球凝集素、ノイラミニダーゼ、RNA指向RNAポリメラーゼコアタンパク質(PB1、PB2およびPAを含む)、M1マトリックスタンパク質およびM2マトリックスタンパク質、ならびにNSタンパク質が含まれる。

【0079】

インフルエンザウイルス感染に関係する宿主細胞ポリペプチドの例には、限定されないが、末端のN-アセチルノイラミン酸(NANA=シアル酸)基を含有するムコタンパク質、HLAタンパク質およびエンドサイトーシスタンパク質、シアル酸含有のグリカンおよび粘膜炎糖タンパク質が含まれる。

30

【0080】

本発明のこの局面のポリペプチド標的は、本発明の核酸分子の特異性を最大にし、かつ、その細胞毒性を低下させるために、好ましくはウイルス性であることが理解される。従って、好ましいポリペプチド標的配列は、A型~C型のインフルエンザウイルスによって共有される保存されたアミノ酸配列を含む。そのような配列と結合するように作製された核酸分子は万能的なワクチンとして使用することができる。

【0081】

保存されたウイルスペプチド標的の例を下記の表1に示す。

40

【表 1】

表 1ーウイルスペプチド標的

インフルエンザ ウイルス タンパク質 (アミノ酸位置)	ペプチド配列	配列番号	参考文献
HA (91-108)	Ser-Lys-Ala-Phe-Ser-Asn- Cys-Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val- Pro-Asp-Tyr-Ala-Ser-Leu	2	米国特許第4474757号
HA (306-318)	Pro-lys-tyr-val-lys-gln- asn-thr-leu-lys-leu-ala- thr	3	Rothbard (1998) Cell 52(4):515-23
HA (305-323)	Cys-Pro-Lys-Tyr-Val-Lys- Gln-Asn-Thr-Leu-Lys-Leu- Ala-Thr-Gly-Met-Arg-Asn- Val	4	Rothbard (1998) Cell 52(4):515-23
NP (335-350)	Ser-Ala-Ala-Phe-Glu-Asp- Leu-Arg-Val-Leu-Ser-Phe- Ile-Arg-Gly-Tyr	5	Dyer and Middleton Histocompatibility testing, a practical approach Ed. Rickwood and Hames IRL Press Oxford (1993); Gulukota (1996) Biomolecular Engineering 13:81.
NP (380-393)	Glu-Leu-Arg-Ser-Arg-Tyr- Trp-Ala-Ile-Arg-Thr-Arg- Ser-Gly	6	Dyer and Middleton Histocompatibility testing, a practical approach Ed. Rickwood and Hames IRL Press Oxford (1993); Gulukota (1996) Biomolecular Engineering 13:81.
M1 (220-236)	Gly-Thr-His-Pro-Ser-Ser- Ser-Ala-Gly-Leu-Lys-Asn- Asp-Leu-Leu-Glu-Asn	7	米国特許第5243030号
M1 (79-104)	Phe-Val-Gln-Asn-Ala-Leu-Asn-Gly- Asn-Gly-Asp-Pro-Asn-Asn-Met-Asp- Arg-Ala-Val-Lys-Leu-Tyr-Arg-Lys- Leu-Lys	8	米国特許第5243030号
M1 (64-80)	Phe-Thr-Leu-Thr-Val-Pro-Ser-Glu- Arg-Gly-Leu-Gln-Arg-Arg-Arg-Phe- Val	9	米国特許第5243030号
M1 (149-169)	Ala-Thr-Cys-Glu-Gln-Ile-ala-Asp- Ser-Gln-His-Arg-Ser-His-Arg-Gln- Met-Val-ala-Thr-Thr	10	米国特許第5243030号

10

20

30

【0082】

40

本発明のこの局面の核酸分子は、本明細書中上記で記載されたポリペプチド標的と特異的に結合することができる一本鎖または二本鎖のDNA分子またはRNA分子あるいはそれらの任意の修飾体を示す。本発明のこの局面の核酸分子は交換可能に「アダマー」として示される。

【0083】

典型的には、本発明のこの局面による核酸分子は、10塩基～100塩基などの様々な長さを有する。しかし、短い核酸分子（例えば、10塩基～35塩基）が、生物利用能（すなわち、分解に対する抵抗性、および増大した細胞取り込み）などの、経済的な事情、製造上の事情および治療的な事情のために好ましくは使用されることが理解される。

【0084】

50

本発明のこの局面の現在知られている実施形態によれば、核酸分子は、好ましくは、配列番号 11 および配列番号 12 に示される核酸分子（すなわち、A21 および A22）である。

【0085】

本明細書中上記で述べられたように、本発明のこの局面による核酸分子は、好ましくは、標的ポリペプチドに対する高まった生物利用能および改善された効力を得るために修飾される。修飾には、核酸塩基または分子全体に対するさらなる電荷、分極性、水素結合、静電的相互作用および可動性を組み込む様々な化学基が含まれるが、これらに限定されない。付加または修飾される化学基は、ポリペプチド標的のトポロジーに一致する立体配座的に柔軟な連結を含むように選択される。また、本発明のこの局面の核酸分子を修飾するための化学がトリホスファート（NTP）合成またはホスホルアミダイト合成のいずれかについて可能にする対策が取られる。

10

【0086】

従って、例えば、本発明のこの局面の核酸分子は、好ましくは、標的ポリペプチドに対する特異的な架橋を可能にし、それにより高親和性の化合物を形成する修飾を含む。

【0087】

付加される架橋基は、疎水性の機能性、親水性の機能性、または荷電した機能性を含有することができる。架橋は、イミン、アセタール、エステルおよびジスルフィド連結の形成によって、そして同様に、 α 、 β -不飽和カルボニルリンカーへの共役付加によって達成することができる。ホスホルアミダイト合成のために好適である 2'-デオキシウリジンヌクレオシドの様々な例が図 1a に示され、これらは、小さい疎水性官能基（例えば、ビニル（群 1、図 1a）など）、大きい疎水性官能基（例えば、プレニル（群 13 ~ 群 14、図 1a）など）、および、様々な程度の側鎖疎水性を有するカルボニル化合物（群 3、群 6 ~ 群 11、図 1a）を含む。

20

【0088】

ピリミジン塩基の修飾（例えば、5 位における RNA ウリジンヌクレオシド修飾など）は、ケトンの形態でコンジュゲート化することができる疎水性基 [群 17、群 18、図 1a、Crouch (1994)、Nucleosides Nucleotides、13:939~944]、アミドの形態でコンジュゲート化することができる疎水性基 [群 24、群 27、図 1a、Dewey (1995)、J. Am. Chem. Soc.、117:8474~8475] などを含み、これらは DNA 核酸分子または RNA 核酸分子のいずれにも結合することができる。アミドは水素結合能をアプタマーに付与することができることが理解される。いずれの場合でも、本明細書中上記に記載されるように、架橋カルボニル基をウリジンの 5 位に結合することができる（群 15 ~ 群 18、図 1a）。しかし、カルボニルリンカーの予想される反応性は、標的ポリペプチドの境界に依存して著しく異なり得ることが理解される。

30

【0089】

プリン修飾の様々な例が図 1b に示される。例えば、疎水性の置換基を RNA または DNA のプリンヌクレオシドの 8 位において結合することができる（群 28 ~ 群 30、図 1b）。立体的障害の程度をアミド連結によって変化させることができる（群 31、群 33、群 34、群 37 および 群 38、図 1b）。親水性の基（群 35、図 1b）および荷電した基（群 36 および 群 39、図 1b）をプリンヌクレオシドの 8 位に取り付けることができる。標的ポリペプチドに対する既知の親和性を有する官能基をプリン塩基の 8 位に結合することができることが理解される（例えば、ビオチン化ヌクレオシド（群 40、図 1b）など）。

40

【0090】

修飾のためのさらなる部位には、RNA の 2' 位、ならびに、RNA および DNA のホスホジエステル酸素が含まれるが、これらに限定されない。2' 位のピリミジンヌクレオシド修飾を、Sebesta (1996)、Tetrahedron、52:14385~14402; McGee (1996)、Tetrahedron、Lett.、37:

50

1995～1998; McGee (1996)、J. Org. Chem.、61:781～785に従って行うことができる。本質的には、アミンリンカー（例えば、ヒドロキシルアミンリンカーなど）を使用して、異なるトポロジーを有する疎水性基（群41～群43、群46および群49、図1c）、親水性基（群45および群47、図1c）、および標的ポリペプチドに対する特異的な親和性を示す基（群45、図1c）を結合することができる。

【0091】

本明細書中上記で述べられたように、本発明のこの局面の核酸分子はまた、その生物利用能を増大させるために修飾することができる。下記には、そのような修飾に対する非限定的な例が例示される。

【0092】

本発明のこの局面の核酸分子は、3'から5'へのホスホジエステル連結で結合したプリン塩基およびピリミジン塩基からなる複素環ヌクレオシドを含むことができる。

【0093】

好ましく使用される核酸分子は、本明細書中下記において概略的に記載されるように、骨格、ヌクレオシド間連結または塩基のいずれかにおいて修飾された核酸分子である。そのような修飾は、しばしば、オリゴヌクレオチドの取り込みおよび細胞内条件に対する抵抗性を促進させることができる。

【0094】

一連の合成化学を、NTPまたはホスホルアミダイト試薬のいずれかに変換することができるヌクレオシドの修飾のために利用することができる。さらなる詳細については、EatonおよびPieken (1995)、Annu. Rev. Biochem.、64:837～863を参照のこと。

【0095】

本発明のこの局面に従って有用である核酸分子の具体的な例には、修飾された骨格または非天然のヌクレオシド間連結を含有するオリゴヌクレオチドが含まれる。修飾された骨格を有するオリゴヌクレオチドには、米国特許第687808号、同第4469863号、同第4476301号、同第5023243号、同第5177196号、同第5188897号、同第5264423号、同第5276019号、同第5278302号、同第5286717号、同第5321131号、同第5399676号、同第5405939号、同第5453496号、同第5455233号、同第5466677号、同第5476925号、同第5519126号、同第5536821号、同第5541306号、同第5550111号、同第5563253号、同第5571799号、同第5587361号および同第5625050号に開示されるように、骨格内にリン原子を保持するものが含まれる。

【0096】

好ましい修飾された核酸骨格には、例えば、ホスホロチオアート、キラルなホスホロチオアート、ホスホロジチオアート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチルホスホナートおよび他のアルキルホスホナート（3'-アルキレンホスホナートおよびキラルなホスホナートを含む）、ホスフィナート、ホスホルアミダート（3'-アミノホスホルアミダートおよびアミノアルキルホスホルアミダートを含む）、チオノホスホルアミダート、チオノアルキルホスホナート、チオノアルキルホスホトリエステル、ならびに、通常3'-5'連結を有するボラノホスファート、これらの2'-5'連結したアナログ、ならびに、反転した極性を有するもの（この場合、ヌクレオシドユニットの隣接対は3'-5'から5'-3'に連結するか、または2'-5'から5'-2'に連結する）が含まれる。様々な塩、混合塩、および遊離酸形態もまた使用することができる。

【0097】

あるいは、リン原子をその中に含まない修飾された核酸骨格は、短鎖アルキルまたはシクロアルキルのヌクレオシド間連結、ヘテロ原子およびアルキルまたはシクロアルキルの

10

20

30

40

50

混合型ヌクレオシド間連結、あるいは、1つまたは複数の短鎖のヘテロ原子または複素環でのヌクレオシド間連結によって形成される骨格を有する。これらには、米国特許第5034506号、同第5166315号、同第5185444号、同第5214134号、同第5216141号、同第5235033号、同第5264562号、同第5264564号、同第5405938号、同第5434257号、同第5466677号、同第5470967号、同第5489677号、同第5541307号、同第5561225号、同第5596086号、同第5602240号、同第5610289号、同第5602240号、同第5608046号、同第5610289号、同第5618704号、同第5623070号、同第5663312号、同第5633360号、同第5677437号および同第5677439号に開示されるように、モルホリノ連結（これはヌクレオシドの糖部分から一部が形成される）；シロキサ骨格；スルフィド骨格、スルホキシド骨格およびスルホン骨格；ホルムアセチル骨格およびチオホルムアセチル骨格；メチレンホルムアセチル骨格およびメチレンチオホルムアセチル骨格；アルケン含有骨格；スルファマート骨格；メチレンイミン骨格およびメチレンヒドラジノ骨格；スルホナート骨格およびスルホンアミド骨格；アミド骨格；ならびに、N、O、SおよびCH₂の混合した構成要素部を有する他の骨格が含まれる。

10

【0098】

本発明に従って使用することができる他の核酸分子は、ヌクレオチドユニットの糖およびヌクレオシド間連結の両方（すなわち、骨格）において修飾された核酸分子であり、新規な基で置換される。塩基ユニットは、適切なポリヌクレオチド標的との相補のために保持される。そのような核酸配列模倣体に対する一例として、ペプチド核酸（PNA）が含まれる。PNAオリゴヌクレオチドは、糖-骨格がアミド含有骨格（特に、アミノエチルグリシン骨格）で置換されるオリゴヌクレオチドを示す。塩基は保持され、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接的または間接的に結合する。PNA化合物の調製を教示する米国特許には、限定されないが、米国特許第5539082号、同第5714331号および同第5719262号（これらのそれぞれが参考として本明細書中に組み込まれる）が含まれる。本発明において使用することができる他の骨格修飾が米国特許第6303374号に開示される。

20

【0099】

本発明の核酸分子はまた、塩基修飾または塩基置換を含むことができる。本明細書中で使用される「非修飾」または「天然」の塩基には、プリン塩基のアデニン（A）およびグアニン（G）、ならびにピリミジン塩基のチミン（T）、シトシン（C）およびウラシル（U）が含まれる。修飾塩基には、他の合成された塩基および天然の塩基が含まれ、例えば、5-メチルシトシン（5-me-C）、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサントシン、ヒポキサントシン、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチル誘導体および他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピル誘導体および他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミンおよび2-チオシトシン、5-ハロウラシルおよび5-ハロシトシン、5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシン、6-アゾウラシル、6-アゾシトシンおよび6-アゾチミン、5-ウラシル（プソイドウラシル）、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシルおよび他の8-置換されたアデニンおよびグアニン、5-ハロ（特に5-プロモ）、5-トリフルオロメチルおよび他の5-置換されたウラシルおよびシトシン、7-メチルグアニンおよび7-メチルアデニン、8-アザグアニンおよび8-アザアデニン、7-デアザグアニンおよび7-デアザアデニン、ならびに3-デアザグアニンおよび3-デアザアデニンなどが含まれる。さらなる塩基には、米国特許第3687808号に開示される塩基、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering（858頁～859頁、Kroschwitz, J. I. 編、John Wiley & Sons、1990）に開示される塩基、Englisch他（Angewandte Chemie, International Edition、1991、30、613）によって開示される塩基

30

40

50

、および、Sanghvi, Y. S. (第15章、Antisense Research and Applications、289頁~302頁、Crooke, S. T. およびLebleu, B. 編、CRC Press、1993)によって開示される塩基が含まれる。そのような塩基は、本発明のオリゴマー化合物の結合親和性を増大させるために特に有用である。これらには、5 - 置換ピリミジン、6 - アザピリミジン類、ならびに、N - 2置換、N - 6置換およびO - 6置換のプリン(2 - アミノプロピルアデニン、5 - プロピニルウラシルおよび5 - プロピニルシトシンを含む)が含まれる。5 - メチルシトシンの様々な置換は、核酸二重鎖安定性を0.6C~1.2C増大させることが示されており[Sanghvi YS他(1993)、Antisense Research and Applications、CRC Press、Boca Raton、276~278]、さらにより具体的には、2' - O - メトキシエチル糖修飾と組み合わせられたときには、現時点で好ましい塩基置換である。

10

【0100】

本発明の核酸分子の別の修飾では、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布または細胞取り込みを高める1つまたは複数の成分またはコンジュゲートをオリゴヌクレオチドに化学的に連結することが含まれる。そのような成分には、米国特許第6303374号に開示されるように、脂質成分、例えば、コレステロール成分、コール酸、チオエーテル(例えば、ヘキシル - S - トリチルチオール)、チオコレステロール、脂肪族鎖(例えば、ドデカンジオールまたはウンデシル残基)、リン脂質(例えば、ジヘキサデシル - rac - グリセロールまたはトリエチルアンモニウム1,2 - ジ - O - ヘキサデシル - rac - グリセロ - 3 - H - ホスホナート)、ポリアミン鎖またはポリエチレングリコール鎖、あるいはアダマンタン酢酸、パルミチル成分、あるいはオクタデシルアミン成分またはヘキシルアミノ - カルボニル - オキシコレステロール成分が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0101】

所与のオリゴヌクレオチド分子におけるすべての位置が均一に修飾されることは必ずしも必要でなく、実際、上記修飾の1つ以上を1つの化合物に取り込むことができ、またはオリゴヌクレオチド内の1つだけのヌクレオチドにおいてさえ取り込むことができる。

【0102】

下記の実施例の節において例示されるように、本発明者らは、結論として、本発明の核酸分子はインピトロおよびインピボで細胞のインフルエンザウイルス感染を防止することができることを示している。さらに、ウイルス抗原投与後のウイルスの拡大を阻害する本発明の核酸分子の能力は、抗インフルエンザ予防および抗インフルエンザ治療の適用における本発明の核酸分子の使用を示唆している。

30

【0103】

従って、本発明の別の局面によれば、インフルエンザウイルス感染を処置する方法が提供される。

【0104】

本明細書中で使用される用語「処置する」は、インフルエンザウイルス感染を妨げること、または、インフルエンザウイルス感染に関連する症状を実質的に減少(すなわち、軽減または低下)させることを示す。

40

【0105】

この方法は、その必要性のある対象に本明細書中上記で記載される本発明の核酸分子の治療効果的な量を与えることによって行われる。

【0106】

本明細書中で使用される「その必要性のある対象」は、インフルエンザウイルスに関連する症状に罹っている対象、または、インフルエンザに罹る危険性がある対象を示す。そのような対象の例には、65歳以上の人々; 心臓、肺もしくは腎臓の慢性的疾患、糖尿病、免疫抑制、または貧血の重篤な形態を有する人々、療養施設および長期養護施設の居住者、アスピリン治療を受けている、従って、インフルエンザに感染した後でライ症候群を発症することについて危険性を有し得る小児および十代、および、危険性が高い人との接

50

触が緊密であるか、または頻繁である人々が含まれるが、これらに限定されない。

【0107】

好ましくは、本発明の核酸分子は、 $0.1 \mu\text{g}/\text{Kg}$ 体重 $\sim 150 \mu\text{g}/\text{Kg}$ 体重（好ましくは $1 \mu\text{g}/\text{Kg}$ 体重 $\sim 100 \mu\text{g}/\text{Kg}$ 体重、より好ましくは $1 \mu\text{g}/\text{Kg}$ 体重 $\sim 50 \mu\text{g}/\text{Kg}$ 体重、さらにより好ましくは $1 \mu\text{g}/\text{Kg}$ 体重 $\sim 15 \mu\text{g}/\text{Kg}$ 体重）の間の濃度で与えられる。

【0108】

本発明の核酸分子（すなわち、有効成分）は、そのものとして、または、医薬的に許容され得るキャリアと混合される医薬組成物の一部として対象に与えることができる。

【0109】

本明細書中で使用される「医薬組成物」は、本明細書中に記載される有効成分の1つまたは複数と、他の化学的成分（例えば、生理学的に好適なキャリアおよび賦形剤など）との調製物を示す。医薬組成物の目的は、生物に対する化合物の投与を容易にすることである。

【0110】

本明細書中において、用語「有効成分」は、生物学的効果を説明することができる調製物を示す。

【0111】

本明細書中以降、表現「生理学的に許容され得るキャリア」および表現「医薬的に許容され得るキャリア」は、交換可能に使用され得るが、生物に対する著しい刺激を生じさせず、かつ、投与された化合物の生物学的な活性および性質を妨げないキャリアまたは希釈剤を示す。アジュバントはこれらの表現に包含される。

【0112】

アプタマーの活性はその分子量と直接的に相関するので、本発明の核酸分子を高分子量のキャリアにコンジュゲート化するための対策が取られる。そのような高分子量キャリアには、限定されないが、ポリアルキレングリコールおよびポリエチレングリコール（PEG）が含まれ、これらは、有機媒体および水性媒体の両方における広範囲の溶解性を有する生体適合性ポリマーである（Mutter 他（1979））。

【0113】

あるいは、マイクロ粒子、例えば、マイクロカプセルまたはカチオン性脂質などが、本発明のこの局面の医薬的に許容され得るキャリアとして役立ち得る。

【0114】

本明細書中で使用される場合、マイクロ粒子には、合成ポリマーおよび/または天然ポリマーから形成されるリポソーム、ピロソーム、ミクロスフィアおよびマイクロカプセルが含まれる。マイクロカプセルおよびミクロスフィアを作製するための様々な方法が当業者には知られており、これらには、溶媒蒸発、溶液流延、噴霧乾燥および溶媒伸長が含まれる。様々なマイクロ粒子に取り込むことができる有用なポリマーの例には、多糖、ポリ無水物、ポリオルトエステル、ポリヒドロキシド、ならびにタンパク質およびペプチドが含まれる。

【0115】

様々なリポソームを、Kim 他、*Biochim. Biophys. Acta*、728 : 339 ~ 348 (1983) ; Liu 他、*Biochim. Biophys. Acta*、1104 : 95 ~ 101 (1992) ; Lee 他、*Biochim. Biophys. Acta*、1103 : 185 ~ 197 (1992) ; Wang 他、*Biochem.*、28 : 9508 ~ 9514 (1989) によって報告される方法などのこの分野で広く知られている方法によって作製することができる。あるいは、本発明のこの局面の核酸分子はマイクロ粒子に取り込むことができ、または、マイクロ粒子の外側にイオンのもしくは共有結合的のいずれかで結合させることができる。

【0116】

カチオン性のリポソームまたはマイクロカプセルは、本発明のこの局面の核酸分子など

10

20

30

40

50

の負に荷電した化合物（これらのリポソームの正に荷電した外側表面にイオンの結合することができる）を送達するために特に有用なマイクロ粒子である。様々なカチオン性リポソームが、Felgner他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84：7413～7417（1987）；Felgner、Advanced Drug Delivery Reviews、5：163～187（1990）；Clarenc他、Anti-Cancer Drug Design、8：81～94（1993）によって報告されるように、核酸または核酸-タンパク質複合体をインビトロおよびインビボの両方で細胞に送達することにおいて非常に効果的であることが知られている。カチオン性のリポソームまたはマイクロカプセルは、その混合物から形成されるリポソームまたはマイクロカプセルが、負に荷電した化合物とイオンの結合する正味の正荷電を有するように、カチオン性側鎖基を十分な量で含有する1つまたは複数の脂質を含む混合物を使用して作製することができる。カチオン性リポソームを製造するために使用することができる正に荷電した脂質の例には、アミノ脂質のジオレイルホスファチジルエタノールアミン（PE）（これは正荷電の第一級アミノ頭部基を有する）、ホスファチジルコリン（PC）（これは、第一級アミンでない正荷電の頭部基を有する）、およびN[1-（2,3-ジオレイルオキシ）プロピル]-N,N,N-トリエチルアンモニウム（「DOTMA」、Felgner他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84：7413～7417（1987）；Felgner他、Nature、337：387～388（1989）；Felgner、Advanced Drug Delivery Reviews、5：163～187（1990）を参照のこと）が含まれる。

【0117】

上述の通り、本発明のこの局面の医薬組成物は賦形剤をさらに含んでもよい。本明細書中では、用語「賦形剤」は、化合物の投与をさらに容易にするために医薬組成物に添加される不活性な物質を示す。賦形剤の非限定的な例には、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖および様々なタイプのデンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油およびポリエチレングリコールが含まれる。

【0118】

薬剤の処方および投与技術は“Remington's Pharmaceutical Sciences”，Mack Publishing Co.，Easton，PAの最新版に見出すことができ、これは参照によってここに組み入れられる。

【0119】

好適な投与経路は例えば経口、経腸、経粘膜、特に経鼻、経小腸内または筋肉間、皮下および骨髄内注射を含む非経口送達、ならびに鞘内、直接心室内、静脈内、腹腔内、鼻内または腸内注射を含むことができる。

【0120】

代わりに、調製物は全身的な様式よりも、例えば患者の体の特定の領域中に調整物を直接注射することによって局所投与されることができる。

【0121】

本発明の医薬組成物は、この分野で十分に知られている方法によって、例えば、混合、溶解、造粒、糖衣錠作製、湿式粉碎、乳化、カプセル化、包括化または凍結乾燥の従来のプロセスによって製造することができる。

【0122】

従って、本発明に従って使用される医薬組成物は、薬学的に使用され得る調製物への活性な化合物の加工を容易にする賦形剤および補助剤を含む1つ以上の生理学的に受容可能なキャリアを使用して従来の様式で配合することができる。適切な配合は、選ばれる投与経路に依存する。

【0123】

注射の場合、本発明の化合物は、好ましくは、生理学的に適合し得る緩衝液（ハンクス溶液、リンゲル溶液または生理学的食塩水緩衝液など）における水溶液で配合することができる。経粘膜投与の場合、浸透させられるバリアに対して適切な浸透剤が配合において

使用される。そのような浸透剤は、この分野では広く知られている。

【0124】

経口投与の場合、化合物は、活性な化合物を、この分野で十分に知られている医薬的に受容可能なキャリアと組み合わせることによって容易に配合することができる。そのようなキャリアにより、本発明の化合物は、患者によって経口摂取される錠剤、ピル、糖衣錠、カプセル、液剤、ゲル、シロップ、スラリー剤、懸濁物などとして配合することが可能になる。経口使用される医薬調製物は、錠剤または糖衣錠コアを得るために、固体の賦形剤を使用し、得られた混合物を場合により粉碎し、そして所望する場合には好適な補助剤を添加した後、顆粒の混合物を加工して作製することができる。好適な賦形剤は、具体的には、ラクトース、スクロース、マンニトールまたはソルビトールを含む糖などの充填剤；セルロース調製物、例えば、トウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ナトリウムカルボメチルセルロースなど；および/またはポリビニルピロリドン（PVP）などの生理学的に受容可能なポリマーである。所望する場合には、架橋型ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくはその塩（アルギン酸ナトリウムなど）などの崩壊剤を加えることができる。

10

【0125】

糖衣錠コアには、好適なコーティングが施される。この目的のために、高濃度の糖溶液を使用することができ、この場合、糖溶液は、場合により、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、二酸化チタン、ラッカー溶液および好適な有機溶媒または溶媒混合物を含有し得る。色素または顔料が、活性な化合物の量を明らかにするために、または活性な化合物の量の種々の組合せを特徴づけるために、錠剤または糖衣錠コーティングに添加され得る。

20

【0126】

経口使用され得る医薬組成物には、ゼラチンから作製されたプッシュ・フィット型カプセル、ならびにゼラチンおよび可塑剤（グリセロールまたはソルビトールなど）から作製された軟密閉カプセルが含まれる。プッシュ・フィット型カプセルは、充填剤（ラクトースなど）、結合剤（デンプンなど）、滑剤（タルクまたはステアリン酸マグネシウムなど）および場合により安定化剤と混合された有効成分を含有し得る。軟カプセルでは、活性な化合物を好適な液体（脂肪油、流動パラフィンまたは液状のポリエチレングリコールなど）に溶解または懸濁させることができる。さらに、安定化剤を加えることができる。経口投与される配合物はすべて、選ばれた投与経路に好適な投薬形態でなければならない。

30

【0127】

口内投与の場合、組成物は、従来の様式で配合された錠剤またはトローチの形態を取ることができる。

【0128】

吸入による投与の場合、本発明に従って使用される化合物は、好適な噴射剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタンまたは二酸化炭素）の使用により加圧パックまたはネブライザーからのエアロゾルスプレー提示物の形態で都合よく送達される。加圧されたエアロゾルの場合、投薬量単位は、計量された量を送達するためのバルブを提供することによって決定され得る。吸入器または吹き入れ器で使用される、例えば、ゼラチン製のカプセルおよびカートリッジで、化合物と好適な粉末基剤（ラクトースまたはデンプンなど）との粉末混合物を含有するカプセルおよびカートリッジを配合することができる。

40

【0129】

ここで記述される調製物は非経口投与のために、例えばボラス注射又は連続注入のために処方されることができる。注射のための処方単位投薬形態、例えばアンプル又は多用量容器の形態で、所望により保存剤を添加された状態で提示されることができる。組成物は油性または水性媒体中の懸濁液またはエマルジョンであることができ、懸濁、安定化および/または分散剤の如き処方薬剤を含むことができる。

50

【0130】

非経口投与される医薬組成物には、水溶性形態における活性な調製物の水溶液が含まれる。さらに、活性な化合物の懸濁物を、適切なオイル状の注射用懸濁物として調製することができる。好適な親油性の溶媒またはビヒクルには、脂肪油（ゴマ油など）、または合成脂肪酸エステル（オレイン酸エチルなど）、トリグリセリドまたはリポソームが含まれる。水性の注射用懸濁物は、懸濁物の粘度を増大させる物質、例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトールまたはデキストランなどを含有し得る。場合により、懸濁物はまた、高濃度の溶液の調製を可能にするために化合物の溶解性を増大させる好適な安定化剤または薬剤を含有し得る。

【0131】

あるいは、有効成分は、使用前に好適なビヒクル（例えば、滅菌されたパイロジェン非含有水）を用いて構成される粉末形態にすることができる。

10

【0132】

本発明の化合物はまた、例えば、カカオバターまたは他のグリセリドなどの従来坐薬基剤を使用して、坐薬または停留浣腸剤などの直腸用組成物で配合することができる。

【0133】

本発明に関連して使用される好適な医薬組成物には、意図された目的を達成するために効果的な量で有効成分が含有される組成物が含まれる。より詳細には、治療効果的な量は、疾患の症状を防止もしくは緩和もしくは改善するために、または処置されている患者の生存を延ばすために効果的な抗酸化性調製物の量を意味する。

20

【0134】

治療効果的な量の決定は、特に本明細書中に示される詳細な開示を考慮に入れて十分に当業者の能力の範囲内である。

【0135】

本発明の方法で用いられるいかなる調製物についても治療効果的な量又は用量はインビトロでのアッセイから最初に推定されることができる。例えば、用量は動物モデルで処方されることができ、かかる情報はヒトにおける有用な用量を一層正確に決定するために用いられることができる。

【0136】

本明細書中に記載される化合物の毒性および治療効力は、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手法によって、例えば、対象とする化合物について IC_{50} および LD_{50} （試験動物の50%に死をもたらす致死量）を測定することによって明らかにすることができる。これらの細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトにおける使用に対する投薬量範囲を決定するために使用することができる。投薬量は、用いられる投薬形態および利用される投与経路に依存して変化し得る。正確な配合、投与経路および投薬量は、患者の状態を考慮して個々の医師によって選ぶことができる。例えば、(54)を参照のこと。

30

【0137】

処置される状態の重篤度および応答性に依存して、投薬はまた、徐放性組成物の単回投与で行うことができ、この場合、処置期間は、数日から数週間まで、または治療が達成されるまで、または疾患状態の軽減が達成されるまで続く。

40

【0138】

投与される組成物の量は、当然のことではあるが、処置されている患者、苦痛の重篤度、投与様式、処方医の判断などに依存する。

【0139】

適合し得る薬学的キャリアに配合された本発明の調製物を含む組成物はまた、適用される状態の処置のために、調製され、適切な容器に入れられ、表示され得る。

【0140】

本発明の医薬組成物は、所望される場合には、有効成分を含有する1つ以上の単位投薬形態物を含むし得るパックまたはディスペンサーデバイス（例えば、FDA承認キットな

50

ど)で提供され得る。パックは、例えば、金属箔またはプラスチック箔を含むことができ、例えば、プリスターパックなどである。パックまたはディスペンサーデバイスには、投与のための説明書が添付され得る。パックまたはディスペンサーにはまた、医薬品の製造、使用または販売を規制する政府当局により定められた形式で容器に付けられた通知が伴い得る。この場合、そのような通知は、組成物の形態またはヒトもしくは動物への投与の当局による承認を反映する。そのような通知は、例えば、処方薬物についての米国食品医薬品局により承認されたラベル書きであり得るか、または承認された製品添付文書であり得る。

【0141】

本発明の核酸分子はまた、本明細書中上記で記載された任意の好適な投与様式を用いて個々の対象に投与された核酸構築物から発現させることができることが理解される。あるいは、核酸構築物は、適切な送達ビヒクル/方法(トランスフェクションおよび形質導入など)および必要に応じた発現システムによって好適な細胞に導入され、その後、改変された細胞が培養で拡大培養され、個体に戻される。

【0142】

本発明のRNA核酸分子の細胞発現を可能にするために、本発明の核酸構築物はさらに、少なくとも1つのシス作用調節エレメントを含む。本明細書中で使用される表現「シス作用調節エレメント」は、トランス作用の調節因子と結合し、その下流に存在するコード配列の転写を調節するポリヌクレオチド配列(好ましくはプロモーター)を示す。

【0143】

任意の利用可能なプロモーターを本方法論によって使用することができる。アプタマー発現ベクターにおいて使用される好ましいプロモーターには、polIIIプロモーター、例えば、ヒトの小核U6遺伝子プロモーターおよびtRNA遺伝子プロモーターなどが含まれる。短いRNA分子をインピボで産生させるためのU6遺伝子転写シグナルの使用がNoonberg他、Nucleic Acids Res.、22:2830~2836(1994)によって記載され、tRNA転写シグナルの使用がThompson他、Nucleic Acids Res.、23:2259~2268(1995)によって記載される。

【0144】

多くのpolIIIプロモーターは内在的であり、polIII転写物がプロモーター配列を含むように転写ユニットの内部に配置されることが理解される。アプタマー分子を発現させるために有用であるためには、これらのプロモーター配列はアプタマーの構造または機能を妨害してはならない。従って、好ましいRNA polIII RNAプロモーターは、内在的でないU6遺伝子プロモーターである[KunkelおよびPeder son、Nucleic Acids Res.、17:7371~7379(1989); Kunkel他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、83:8575~8579(1986); Reddy他、J. Biol. Chem.、262:75~81(1987)]。アプタマー分子を発現させるために有用である好適なpolIIIプロモーターシステムが、Hall他、Cell、29:3~5(1982); Nielsen他、Nucleic Acids Res.、21:3631~3636(1993); FowlkesおよびShenk、Cell、22:405~413(1980); GuptaおよびReddy、Nucleic Acids Res.、19:2073~2075(1991); Kichhofer他、J. Biol. Chem.、268:7868~7873(1993); RomeroおよびBlackburn、Cell、67:343~353(1991)によって記載される。RNA分子を発現させるためのpolIIIプロモーターの使用はまた、Ribozyme Pharmaceuticals, Inc.によって国際特許出願公開WO95/23225に記載される。

【0145】

本発明のアプタマーを発現させるために有用な他のプロモーターには、例えば、ウイルス(例えば、ポリオーマ、シミアンウイルス40(SV40)、アデノウイルス、レトロ

10

20

30

40

50

ウイルス、B型肝炎ウイルス、および最も好ましくはサイトメガロウイルス)のゲノム、または異種哺乳動物プロモーターに由来するもの(例えば、ベータアクチンプロモーター)が含まれる。SV40ウイルスの初期プロモーターおよび後期プロモーターを、SV40のウイルス複製起点をも含有するSV40制限フラグメントとして得ることができる[Fiers他、Nature、273:113(1978)]。ヒトサイトメガロウイルスの即時初期プロモーターをHindIII制限フラグメントとして得ることができる(Greenway, P. J. 他、Gene、18:355~360(1982))。宿主細胞または近縁種に由来するプロモーターもまた使用できることが理解される。

【0146】

本発明の方法の構築物は好ましくはさらに、適切な選択マーカールおよび/または複製起点を含む。好ましくは、利用される構築物はシャトルベクターであり、これは大腸菌において増殖することができ(この場合、構築物は適切な選択マーカールおよび複製起点を含む)、かつ、細胞内での増殖または選ばれた組織における組み込みのために適合し得る。本発明による構築物は、例えば、プラスミド、バクミド、ファージミド、コスミド、ファージ、ウイルスまたは人工染色体であり得る。

【0147】

現在好ましいインビボ核酸移入技術には、ウイルス構築物または非ウイルス構築物(例えば、アデノウイルス、レンチウイルス、I型単純ヘルペスウイルスまたはアデノ関連ウイルス(AAV)、および脂質に基づくシステムなど)を用いたトランスフェクションが含まれる。脂質媒介移入のための有用な脂質が、Lasic D.、Liposomes: From Physics to Applications、Elsevier: Amsterdam、1993によって記載される。

【0148】

好ましくは、カチオン性脂質が、本明細書中上記で記載されるように、等モル量での中性脂質との組合せで使用される。トランスフェクション複合体における有用な中性脂質には、例えば、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)(Hui他、Biophys. J.、(71)590~599(1996));コレステロール(Liu他、Nat. Biotech.、15:167~173(1997))が含まれる。

【0149】

典型的には、脂質混合物はクロロホルム中で調製され、乾燥され、そして、例えば、5%デキストロス水溶液または生理学的緩衝液において再水和され、リポソームを形成させる。得られるリポソームは一定の攪拌とともに核酸溶液と混合されて、カチオン性脂質-核酸のトランスフェクション複合体を形成させる。静脈内投与のための好ましいトランスフェクション複合体サイズは50nm~5000nmであり、最も好ましくは100nm~400nmである。

【0150】

DNA/脂質複合体は好ましくは、約0.625mg/mlのDNA濃度で調製され得ることが理解される。送達用量は体重1グラムあたり約10.μg~約2mgである。反復用量を約2日~約2ヶ月の間隔で送達することができる。

【0151】

現在知られている実施形態によるインビボ使用のための最も好ましい構築物はウイルス(最も好ましくは、アデノウイルス、AAV、レンチウイルスまたはレトロウイルス)である。ウイルス構築物(例えば、レトロウイルス構築物など)は、少なくとも1つの転写プロモーター/エンハンサーまたは遺伝子座規定エレメント、あるいは、遺伝子発現を他の手段(例えば、選択的スプライシング、核RNA輸出、またはメッセンジャーの翻訳後修飾など)によって制御する他のエレメントを含む。そのようなベクター構築物はまた、ウイルス構築物に既に存在しない限り、パッキングシグナル、長末端反復(LTR)またはその一部、ならびに、使用されるウイルスに対して適切なプラス鎖プライマー結合部位およびマイナス鎖プライマー結合部位を含む。加えて、そのような構築物は、典型的には、ペプチドまたは抗体を、構築物が置かれる宿主細胞から分泌させるためのシグナル配列

を含む。好ましくは、この目的のためのシグナル配列は哺乳動物のシグナル配列である。場合により、構築物はまた、ポリアデニル化を行わせるシグナル、ならびに、1つまたは複数の制限部位、および翻訳終結配列を含むことができる。例として、そのような構築物は、典型的には、5'LTR、tRNA結合部位、パッキングシグナル、第2鎖DNA合成の起点、および3'LTRまたはその一部を含む。

【0152】

インビボ核酸送達プロトコルのための好ましい様式が下記に示される：SomiaおよびVerma(2000)、Nature Reviews、1:91~99；Isner(2002)、心筋遺伝子治療、Nature、415:234~239；High(2001)、遺伝子治療：2001年の展望、Haemophilia、7:23~27；HammondおよびMcKirnan(2001)、心臓疾患のための血管形成遺伝子治療：動物研究および臨床試験の再検討、49:561~567。

10

【0153】

本発明の核酸分子を与える前に、または本発明の核酸分子を与えるのと同時に、または本発明の核酸分子を与えた後、薬剤を対象に与えることができる。

【0154】

薬剤は、インフルエンザ感染またはインフルエンザ感染に関する臨床的状態(例えば、肺炎など)の防止または処置を容易にする分子であり得る。薬剤の例には、本発明のこの局面によれば、免疫調節剤(例えば、抗体)、抗生物質、抗ウイルス剤(例えば、アマンタジン)、アンチセンス分子およびリボザイムなどが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0155】

本発明の核酸分子の抗体様の性質(すなわち、ポリペプチド標的に対する特異的な結合)は、本明細書中上記で記載された薬剤が、投与された核酸分子または核酸分子を含有する脂質キャリアに結合しているとき、感染性組織に特異的に標的化されることを可能にする。

【0156】

例えば、インフルエンザウイルスのポリペプチド(背景の節においてさらに記載されている)に向けられたアンチセンス分子は、本発明のアプタマー配列を使用して標的化することができる。「キメラ」なアンチセンス分子は、それぞれが少なくとも1つのヌクレオチドから構成される2つ以上の化学的に異なる領域を含有するオリゴヌクレオチドである。これらのオリゴヌクレオチドは、典型的には、ヌクレアーゼ分解に対するオリゴヌクレオチドの増大した抵抗性、増大した細胞取り込み、および/または、標的ポリヌクレオチドに対する増大した結合親和性を付与するようにオリゴヌクレオチドが改変される少なくとも1つの領域を含有する。オリゴヌクレオチドのさらなる領域は、RNA:DNAハイブリッドまたはRNA:RNAハイブリッドを切断することができる酵素に対する基質として役立つ。そのような酵素の一例として、RNaseH(これは、RNA:DNA二重鎖のRNA鎖を切断する細胞エンドヌクレアーゼである)が挙げられる。従って、RNaseHの活性化はRNA標的の切断をもたらし、それにより、遺伝子発現のオリゴヌクレオチド阻害の効率を大きく高める。その結果、同じ標的領域にハイブリダイゼーションするホスホロチオアートデオキシオリゴヌクレオチドと比較して、多くの場合、匹敵する結果を、キメラなオリゴヌクレオチドが使用されたとき、より短いオリゴヌクレオチドを用いて得ることができる。RNA標的の切断は、ゲル電気泳動、および、必要ならば、この分野で知られている会合核酸ハイブリダイゼーション技術によって日常的に検出することができる。

30

40

【0157】

本発明のキメラなアンチセンス分子は、上記で記載されるように、2つ以上のオリゴヌクレオチド(修飾オリゴヌクレオチド)の複合構造として形成され得る。そのようなハイブリッド構造の調製を教示する代表的な米国特許には、限定されないが、米国特許第5013830号、同第5149797号、同第5220007号、同第5256775号、

50

同第5366878号、同第5403711号、同第5491133号、同第5565350号、同第5623065号、同第5652355号、同第5652356号および同第5700922号（これらはそれぞれが参考として本明細書中に全体が組み込まれる）が含まれる。

【0158】

あるいは、リボザイム配列を、本発明の核酸分子を使用して標的化することができる。リボザイムは、mRNAの切断による遺伝子発現の配列特異的な阻害のためにますます使用されている。数個のリボザイム配列を本発明のオリゴヌクレオチドに融合することができる。これらの配列には、血管形成経路における重要な成分であるVEGF-R（血管内皮増殖因子受容体）の形成を特異的に阻害するANGIOZYME、およびHEPTAZYME（C型肝炎ウイルス（HCV）RNAを選択的に破壊するために設計されたリボザイム）（Ribozyme Pharmaceuticals, Incorporated - WEBホームページ）が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0159】

場合により、「DNAザイム」を、本発明の方法を使用して標的化することができる [Breaker, R. R. および Joyce, G., Chemistry and Biology (1995), 2: 655; Santoro, S. W. & Joyce, G. F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 943: 4262]。DNAザイムは一本鎖であり、両方のRNAを切断する。DNAザイムに対する一般的なモデル（「10-23」モデル）が提案されている。「10-23」DNAザイムは、それぞれが7個～9個のデオキシリボヌクレオチドからなる2つの基質認識ドメインによって挟まれた15デオキシリボヌクレオチドの触媒ドメインを有する。このタイプのDNAザイムはその基質RNAをプリン：ピリミジン接合部において効果的に切断することができる (Santoro, S. W. & Joyce, G. F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 199; DNAザイムの総説については、Khachigian, LM, Curr Opin Mol Ther, 2002, 4: 119~21を参照のこと)。

20

【0160】

一本鎖および二本鎖の標的切断部位を認識する操作された合成DNAザイムの構築および増幅の様々な例が米国特許第6326174号（Joyce他）に開示されている。ヒトウロキナーゼ受容体に対して向けられた類似する設計のDNAザイムが最近、ウロキナーゼ受容体の発現を阻害し、また、結腸ガン細胞の転移をインビボで首尾よく阻害することが観測された (Itohe他、20002、アブストラクト409、Ann Meeting Am Soc Gen Ther, www.asgt.org)。別の適用において、bcr-ablガン遺伝子に対して相補的なDNAザイムは、白血病細胞におけるガン遺伝子の発現を阻害し、そして、CMLおよびALLの場合において自家骨髄移植における再発率を低下させることに成功した。

30

【0161】

核酸-脂質カップリングの様々な方法がこの分野では広く知られており、米国特許第5756291号に記載される。

40

【0162】

例えば、Asseline, U. 他 [Proc Natl Acad Sci, 81, 3297~3301 (1984)] は、3'-リン酸基を介したポリメチレンリンカーによるインターカレート剤の共有結合的結合を記載する。Mori, K. 他 (FEBS Letters, 249, 213~218 (1989)) は、オリゴヌクレオチドの5'末端におけるメチレンリンカーによる様々な基の共有結合的結合を記載する。PCT国際特許出願公開WO89/05853 (1989年6月29日公開; その開示全体は本明細書により参考として組み込まれる) には、ヌクレオチド配列とキレート化剤とのコンジュゲートを形成させるための様々な方法が記載され、この場合、キレート化剤は、共有結合による結合または多価官能基由来の結合ユニットのいずれかによってヌクレオチド配列に結

50

合される。

【0163】

従って、本発明のアプタマーまたは修飾アプタマーは単独で治療的適用において使用することができ、あるいは、薬剤を標的化して、医薬品またはトキシンを所望する標的に送達するために使用することができる。

【0164】

インフルエンザウイルスのポリペプチドと特異的に結合する本発明の核酸分子の能力は診断的適用におけるその使用を可能にする。

【0165】

今日まで、数多くの検査をA型インフルエンザおよびB型インフルエンザの診断のために利用することができる。生物学的サンプルにおけるインフルエンザウイルスを同定するための従来の方法では、細胞を培養することが伴い、それにより、ウイルス感染の非常に高感度かつ特異的な検出をもたらしている。しかしながら、この方法は、細胞培養のために要求される時間によって著しく制限され、インフルエンザウイルスの同定は2日～10日に及ぶことがあり、従って、医師を適切な治療に導くことにおいて効果的になっていない。インフルエンザウイルス感染は通常、自己に限定されるので、治療が効果的となるならば、診断は迅速でなければならない。従って、細胞培養法は、遡及的疫学的情報を提供するためにだけ使用される。

10

【0166】

他のインフルエンザ診断方法では、モノクローナル免疫蛍光アッセイ [Spada, B. 他、J. Virol. Methods、(1991) 33: 305] および酵素結合免疫アッセイ [EIA、Ryan-Poirier, K. A. 他、J. Clin. Microbiol.、(1992) 30: 1072] の使用が含まれる。しかしながら、これらの方法は、A型インフルエンザウイルスの感染の同定に限定されるだけでなく、相当の技術的専門知識を要求し、また、高レベルの偽陽性をもたらしている。

20

【0167】

従って、本発明のなお別の局面によれば、生物学的サンプルにおけるインフルエンザウイルスを同定する方法が提供される。

【0168】

本明細書中で使用される場合、生物学的サンプルは、血液、脊髄液、胸膜液、呼吸器液および鼻腔吸引物などの任意の身体サンプルを示す。体液を脊椎動物から得る様々な方法がこの分野で広く知られている。例えば、鼻腔洗浄物を、Henrickson、J. Virol. Methods、46: 189～206、1994、またはHallおよびDouglas、J. Infect. Dis.、131: 1～5、1975に記載されるように得ることができる。

30

【0169】

この方法は、生物学的サンプルを、本明細書中上記に記載される、インフルエンザウイルスのポリペプチドと特異的に結合することができるポリヌクレオチド配列を含む核酸分子と接触させることによって行われる。

【0170】

本発明の核酸分子は、例えば、本明細書中下記に記載されるように、固体の基質に結合させることができる。

40

【0171】

接触させることは、ポリペプチド-核酸分子の二重鎖の形成を可能にする条件のもとで行われる。

【0172】

二重鎖は、好ましくは、何らかの非特異的に結合したポリペプチドを除くために洗浄され、これにより、複合体内において特異的に結合したそのような核酸分子のみを検出することが可能になる。

【0173】

50

生物学的サンプルにおける、ポリペプチドと結合した核酸分子が検出され、それにより、インフルエンザ感染が同定される。

【0174】

一般に、ポリペプチド - 核酸分子複合体のモニターリングはこの分野で広く知られており、本明細書中上記に記載されるように行うことができる。これらの方法は、一般には、例えば、本明細書中下記に記載されるように、標識またはマーカーを検出することに基づく。

【0175】

好ましくは、感染サンプルの検出は、インフルエンザウイルスに感染していない正常なサンプルとの比較によって行われる。

【0176】

本発明の核酸分子を作製するために、影響を受けにくい選択法が好ましくは用いられる。

【0177】

従って、本発明のさらなる局面によれば、細胞のインフルエンザウイルス感染を阻害することができる核酸分子を得る方法が提供される。

【0178】

この方法は下記のように行われる。

【0179】

最初に、複数の核酸分子が、本明細書中上記に記載されたように細胞のインフルエンザウイルス感染に関係するポリペプチド標的と接触させられる。

【0180】

二重鎖形成（すなわち、ポリペプチド標的と核酸分子との間での非ワトソン・クリック相補）の後、ポリペプチドと特異的に結合することができる、複数の核酸分子のうち少なくとも1つの核酸分子が同定される。

【0181】

最後に、ポリペプチドと結合した核酸分子が単離され、それにより、インフルエンザウイルス感染を阻害することができる分子を得る。

【0182】

二本鎖DNA分子は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）のプライマー結合のために使用することができる2つの規定されたヌクレオチド配列によって挟まれたランダム化ポリヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチド配列のライブラリーから得ることができる。ライブラリーは、二本鎖のPCR生成物を生じさせるために増幅される [Bielinska (1990), Science, 250 (4983): 997 ~ 1000]。ランダム化配列は完全にランダム化され得る（すなわち、任意の位置において塩基を見出す確率が1:4である）か、または、部分的にランダム化され得る（任意の位置において塩基を見出す確率が0 ~ 100%の間の任意のレベルで選択される）。

【0183】

一本鎖アプタマーを調製する場合、下流側のプライマーが5'末端においてビオチン化され、PCR生成物がアビジンアガロースカラムに加えられる。一本鎖DNA配列が、弱塩基性緩衝液による溶出によって回収される。

【0184】

一本鎖RNA分子を、T7バクテリオファージのポリメラーゼプロモーター部位を含有する二本鎖PCR生成物を生じさせるために増幅されるオリゴヌクレオチド配列ライブラリーから得ることができる。その後、RNA分子を、T7RNAポリメラーゼを使用するインビトロ転写によって作製することができる。

【0185】

本発明のこの局面の核酸分子は、天然に存在する核酸またはそのフラグメント、化学合成された核酸、酵素合成された核酸、あるいは前記技術の組合せによって作製された核酸分子から作製することができる。

10

20

30

40

50

【0186】

本発明のこの局面のライブラリーは、本明細書中上記で記載される選択された核酸修飾の構造的適用範囲および化学的適用範囲を提供するために十分に大きく作製される。

【0187】

典型的には、本発明のこの局面によるランダム化核酸配列ライブラリーは少なくとも 10^{14} 個の配列変化体を含む。

【0188】

核酸修飾を標的ポリペプチドとのインキュベーションの前に行うことができる。この場合、スクリーニングは最終的な修飾アプタマーに対して行われるが、修飾は、スクリーニング中に行われる、酵素プロセス（例えば、転写）などの何らかのプロセスを妨害しないように制限される。 10

【0189】

あるいは、核酸分子は選択（すなわち、ポリペプチドと結合した核酸分子の単離）の後に修飾することができる。従って、広範囲の官能基を同時に使用することができる。この場合、エレクトロスプレーイオン化質量分析法（ESI-MS）を、正確な官能基を解明するために使用することができる [Pomerantz (1996)、Anal. Chem.、68:1989~1999]。

【0190】

いずれの場合でも、核酸分子が得られると、核酸分子は、本明細書中上記で述べられたように、ポリペプチド標的と接触させられる。 20

【0191】

核酸分子と本発明のこの局面の標的ポリペプチドとのインキュベーションは、好ましくは、生理学的な条件のもとで行われる。本明細書中で使用される表現「生理学的な条件」は水溶液における塩濃度およびイオン強度を示し、これらは、インフルエンザウイルスが感染し得る脊椎動物対象の代謝において見出される流体（生理学的緩衝液または生理学的生理的食塩水とも呼ばれる）を特徴づける。例えば、ヒト対象における生理学的流体は、7.1の細胞内pH、および、細胞内塩濃度（mM単位）が3~15のナトリウム；140のカリウム；6.3のマグネシウム； 10^{-4} のカルシウム；3~15の塩化物、ならびに7.4の細胞外pH、および、細胞外塩濃度（mM単位）が145のナトリウム；3のカリウム；1~2のマグネシウム；1~2のカルシウム、そして110の塩化物によって表される。 30

【0192】

核酸分子は、溶液中または固体基質に結合したときのいずれでも、標的ポリペプチドとインキュベーションすることができる。

【0193】

上記の塩基修飾体のいくつかは、核酸分子を固体基質に結合するための中間体として使用できることが理解される。例えば、図1cの群48に示される修飾ウリジンは、固相合成において使用されるホスホルアミダイト試薬としての活性化の前に、イミダゾールを広範囲の疎水性基、親水性基、荷電基および架橋基で置換することによってさらに修飾することができる一般的な中間体として役立つ。 40

【0194】

核酸分子を固体基質に結合するための様々な方法がこの分野で知られており、これらには、ガラス印刷（これは、Schena他、1995、Science、270:467~47によって一般的に記載される）、フォトリソグラフィ技術 [Fodor他 (1991)、Science、251:767~773]、インクジェット印刷およびマスクングなどが含まれるが、これらに限定されない。

【0195】

典型的には、コントロールサンプルが、固体支持体および/または非標的エピトープなどの標的以外の物質に結合する核酸分子を選択しないために含まれる。

【0196】

結合していない核酸分子の分離、および結合した核酸配列の同定は、この分野で広く知られている方法を使用して行うことができる。例として、特に限定されないが、選択的溶出、ろ過および電気泳動などを含む（米国特許第5756291号を参照のこと）。

【0197】

あるいは、結合したアプタマー分子を画像化によって同定することができる。例えば、明視野、エピ蛍光または共焦点法を使用する光学顕微鏡観察、または走査プローブ顕微鏡観察を、ポリペプチドと結合した核酸分子を同定するために使用することができる（米国特許第6287765号を参照のこと）。可視化を容易にするために、核酸分子またはポリペプチドは、好ましくは、この分野において標準的に使用される任意の放射性、蛍光性、生物学的または酵素的なタグまたは標識を使用して標識される。

10

【0198】

下記には、本発明における使用のために好適な多数の標識化方法が例示される。例えば、本発明の核酸分子は、合成後、ピオチン化dNTPもしくはピオチン化rNTPを取り込むことまたはいくつかの類似する手段（例えば、ピオチンのプソラレン誘導体をRNAに光架橋すること）、その後、標識されたストレプトアビジン（例えば、フィコエリトリンにコンジュゲート化されたストレプトアビジン）または同等物を加えることによって標識することができる。あるいは、蛍光成分が使用される。これには、フルオレセイン、リサミン、フィコエリトリン、ローダミン（Perkin Elmer Cetus）、Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、FluorX（Amersham）およびその他〔例えば、Kricka他（1992）、Academic Press、San Diego、Calif〕が含まれる。あるいは、放射性標識が使用される〔Zhao他（1995）、Gene、156：207〕。しかしながら、放射性粒子の散乱、および、その結果としての、広く離れた結合部位のための要求のために、放射性同位体よりも、蛍光団の使用がより好まれる。

20

【0199】

本明細書中上記に記載される検出方法のいずれかにおける生じたシグナルの強度が、手作業により、または、そのような目的のために適するソフトウェアアプリケーションおよびハードウェアを使用して分析され得ることが理解される。

【0200】

アプタマー配列（すなわち、ポリペプチドと結合した核酸）の単離は、典型的には、PCRなどによる配列増幅を伴う。増幅を、標的ポリペプチドから分離する前に、または、標的ポリペプチドから分離すると同時に、または標的ポリペプチドから分離した後に行うことができる。PCR法はこの分野では広く知られており、例えば、米国特許第4683195号および同第4683202号および同第4800159号、ならびに、Methods in Enzymology（1987）、155：335～350に記載される。RNA分子が使用される場合、増幅されたDNA配列がRNAに転写されることが理解される。

30

【0201】

他の増幅方法を用いることができ、これには、標準的なクローニングおよびリガーゼ連鎖反応などが含まれる（米国特許第4957858号を参照のこと）。例えば、アプタマーが同定されると、リンカーを、標準的なベクターへのクローニングを容易にするために両端に結合することができる。一本鎖アプタマーまたは二本鎖アプタマーをクローン化し、回収することができる。

40

【0202】

回収された核酸分子は、元の一本鎖形態または二重鎖形態であっても、その後、選択および増幅（すなわち、標的ポリペプチド結合）の繰り返される処理のために使用することができる。典型的には、3回～6回の選択／増幅の後、nM～Mの範囲の好ましい親和性で結合する核酸分子を得ることができる。

【0203】

ポリペプチド標的と特異的に結合することができる核酸分子を同定するための様々な方

50

法がこの分野では知られていることが理解される [例えば、米国特許第5270163号 ; E l l i n g t o n および S z o s t a k (1 9 9 0)、N a t u r e、3 4 6 : 8 1 8 ~ 8 2 2 ; B o c k 他 (1 9 9 2)、N a t u r e、2 5 5 : 5 6 4 ~ 5 6 6 ; W a n g 他 (1 9 9 3)、B i o c h e m i s t r y、3 2 : 1 8 9 9 ~ 1 9 0 4 ; B i e l i n s k a 他 (1 9 9 0)、S c i e n c e、2 5 0 : 9 9 7 ~ 1 0 0 0]。例えば、米国特許第5270163号には、下記のように核酸リガンドを同定するための S E L E X (S y s t e m a t i c E v o l u t i o n o f L i g a n d s b y E x p o n e n t i a l E n r i c h m e n t : 指数的濃縮によるリガンドの系統的進化) と呼ばれる方法が開示される。ランダム化配列の領域を有する一本鎖核酸の候補混合物が標的化合物と接触させられ、標的に対する増大した親和性を有するそのような核酸が候補混合物の残りから分配される。分配された核酸は、リガンド濃縮された混合物を得るために増幅される。B o c k および共同研究者は、支持体に結合した標的分子と、ランダム配列、および P C R のためのプライマーとして役立ち得る配列を含有するオリゴヌクレオチドの混合物との複合体化を伴う、標的生体分子と特異的に結合するオリゴマー配列を同定するための方法を記載する [B o c k 他 (1 9 9 2)、N a t u r e、2 5 5 : 5 6 4 ~ 5 6 6]。その後、標的 - オリゴヌクレオチド複合体が支持体および複合体を形成していないオリゴヌクレオチドから分離され、複合体を形成したオリゴヌクレオチドが回収され、続いて P C R を使用して増幅される。回収されたオリゴヌクレオチドは配列決定することができ、また、複合体化を使用する選択、分離、増幅および回収の一連の処理に供することができる。

10

20

【0204】

あるいは、本発明の核酸配列は合理的薬物設計によって作製することができる。

【0205】

合理的薬物設計は、酵素阻害剤を同定する強力な手段であり、これは、例えば、ヒト免疫不全症ウイルス (H I V) により引き起こされるヒト後天性免疫不全症候群 (A I D S)、およびヒトガン (慢性骨髄性白血病) に対する最初の効果的な薬理的治療を提供するためにそれぞれ使用される H I V プロテアーゼ阻害剤 (L a m 他、1 9 9 4、S c i e n c e、2 6 3、3 8 0 ; W l o d a w e r 他、1 9 9 3、A n n R e v B i o c h e m .、6 2、5 4 3 ; A p p l e t、1 9 9 3、P e r s p e c t i v e s i n D r u g D i s c o v e r y a n d D e s i g n、1、2 3 ; E r i c k s o n、1 9 9 3、P e r s p e c t i v e s i n D r u g D i s c o v e r y a n d D e s i g n、1、1 0 9) および b c r - a b l チロシンキナーゼ阻害剤 (M a u r o M J 他、2 0 0 2、J C l i n O n c o l .、2 0、3 2 5 ~ 3 4) を同定するためにとりわけ使用されている。

30

【0206】

核酸配列構造データベース (「 3 D データベース」) をスクリーニングすることによって合理的薬物設計による推定的なアプタマー配列を同定するために、「スキャナー」型のアルゴリズムを用いるソフトウェアでは、インフルエンザの血球凝集素ポリペプチドのシアル酸受容体結合ポケット (G e n B a n k アクセション番号 A F 0 9 2 0 6 2 のアミノ酸位置 1 1 6 ~ 2 6 1) などの分子の結合ポケットの三次元構造を規定する原子の座標、および、アプタマー構造との結合ポケットの結合を適格化するように、結合ポケットとのスクリーニングされたアプタマー構造の「ドッキング」をコンピューターモデル化するためにデータベースに蓄えられている核酸配列構造の三次元構造を規定する原子の座標が用いられる。従って、このプロセスを、データベースに蓄えられている複数の仮想的なアプタマー構造のそれぞれを用いて繰り返すことにより、結合ポケットとの所望する結合相互作用を潜在的に有する化学構造、従って、仮想的な阻害剤を同定するために、そのような複数のものをコンピューターによりスクリーニングすることが可能になる。

40

【0207】

本発明の核酸分子を同定するための核酸構造データベースの例には、RNA 構造データベース (w w w . R N A B a s e . o r g) および N D B データベース (h t t p : / /

50

/www.imb-jena.de/RNA.html#Databases)が含まれる。

【0208】

あるいは、精緻化されたアプタマー配列を、精緻化されたアプタマーをコンピューターにより組み立てるために、結合ポケットの三次元構造および基本アプタマー（例えば、A22）の三次元構造を規定する1組の原子座標を利用する「ビルダー」型のアルゴリズムを含むソフトウェアを使用して既知のアプタマー構造（例えば、A22、配列番号12）を改変することによって解明することができる。そのような「スキャナー」型アルゴリズムおよび「ビルダー」型アルゴリズムを用いるソフトウェアによる合理的薬物設計を行うための十分な指針をこの分野の文献において得ることができ（例えば、Halperin I. 他、2002、Proteins、47、409~43；Gohlke H. および Klebe G.、2001、Curr Opin Struct Biol.、11、231~5；Zeng J.、2000、Comb Chem High Throughput Screen.、3、355~62；RACHEL: Theory of drug design、http://www.newdrugdesign.com/Rachel_Theory.htm#Softwareを参照のこと）、さらに詳しくは本明細書中下記に記載される。

10

【0209】

スクリーニングされたアプタマー構造の結合ポケットとの結合を適格化するために合理的薬物設計において使用されるソフトウェアプログラムによって用いられる基準には、ギャップ間隔、水素結合、静電的相互作用、ファンデルワールス力、疎水性/親水性などが含まれる。一般に、スクリーニングされた分子とポリペプチド結合領域との接触面積が大きいくほど、立体的障害が小さくなり、「ギャップ間隔」が低くなり、水素結合の数が多くなり、そして、スクリーニングされた分子とポリペプチド結合領域との間でのファンデルワールス力の総数が多くなるほど、標的ポリペプチドと結合するスクリーニングされた分子の能力が大きくなる。「ギャップ間隔」は、結合ポケット内に存在するスクリーニングされた分子のファンデルワールス表面と、結合ポケットにおけるアミノ酸残基により規定される結合ポケットの表面との間における非占有空間を示す。ギャップ間隔は、例えば、使用者が規定する格子間隔とともに、ドッキングされた分子の周りの一連の立体格子に基づくアルゴリズムを使用して同定することができ、ポリペプチド標的の結合領域の内部に存在するドッキングされたアプタマーを改変することによって都合よく占めることができる体積を表す。

20

30

【0210】

化合物間の接触面積は、MSプログラム（Connolly ML.、1983、Science、221、709~713）を使用して、ドッキングされた立体配座における化合物の座標から直接に計算することができる。

【0211】

「スキャナー」型アルゴリズムを用いる好適なソフトウェアには、例えば、ドッキングソフトウェア、例えば、GRAM、DOCKまたはAUTODOCK（これらは、Dunbrack 他、1997、Folding and Design、2、27に総説される）、INSIGHT IIパッケージ（Molecular Simulations Inc.、1996、San Diego、Calif.）のAFFINITYソフトウェア、GRID（Goodford PJ.、1985、「生物学的に重要な高分子の表面におけるエネルギー的に有利な結合部位を決定するためのコンピューター手法」、J. Med. Chem.、28、849~857；GRIDはオックスフォード大学（Oxford、英国）から入手することができる）、およびMCSS（Miranker A. および Karpplus M.、1991、「結合部位の機能性マップ：多コピー同時検索法」、Proteins: Structure Function and Genetics、11、29~34；MCSSはMolecular Simulations（Burlington、Mass.）から入手することができる）が含まれる。

40

50

【0212】

AUTODOCKプログラム (Goodsell DS、およびOlson AJ、1990、Proteins: Struct Funct Genet、8、195~202;これはScripps Research Institute (La Jolla、Calif.)から入手することができる)は、スクリーニングされた分子を、モンテカルロ・シミュレーションによるアニーリング法を使用して柔軟な様式で結合ポケットにドッキングすることを助ける。この手法は、研究者により持ち込まれる偏りを伴わない検索を可能にする。このような偏りは、標的化された結合ポケットにおけるスクリーニングされた分子の配向および立体配座に影響を及ぼし得る。

【0213】

DOCKプログラム (Kuntz ID、他、1982、J Mol Biol、161、269~288;これはカリフォルニア大学 (San Francisco)から入手することができる)は結合ポケットの空間充填表示のネガティブ画像の記述に基づいており、エネルギー評価のための力場、制限された立体配座的柔軟性、およびエネルギー評価における疎水性の検討を含む。

10

【0214】

モデル化またはドッキングの後、CHARMM (Brooks BR、他、1983、J Comp Chem、4、187~217)またはAMBER (Weiner SJ、他、1984、J Am Chem Soc、106、765~784)などのプログラムを用いた標準的な分子力学的力場によるエネルギー最小化または動力学を行うことができる。

20

【0215】

本明細書中で使用される「エネルギーの最小化」は、原子の幾何学的形状の何らかのさらなる小さい摂動により、分子力学的力場によって測定されるような系の総エネルギーを増大させることが生じるように、系統的な変化によって化学構造を有する原子の幾何学的形状を達成することを意味する。最小化および分子力学的力場はコンピューター化学では十分に理解されている (例えば、Burkert U、およびAllinger NL、「分子力学」、ACSモノグラフ177、59頁~78頁、American Chemical Society、Washington, D.C. (1982)を参照のこと)。

30

【0216】

「ビルダー」型アルゴリズムを用いるプログラムには、LEGEND (Nishibata Y、およびItai A、1991、Tetrahedron、47、8985;これはMolecular Simulations (Burlington、Mass.)から入手することができる)、LEAPFROG (Tripos Associates、St. Louis、Mo.)、CAVEAT (Bartlett, PA、他、1989、Special Pub Royal Chem Soc、78、182~196;これはカリフォルニア大学 (Berkeley)から入手することができる)、HOOK (Molecular Simulations、Burlington、Mass.)およびLUDI (Bohm HJ、1992、J. Comp Aid Molec Design、6、61~78;これはBiosym Technologies (San Diego、Calif.)から入手することができる)が含まれる。

40

【0217】

CAVEATプログラムは、所望する結合ベクトルに基づく結合性分子を示唆する。HOOKプログラムは、多数コピーの官能基を同時検索において使用することによってドッキング部位を提案する。LUDIは、記述子に基づくのではなく、フラグメントに基づくプログラムであり、結合ポケットと一致させるために少しより大きいフラグメントが提案され、その的中が、Cambridge Structural Database (CSD)、Protein Data Bank (PDB)から採用された幾何学的基準、および結合データに基づく基準に基づいてスコア化される。LUDIは、ドッキングされ

50

た化学構造の阻害定数を計算するために都合よく用いることができる。最終的なドッキング位置における化合物の阻害定数 (K_i 値) を、LUDIソフトウェアを使用して計算することができる。

【0218】

合理的薬物設計の途中またはその後で、中間的な化学構造または推定的なアダプターの結合ポケットとのドッキングを、コンピュータスクリーンに表示されるその三次元モデルなどのその構造モデルによって可視化することができ、その結果、合理的薬物設計の途中での使用者の介入により化学構造を最適化することが都合よくできるようになる。

【0219】

そのような三次元構造モデルを表示するために有用なソフトウェアプログラムには、RIBBONS (Carson, M., 1997, *Methods in Enzymology*, 227, 25)、O (Jones, T.A. 他、1991, *Acta Crystallogr.* A47, 110)、DINO (DINO: Visualizing Structural Biology (2001), <http://www.dino3d.org>); ならびに、QUANTA、INSIGHT、SYBYL、MACROMODE、ICM、MOLMOL、RASMOLおよびGRASP (これらは、Kraulis, J., 1991, *Appl Crystallogr.*, 24, 946に総説される) が含まれる。

10

【0220】

他の分子モデル化技術もまた本発明に従って用いることができる (例えば、Cohen NC. 他、1990、「医薬品化学のための分子モデル化ソフトウェアおよび方法」、*J. Med. Chem.*, 33: 883~894; Navia M.A. および Murcko M.A., 1992、「薬物設計における構造情報の使用」、*Current Opinions in Structural Biology*, 2, 202~210)。例えば、試験化合物の構造が知られている場合、試験化合物のモデルを本発明の構造のモデルに重ねることができる。無数の方法および技術が、このステップを行うためにこの分野では知られており、それらはいずれも使用することができる (例えば、下記を参照のこと: Farmer P.S., 「薬物設計」、Ariens E.J. (編)、第10巻、119頁~143頁 (Academic Press, New York, 1980); 米国特許第5331573号; 米国特許第5500807号; Verlinde C., 1994, *Structure*, 2, 577~587; Kuntz I.D., 1992, *Science*, 257, 1078~108)。

20

30

【0221】

いずれの場合でも、仮想的なアダプター配列が同定されると、その仮想的なアダプター配列は、標的ポリペプチドに対する特異的な結合について調べられる。これは、バンドシフトアッセイ (米国特許第5756291号) およびアフィニティークロマトグラフィー [Schott, H., *Affinity Chromatography* (Marcel Dekker, Inc., New York, 1981)] などの、この分野で知られている数多くの生化学的方法を使用して行うことができる。

【0222】

あるいは、またはさらに、本発明の核酸配列は、下記の実施例の節の実施例2 (インビトロ) および実施例3 (インビボ) においてさらに記載されるように、MDCK培養細胞株などにおいてインビトロで、またはインビボでインフルエンザウイルス感染の阻害について調べることができる。

40

【0223】

本明細書中上記で記載されるように、アダプター設計における重要な構成要素はポリペプチド標的の選択である。本発明のアダプター分子を選択するために使用されるペプチドは、インフルエンザ関連の治療的適用および診断的適用における強力なツールとして使用することができることが理解される (13)。

【0224】

50

従って、本発明のなおさらなる局面によれば、インフルエンザウイルス（すなわち、オルトミクソウイルス）に対するワクチン接種のために有用なポリペプチドが提供される。

【0225】

本発明のこの局面のポリペプチドは、SmithおよびWatermanのアルゴリズムを利用するWisconsin配列分析パッケージのBestFitソフトウェアを使用して決定されたとき（この場合、様々なインフルエンザ株の間におけるポリペプチドの保存を反映し、また、機能的なホモログを同様に含めて、ギャップ生成ペナルティーが8に等しく、ギャップ伸長ペナルティーが2に等しい）、配列番号13に対して好ましくは少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%またはそれ以上、例えば、95%~100%の相同性であるアミノ酸配列を含む。

10

【0226】

本発明のこの局面のポリペプチドはインフルエンザウイルスのHA2ドメインを含まない。

【0227】

好ましくは、本発明のポリペプチドは、シアル酸受容体などの宿主細胞決定基に対する結合を媒介するインフルエンザHAの球状領域を包含する、配列番号14のアミノ酸位置116~261によって規定されるアミノ酸配列を含む。

【0228】

より好ましくは、本発明のポリペプチドは、インフルエンザHAのさらなる最小限の球状領域を包含する、配列番号15のアミノ酸位置116~245によって規定されるアミノ酸配列を含む。

20

【0229】

インフルエンザHAポリペプチドの受容体結合ポケットは、立体配座的制限により免疫系に大部分がさらされないので、本発明のこの局面のポリペプチドは好ましくはさらに、例えば、配列番号1のアミノ酸位置91~261によって規定されるようなさらなる抗原性エピトープを含む[McEwen(1992)、Vaccine、10:405~411; Muller(1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、79:569~573; Shapira(1985)、J. Immunopharmacol.、7:719~723]。

30

【0230】

他の抗原性エピトープ（これは好ましくは保存されている）が、例えば、本明細書中上記の表1に示されるような本発明のポリペプチドに含められ得ることが理解される。

【0231】

好ましくは、本発明のこの局面のポリペプチドは、配列番号13~15に示される通りである。

【0232】

あるいは、本発明のこの局面のポリペプチドは、配列番号13~15に示されるアミノ酸配列を含む。

【0233】

本明細書中および請求項の節で使用される用語「ポリペプチド」には、天然のペプチド（分解産物または合成的に合成されたペプチドまたは組換えペプチドのいずれか）、ペプチド模倣体（典型的には合成的に合成されたペプチド）そしてペプチドアナログであるペプトイドおよびセミペプトイドが含まれ、これらは、例えば、ペプチドを体内でより安定化させる修飾、またはペプチドの細胞浸透能力を高める修飾を有し得る。そのような修飾には、N末端修飾、C末端修飾、ペプチド結合の修飾（ $\text{CH}_2\text{-NH}$ 、 $\text{CH}_2\text{-S}$ 、 $\text{CH}_2\text{-S=O}$ 、 O=C-NH 、 $\text{CH}_2\text{-O}$ 、 $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ 、 S=C-NH 、 CH=CH または CF=CH を含むが、これらに限定されない）、骨格の修飾、および残基の修飾が含まれるが、これらに限定されない。ペプチド模倣体化合物を調製するための方法はこの分野では十分に知られており、例えば、Quantitative Drug Desig

40

50

n, C. A. Ramsden Gd., Chapter 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992) に具体的に記載される(これは、全体が本明細書中に示されるように参考として組み込まれる)。これに関するさらなる詳細が本明細書中下記に示される。

【0234】

ペプチド内のペプチド結合(-CO-NH-)は、例えば、N-メチル化結合(-N(CH₃)-CO-)、エステル結合(-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-)、ケトメチレン結合(-CO-CH₂-)、o-アザ結合(-NH-N(R)-CO-) (式中、Rは任意のアルキル(例えば、メチル)である)、カルバ結合(-CH₂-NH-)、ヒドロキシエチレン結合(-CH(OH)-CH₂-)、チオアミド結合(-CS-NH-)、オレフィン二重結合(-CH=CH-)、レトロアミド結合(-NH-CO-)、ペプチド誘導体(-N(R)-CH₂-CO-) (式中、Rは、炭素原子において自然界で示される「通常」の側鎖である)によって置換することができる。

10

【0235】

これらの修飾は、ペプチド鎖に沿った結合の任意のところに存在させることができ、そして同時に数カ所(2カ所~3カ所)においてさえ存在させることができる。

【0236】

天然の芳香族アミノ酸(Trp、TyrおよびPhe)は、TIC、ナフチル(Nol)、Pheの環メチル化誘導体、Pheのハロゲン化誘導体、またはo-メチル-Tyrなどの合成された非天然型の酸に置換することができる。

20

【0237】

上述のことに加えて、本発明のペプチドは一以上の修飾されたアミノ酸または一以上の非アミノ酸モノマー(例えば脂肪酸、複合体炭水化物など)も含むことができる。

【0238】

従って、本明細書中および請求項の節で使用される用語「アミノ酸」には、20個の天然に存在するアミノ酸;インビボで多くの場合には翻訳後修飾されたそのようなアミノ酸(例えば、ヒドロキシプロリン、ホスホセリンおよびホスホトレオニンを含む);および他の非通常型アミノ酸(2-アミノアジピン酸、ヒドロキシリシン、イソデスモシン、ノルバリン、ノルロイシンおよびオルニチンを含むが、これらに限定されない)が含まれることが理解される。さらに、用語「アミノ酸」には、この用語が本明細書中で定義されるように少なくとも1つの付加アミノ酸にペプチド結合またはペプチド結合アナログを介して連結されるD-アミノ酸およびL-アミノ酸の両方が含まれる。

30

【0239】

下記の表2~表3には、天然に存在するアミノ酸のすべて(表2)および非通常型アミノ酸または修飾型アミノ酸(表3)が示される。

【表 2】

表 2. 天然に存在するアミノ酸

アミノ酸	3文字略号	1文字記号
アラニン	Ala	A
アルギニン	Arg	R
アスパラギン	Asn	N
アスパラギン酸	Asp	D
システイン	Cys	C
グルタミン	Gln	Q
グルタミン酸	Glu	E
グリシン	Gly	G
ヒスチジン	His	H
イソロイシン	Ile	I
ロイシン	Leu	L
リシン	Lys	K
メチオニン	Met	M
フェニルアラニン	Phe	F
プロリン	Pro	P
セリン	Ser	S
トレオニン	Thr	T
トリプトファン	Trp	W
チロシン	Tyr	Y
バリン	Val	V
上記のような任意のアミノ酸	Xaa	X

10

20

【表 3】

表3. 非通常型アミノ酸または修飾型アミノ酸

非通常型アミノ酸	略号	非通常型アミノ酸	略号
α -アミノ酪酸	Abu	L-N-メチルアラニン	Nmala
α -アミノ- α -メチル酪酸	Mgabu	L-N-メチルアルギニン	Nmarg
アミノシクロプロパン-カルボキシラート	Cpro	L-N-メチルアスパラギン	Nmasn
アミノイソ酪酸	Aib	L-N-メチルアスパラギン酸	Nmasp
アミノノルボルニル-カルボキシラート	Norb	L-N-メチルシステイン	Nmcys
シクロヘキシルアラニン	Chexa	L-N-メチルグルタミン	Nmgin
シクロペンチルアラニン	Cpen	L-N-メチルグルタミン酸	Nmglu
D-アラニン	Dal	L-N-メチルヒスチジン	Nmhis
D-アルギニン	Darg	L-N-メチルイソロイシン	Nmile
D-アスパラギン酸	Dasp	L-N-メチルロイシン	Nmleu
D-システイン	Dcys	L-N-メチルリシン	Nmlys
D-グルタミン	Dgln	L-N-メチルメチオニン	Nmmt
D-グルタミン酸	Dglu	L-N-メチルノルロイシン	Nmnle
D-ヒスチジン	Dhis	L-N-メチルノルバリン	Nmnva
D-イソロイシン	Dile	L-N-メチルオルニチン	Nmorn
D-ロイシン	Dleu	L-N-メチルフェニルアラニン	Nmphe
D-リシン	Dlys	L-N-メチルプロリン	Nmpro
D-メチオニン	Dmet	L-N-メチルセリン	Nmser
D-オルニチン	Dorn	L-N-メチルトレオニン	Nmthr
D-フェニルアラニン	Dphe	L-N-メチルトリプトファン	Nmtrp
D-プロリン	Dpro	L-N-メチルチロシン	Nmtyr
D-セリン	Dser	L-N-メチルバリン	Nmval
D-トレオニン	Dthr	L-N-メチルエチルグリシン	Nmetg
D-トリプトファン	Dtrp	L-N-メチル-t-ブチルグリシン	Nmtbug
D-チロシン	Dtyr	L-ノルロイシン	Nle
D-バリン	Dval	L-ノルバリン	Nva
D- α -メチルアラニン	Dmala	α -メチル- α -アミノイソ酪酸	Maib
D- α -メチルアルギニン	Dmarg	α -メチル- γ -アミノ酪酸	Mgabu
D- α -メチルアスパラギン	Dmasn	α -メチルシクロヘキシルアラニン	Mchexa
D- α -メチルアスパラギン酸	Dmasp	α -メチルシクロペンチルアラニン	Mcpen
D- α -メチルシステイン	Dmcys	α -メチル- α -ナフチルアラニン	Manap
D- α -メチルグルタミン	Dmgln	α -メチルペニシラミン	Mpen
D- α -メチルヒスチジン	Dmhis	N-(4-アミノブチル)グリシン	Nglu
D- α -メチルイソロイシン	Dmile	N-(2-アミノエチル)グリシン	Naeg
D- α -メチルロイシン	Dmleu	N-(3-アミノプロピル)グリシン	Norn
D- α -メチルリシン	Dmlys	N-アミノ- α -メチル酪酸	Nmaabu
D- α -メチルメチオニン	Dmmt	α -ナフチルアラニン	Anap
D- α -メチルオルニチン	Dmorn	N-ベンジルグリシン	Nphe
D- α -メチルフェニルアラニン	Dmphe	N-(2-カルバミルエチル)グリシン	Ngln
D- α -メチルプロリン	Dmpro	N-(カルバミルメチル)グリシン	Nasn
D- α -メチルセリン	Dmser	N-(2-カルボキシエチル)グリシン	Nglu
D- α -メチルトレオニン	Dmthr	N-(カルボキシメチル)グリシン	Nasp
D- α -メチルトリプトファン	Dmtrp	N-シクロブチルグリシン	Ncbut
		N-シクロヘプチルグリシン	Nchep
		N-シクロヘキシルグリシン	Nchex

10

20

30

40

D- α -メチルチロシン	Dmty	N-シクロデシルグリシン	Ncdec
D- α -メチルバリン	Dmval	N-シクロドデシルグリシン	Ncdod
D- α -メチルアラニン	Dnmala	N-シクロオクチルグリシン	Ncoct
D- α -メチルアルギニン	Dnmarg	N-シクロプロピルグリシン	Ncpro
D- α -メチルアスパラギン	Dnmasn	N-シクロウンデシルグリシン	Ncund
D- α -メチルアスパラギン酸	Dnmasp	N-(2,2-ジフェニルエチル)グリシン	Nbhm
D- α -メチルシステイン	Dnmcys	N-(3,3-ジフェニルエチル)グリシン	Nbhe
D-N-メチルロイシン	Dnmleu	N-(3-インドリルエチル)グリシン	Nhtrp
D-N-メチルリシン	Dnmlys	N-メチル- γ -アミノ酪酸	Nmgabu
N-メチルシクロヘキシルアラニン	Nmchexa	D-N-メチルメチオニン	Dnmmt
D-N-メチルオルニチン	Dnmorn	N-メチルシクロペンチルアラニン	Nmcpn
N-メチルグリシン	Nala	D-N-メチルフェニルアラニン	Dnmphe
N-メチルアミノイソ酪酸	Nmaib	D-N-メチルプロリン	Dnmpro
N-(1-メチルプロピル)グリシン	Nile	D-N-メチルセリン	Dnmser
N-(2-メチルプロピル)グリシン	Nile	D-N-メチルセリン	Dnmser
N-(2-メチルプロピル)グリシン	Nleu	D-N-メチルトレオニン	Dnmthr
D-N-メチルトリプトファン	Dnmtrp	N-(1-メチルエチル)グリシン	Nva
D-N-メチルチロシン	Dnmtyr	N-メチル α -ナフチルアラニン	Nmanap
D-N-メチルバリン	Dnmval	N-メチルペニシラミン	Nmpen
γ -アミノ酪酸	Gabu	N-(p-ヒドロキシフェニル)グリシン	Nhtyr
L-t-ブチルグリシン	Tbug	N-(チオメチル)グリシン	Ncys
L-エチルグリシン	Etg	ペニシラミン	Pen
L-ホモフェニルアラニン	Hphe	L- α -メチルアラニン	Mala
L- α -メチルアルギニン	Marg	L- α -メチルアスパラギン	Masn
L- α -メチルアスパラギン酸	Masp	L- α -メチル-t-ブチルグリシン	Mtbug
L- α -メチルシステイン	Mcys	L-メチルエチルグリシン	Metg
L- α -メチルグルタミン	Mgln	L- α -メチルグルタミン酸	Mglu
L- α -メチルヒスチジン	Mhis	L- α -メチルホモフェニルアラニン	Mhphe
L- α -メチルイソロイシン	Mile	N-(2-メチルチオエチル)グリシン	Nmet
D-N-メチルグルタミン	Dnmgln	N-(3-グアニジノプロピル)グリシン	Narg
D-N-メチルグルタミン酸	Dnmglu	N-(1-ヒドロキシエチル)グリシン	Nthr
D-N-メチルヒスチジン	Dnmhis	N-(ヒドロキシエチル)グリシン	Nser
D-N-メチルイソロイシン	Dnmile	N-(イミダゾリルエチル)グリシン	Nhis
D-N-メチルロイシン	Dnmleu	N-(3-インドリルエチル)グリシン	Nhtrp
D-N-メチルリシン	Dnmlys	N-メチル- γ -アミノ酪酸	Nmgabu
N-メチルシクロヘキシルアラニン	Nmchexa	D-N-メチルメチオニン	Dnmmt
D-N-メチルオルニチン	Dnmorn	N-メチルシクロペンチルアラニン	Nmcpn
N-メチルグリシン	Nala	D-N-メチルフェニルアラニン	Dnmphe
N-メチルアミノイソ酪酸	Nmaib	D-N-メチルプロリン	Dnmpro
N-(1-メチルプロピル)グリシン	Nile	D-N-メチルセリン	Dnmser
N-(2-メチルプロピル)グリシン	Nleu	D-N-メチルトレオニン	Dnmthr
D-N-メチルトリプトファン	Dnmtrp	N-(1-メチルエチル)グリシン	Nval
D-N-メチルチロシン	Dnmtyr	N-メチル α -ナフチルアラニン	Nmanap
D-N-メチルバリン	Dnmval	N-メチルペニシラミン	Nmpen
γ -アミノ酪酸	Gabu	N-(p-ヒドロキシフェニル)グリシン	Nhtyr
L-t-ブチルグリシン	Tbug	N-(チオメチル)グリシン	Ncys
L-エチルグリシン	Etg	ペニシラミン	Pen
L-ホモフェニルアラニン	Hphe	L- α -メチルアラニン	Mala
L- α -メチルアルギニン	Marg	L- α -メチルアスパラギン	Masn
L- α -メチルアスパラギン酸	Masp	L- α -メチル-t-ブチルグリシン	Mtbug

10

20

30

40

L- α -メチルシステイン	Mcys	L-メチルエチルグリシン	Metg
L- α -メチルグルタミン	Mgln	L- α -メチルグルタミン酸	Mglu
L- α -メチルヒスチジン	Mhis	L- α -メチルホモフェニルアラニン	Mhphe
L- α -メチルイソロイシン	Mile	N-(2-メチルチオエチル)グリシン	Nmet
L- α -メチルロイシン	Mleu	L- α -メチルリシン	Mlys
L- α -メチルメチオニン	Mmet	L- α -メチルノルロイシン	Mnle
L- α -メチルノルバリン	Mnva	L- α -メチルオルニチン	Morn
L- α -メチルフェニルアラニン	Mphe	L- α -メチルプロリン	Mpro
L- α -メチルセリン	mser	L- α -メチルトレオニン	Mthr
L- α -メチルバリン	Mtrp	L- α -メチルチロシン	Mtyr
L- α -メチルロイシン	Mval Nnbhm	L-N-メチルホモフェニルアラニン	Nmhph
N-(N-(2,2-ジフェニルエチル)カルバミルメチル)グリシン	Nnbhm	N-(N-(3,3-ジフェニルプロピル)カルバミルメチル(1)グリシン	Nnbhe
1-カルボキシ-1-(2,2-ジフェニルエチルアミノ)シクロプロパン	Nmbc		

10

【0240】

本発明のペプチドは、好ましくは、線状形態で利用される。しかし、環化がペプチドの特性をひどく妨害しない場合、ペプチドの環状形態もまた利用できることが理解される。

【0241】

本発明者らは、結論として、本発明の教示に従って作製されたポリペプチドが体液性免疫応答および細胞性免疫応答を誘発し得ることを示している（実施例の節の実施例7～実施例8を参照のこと）。

20

【0242】

DNA免疫化は、ペプチド免疫化と比較した場合、多くのウイルス剤に対するより良好な細胞性免疫応答を生じさせることが広く理解されている。

【0243】

従って、本発明のさらにさらなる局面によれば、本明細書中上記に記載される本発明のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドが提供される。

【0244】

本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードするゲノムポリヌクレオチド配列、相補的ポリヌクレオチド配列または複合ポリヌクレオチド配列を構成し得る。

30

【0245】

本明細書中で使用される表現「相補的ポリヌクレオチド配列」は、逆転写酵素または任意の他のRNA依存性DNAポリメラーゼを使用して、最初はメッセンジャーRNAの逆転写から生じる配列を包含する。そのような配列は続いて、DNA依存性DNAポリメラーゼを使用してインビボまたはインビトロで増幅することができる。

【0246】

本明細書中で使用される表現「ゲノムポリヌクレオチド配列」は、最初は染色体に由来し、染色体の連続した一部分を反映する配列を包含する。

【0247】

本明細書中で使用される表現「複合ポリヌクレオチド配列」は、少なくとも一部が相補的であり、かつ、少なくとも一部がゲノム性である配列を包含する。複合配列は、HAの球状領域をコードするために要求されるいくつかのエクソン配列、グリコシル化コンセンサス部位、ならびに、それらの間に置かれたいくつかのイントロン配列を含むことができる。イントロン配列は、他の遺伝子を含む任意の供給源のものが可能であり、典型的には、保存されたスプライシングシグナル配列を含む。そのようなイントロン配列はさらに、シス作用の発現調節エレメントを含むことができる。イントロン配列はまた、翻訳されたタンパク質にも寄与し得る。

40

【0248】

下記の実施例の節の実施例7において示されるように、本発明のポリペプチドおよびポ

50

リヌクレオチドに対して作製された抗体は多数のインフルエンザ株種と交差反応し、そのため、様々な臨床的適用において使用することができる。

【0249】

従って、本発明のさらなる局面によれば、上述の本発明のポリペプチドを特異的に認識する抗原結合部位を含む抗体または抗体フラグメントが提供される。

【0250】

本発明において使用される用語「抗体」は、完全な抗体分子を意味し、句「抗体フラグメント」はその機能的なフラグメント、例えば、マクロファージに結合することができる Fab、F(ab')₂ および Fvなどを意味する。これらの機能的な抗体フラグメントは次のように定義される。：(i) Fabは、抗体分子の一価の抗原結合性フラグメントを含有するフラグメントであり、完全な分子を酵素パパイニンで消化して、無傷の軽鎖と、一方の重鎖の一部とを生じさせることによって作製することができる。(ii) Fab'は、完全な抗体をペプシンで処理し、その後、還元して、無傷の軽鎖と、重鎖の一部とを生じさせることによって得ることができる抗体分子のフラグメントである。2つの Fabフラグメントが1つの抗体分子あたり得られる。(iii) (Fab')₂は、その後の還元を行うことなく、完全な分子を酵素ペプシンで処理することによって得ることができる抗体のフラグメントである。F(ab')₂は、2つのジスルフィド結合によって一緒にされた2つの Fab'フラグメントのダイマーである。(iv) Fvは、2つの鎖として発現された軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含有する遺伝子操作されたフラグメントとして定義される。(v) 単鎖抗体(「SCA」)は、遺伝子的に融合された単一鎖分子として好適なポリペプチドリンカーによって連結されて、軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含有する遺伝子操作された分子である。(vi) ペプチドは単一の相補性決定領域(CDR)をコードする。

【0251】

抗体(即ちモノクローナル及びポリクローナル抗体)を作成する方法は当該技術分野では周知である。抗体は当該技術分野で知られたいくつかの方法のいずれか一つを介して作成されることができ、これらの方法(Orlandi D. R. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 3833-3837, Winter G. et al. (1991) Nature 349: 293-299)に開示されるように抗体分子のインビボ生成の誘導、免疫グロブリンライブラリーまたは極めて特異的に結合する試薬のパネルのスクリーニングを用いることができるかまたは培養中の連続細胞系によるモノクローナル抗体分子の生成を用いることができる。これらはハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術及び Epstein-Bar-Virus (EBV)ハイブリドーマ技術(Kohler G., et al. (1975) Nature 256: 495-497, Kozbor D., et al. (1985) J. Immunol. Methods 81: 31-42, Cote R. J. et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80: 2026-2030, Cole S. P. et al. (1984) Mol. Cell. Biol. 62: 109-120)を含むがこれらに限定されない。

【0252】

そのような抗体フラグメントを製造する様々な方法がこの技術においては知られている(例えば、HarlowおよびLane、Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988)を参照のこと:これは参照により本明細書中に組み込まれる)。例えば、本発明による抗体フラグメントは、フラグメントをコードするDNAを大腸菌または哺乳動物細胞(例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞培養物または他のタンパク質発現システム)において発現させることによって調製することができる。

【0253】

抗体フラグメントは、従来の方法による完全な抗体のペプシン消化またはパパイニン消化によって得ることができる。例えば、抗体フラグメントを、抗体をペプシンで酵素切断し

て、 $F(ab')_2$ として示される5Sフラグメントを得ることによって製造することができる。このフラグメントは、3・5SのFab'一価フラグメントを製造するために、チオール還元剤、および場合により、ジスルフィド連結の切断から生じるスルフヒドリル基に対する保護基を使用してさらに切断することができる。あるいは、ペプシンを使用する酵素切断により、2つの一価Fab'フラグメントおよびFcフラグメントが直接的に得られる。これらの方法は、例えば、Goldenbergの米国特許第4036945号および同第4331647号、ならびにそれらに含まれる参考文献に記載されている(それらの特許は本明細書によりその全体が参照により組み込まれる)。また、Porter, R. R., Biochem. J., 73: 119~126, 1956も参照のこと。抗体を切断する他の方法、例えば、一価の軽鎖-重鎖フラグメントを形成させるための重鎖の分離、フラグメントのさらなる切断、または他の酵素的、化学的もしくは遺伝学的な技術などもまた、フラグメントが、無傷の抗体によって認識される抗原に結合する限り、使用することができる。

10

20

30

40

50

【0254】

Fvフラグメントは V_H 鎖および V_L 鎖の会合を含む。この会合は、Inbar他、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 69: 2659~62, 1972に記載されているように非共有結合性であり得る。あるいは、可変鎖を、分子間ジスルフィド結合によって連結することができ、または、グルタルアルデヒドなどの化学剤によって架橋することができる。好ましくは、Fvフラグメントは、ペプチドリinkerによってつながれた V_H 鎖および V_L 鎖を含む。これらの単鎖抗原結合タンパク質(sFv)は、オリゴヌクレオチドによりつながれた V_H ドメインおよび V_L ドメインをコードするDNA配列を含む構造遺伝子を構築することによって調製される。この構造遺伝子は発現ベクターに導入され、続いて、発現ベクターは大腸菌などの宿主細胞に導入される。組換え宿主細胞により、2つのVドメインを架橋するリンカーペプチドを有する単一ポリペプチド鎖が合成される。sFvを製造するための様々な方法が、例えば、WhitlowおよびFilpula, Methods, 2: 97~105, 1991; Bird他、Science, 242: 423~426, 1988; Pack他、Bio/Technology, 11: 1271~77, 1993; Ladner他、米国特許第4946778号(これは本明細書によりその全体が参照により組み込まれる)によって記載されている。

【0255】

CDRペプチド(「最小認識ユニット」)は、目的とする抗体のCDRをコードする遺伝子を構築することによって得ることができる。そのような遺伝子は、例えば、抗体産生細胞のRNAから可変領域を合成するためにポリメラーゼ連鎖反応を使用することによって調製される。例えば、LarrickおよびFry, Methods, 2: 106~110, 1991を参照のこと。

【0256】

ヒトの治療または診断のためにはヒト化された抗体を用いることが好ましいことは理解されるであろう。非ヒト(例えば、ネズミ)抗体のヒト化形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有する、免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそのフラグメント(例えば、Fv、Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 、または抗体の他の抗原結合性の部分配列など)のキメラ分子である。ヒト化抗体には、レシピエントの相補性決定領域(CDR)に由来する残基が、所望する特異性、親和性および能力を有する、マウス、ラットまたはウサギなどの非ヒト種(ドナー抗体)のCDRに由来する残基によって置換されているヒト免疫グロブリンレシピエント抗体が含まれる。場合により、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基が、対応する非ヒト残基によって置換される。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体においても、あるいは取り込まれたCDR配列またはフレームワーク配列においても、そのいずれにも見出されない残基を含むことができる。一般に、ヒト化抗体は、実質的にはすべての可変ドメインまたは1つ以上の(典型的には2つ)可変ドメインを含み、この場合、CDR領域のすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に対応し、FR領域のすべてまたは実質的にすべてがヒト免疫グロ

プリンコンセンサス配列のFR領域である。ヒト化抗体はまた、最適には、免疫グロブリン定常領域(Fc)の一部を、典型的には、ヒト免疫グロブリンの定常領域の一部を少なくとも含む [Jones 他、Nature、321:522~525(1986); Reichmann 他、Nature、332:323~329(1988); Presta、Curr. Op. Struct. Biol.、2:593~596(1992)]。

【0257】

非ヒト抗体をヒト化するための様々な方法がこの技術においては広く知られている。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源から導入された1つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、多くの場合、輸入残基と呼ばれており、この輸入残基は、典型的には、輸入可変ドメインに由来する。ヒト化は、齧歯類のCDRまたはCDR配列をヒト抗体の対応する配列の代わりに使用することによって、Winterおよび共同研究者の方法に従って本質的には行うことができる [Jones 他、Nature、321:522~525(1986); Reichmann 他、Nature、332:323~327(1988); Verhoeyen 他、Science、239:1534~1536(1988)]。従って、そのようなヒト化抗体は、実質的に完全でないヒト可変ドメインが非ヒト種由来の対応する配列によって置換されているキメラ抗体である(米国特許第4816567号)。実際、ヒト化抗体は典型的にはヒト抗体であり、この場合、一部のCDR残基およびおそらくは一部のFR残基が、齧歯類抗体における類似部位に由来する残基によって置換される。

【0258】

ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリー [Hoogenboom および Winter、J. Mol. Biol.、227:381(1991); Marks 他、J. Mol. Biol.、222:581(1991)] を含む、この分野で知られている様々な技術を使用して製造することができる。Cole 他および Boerner 他のもまた、ヒトモノクローナル抗体を調製するために利用することができる [Cole 他、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、Alan R. Liss、77頁(1985); Boerner 他、J. Immunol.、147(1):86~95(1991)]。同様に、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を、内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活性化されている遺伝子組換え動物(例えば、マウス)に導入することによって作製することができる。抗原投与したとき、ヒト抗体の産生が認められ、この場合、その産生は、遺伝子再配置、組み立ておよび抗体レパートリーを含むすべての点に関してヒトにおいて見られる産生と非常に似ている。この方法は、例えば、米国特許第5545807号、同第5545806号、同第5569825号、同第5625126号、同第5633425号、同第5661016号、および下記の科学的刊行物: Marks 他、Bio/Technology、10、779~783(1992); Lonberg 他、Nature、368:856~859(1994); Morrison、Nature、368:812~13(1994); Fishwild 他、Nature Biotechnology、14:845~51(1996); Neuberger、Nature Biotechnology、14:826(1996); Lonberg および Huszar、Intern. Rev. Immunol.、13:65~93(1995) に記載されている。

【0259】

本明細書中上記で述べられたように、本発明のポリペプチドおよび核酸配列は、インフルエンザウイルス感染を処置するために使用することができる。

【0260】

従って、本発明のなおさらなる局面によれば、インフルエンザウイルス感染を処置する方法が提供される。

【0261】

この方法は、本明細書中上記に記載される本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび/または抗体の治療効果的な量をその必要性のある対象に与えることによって行われ

る。

【0262】

好ましい投与経路および医薬組成物が本明細書中上記に記載される。

【0263】

本発明の教示に従って作製された抗体は、生物学的サンプルにおけるインフルエンザウイルスを同定するためにもまた使用することができることが理解される。

【0264】

この方法は、本明細書中上記に記載されるような生物学的サンプルを本発明の抗体または抗体フラグメントと接触させることによって行うことができる。

【0265】

その後、生物学的サンプルにおける抗体または抗体フラグメントを含む免疫複合体が検出され、それにより、生物学的サンプルにおけるインフルエンザウイルスを同定する。

【0266】

好ましくは、免疫複合体は、何らかの非特異的に結合した抗体を除くために、検出に先だって洗浄され、これにより、一次免疫複体内における特異的に結合したそのような抗体のみを検出することが可能になる。

【0267】

一般に、免疫複合体形成の検出はこの分野では広く知られており、いくつかの適切な方法のいずれか1つによって達成することができる。これらの方法は一般に、例えば、本明細書中上記で記載されたように、標識またはマーカーの検出に基づいている。

【0268】

本発明の教示に従って作製された核酸分子、そのコンジュゲート、ポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび抗体は診断キットまたは治療キットに含めることができる。これらの試薬は、適切な緩衝液および保存剤とともに1つまたは複数の容器に詰めることができ、また、診断のために、または治療的処置を導くために使用することができる。

【0269】

従って、核酸分子およびそのコンジュゲートはそれぞれを1つの容器において混合することができ、または個々の容器に入れることができる。好ましくは、容器はラベルを含む。好適な容器には、例えば、ビン、バイアル、シリンジおよび試験管が含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成され得る。

【0270】

また、安定化剤、緩衝剤および阻止剤などの他の添加剤もまた加えることができる。そのようなキットの核酸分子およびそのコンジュゲートはまた、記載されたように固体支持体に結合することができ、診断目的のために使用することができる。キットはまた、試験された対象がインフルエンザウイルス感染に罹患しているか、またはインフルエンザウイルス感染を発症する危険性を有するかどうかを明らかにするための説明書を含むことができる。

【0271】

本発明の追加の目的、利点及び新規な特徴は、下記実施例を考察すれば、当業技術者には明らかになるであろう。なお、これら実施例は本発明を限定するものではない。さらに、先に詳述されかつ本願の特許請求の範囲の項に特許請求されている本発明の各種実施態様と側面は各々、下記実施例の実験によって支持されている。

【実施例】

【0272】

上記説明とともに、以下の実施例を参照して本発明を例示する。なおこれら実施例によって本発明は限定されない。

【0273】

本願で使用される用語と、本発明で利用される実験方法には、分子生化学、微生物学及び組み換えDNAの技法が広く含まれている。これらの技法は文献に詳細に説明されている[例えば以下の諸文献を参照されたい。「Molecular Cloning: A

10

20

30

40

50

laboratory Manual」Sambrookら1989年；Ausubel, R. M. 編1994年「Current Protocols in Molecular Biology」I~III巻；Ausubelら著1989年「Current Protocols in Molecular Biology」John Wiley and Sons, 米国メリーランド州バルチモア；Perbal著「A Practical Guide to Molecular Cloning」John Wiley & Sons, 米国ニューヨーク1988年；Watsonら、「Recombinant DNA」Scientific American Books, 米国ニューヨーク；Birrenら編「Genome Analysis: A Laboratory Manual Series」1~4巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 米国ニューヨーク1998年；米国特許の4666828号、4683202号、4801531号、5192659号及び5272057号に記載される方法；Cellis, J. E. 編「Cell Biology: A Laboratory Handbook」I~III巻1994年；Coligan, J. E. 編「Current Protocols in Immunology」I~III巻1994年；Stitesら編「Basic and Clinical Immunology」(第8版)、Appleton & Lange, 米国コネティカット州ノーウォーク1994年；MishellとShiigi編「Selected Methods in Cellular Immunology」、W. H. Freeman and Co., 米国ニューヨーク1980年；また利用可能な免疫検定法は、例えば以下の特許と科学文献に広範囲にわたって記載されている。米国特許の3791932号、3839153号、3850752号、3850578号、3853987号、3867517号、3879262号、3901654号、3935074号、3984533号、3996345号、4034074号、4098876号、4879219号、5011771号及び5281521号；Gait, M. J. 編「Oligonucleotide Synthesis」1984年；Hames, B. D. 及びHiggins S. J. 編「Nucleic Acid Hybridization」1985年；Hames, B. D. 及びHiggins S. J. 編「Transcription and Translation」1984年；Freshney, R. I. 編「Animal Cell Culture」1986年；「Immobilized Cells and Enzymes」IRL Press 1986年；Perbal, B. 著「A Practical Guide to Molecular Cloning」1984年及び「Methods in Enzymology」1~317巻、Academic Press；「PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications」、Academic Press, 米国カリフォルニア州サンディエゴ1990年；Marshakら、「Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual」、CSHL Press, 1996年；なおこれらの文献類は、あたかも本願に完全に記載されているように援用するものである。その外の一般的な文献は、本明細書を通じて提供される。本明細書に記載の方法は当業技術界で周知であると考えられ、読者の便宜のために提供される。本明細書に含まれるすべての情報は本願に援用するものである。

【0274】

実施例1

血球凝集素特異的アプタマー - 理論的根拠および設計

指数的濃縮によるリガンドの系統的進化 (SELEX) を、インフルエンザ血球凝集素 (HA) と結合するアプタマーオリゴヌクレオチドを同定するために行った。

【0275】

材料および実験手順

10

20

30

40

50

ライブラリー作製：共通する5'配列AATTAACCCCTCACTAAAGGG(配列番号16、T3として示される；Stratagene、La)および共通する3'配列5'-TATGGTCGAATAAGTTAA-3'(配列番号17)によって挟まれた30ヌクレオチドのランダム化配列を中央部に含有するアプタマーライブラリーを380B DNA合成機(Applied Biosystems)において合成した。ライブラリーは、 10^{16} 個の分子のすべてについて、製造者の説明書(Applied Biosystems)に従って作製された30ヌクレオチドのランダムセグメントを含んだ。

【0276】

SELEX-ssDNAアプタマーを80で10分間変性し、その後、氷上で10分間冷却した。アプタマー(30nmol)を、500 μ lの選択緩衝液(50mM Tris-HCl(pH7.4)、5mM KCl、100mM NaCl、1mM MgCl₂、tRNA、0.2%BSA)において37で30分間、25 μ gのHA₉₁₋₂₆₁ペプチド(さらには本明細書中下記に記載される)と混合した。アプタマー-ペプチド複合体を、25 μ lのNi-NTAスーパーフロー(Qiagen、Hilden、ドイツ)を加えることによって精製し、アプタマーライブラリーにおける共通配列に対するプライマー[すなわち、5'-AATTAACCCCTCACTAAAGGG-3'(配列番号18(T3))および3'プライマー5'-TTAACTTATTTCGACCATTA-3'(配列番号19)]を使用するPCRによって増幅した。SELEXを3回繰り返し、その後、増幅されたヌクレオチドを大腸菌に形質転換した。SELEXについてのPCR条件は、95で5分間/95で1分間/55で1分間/72で1分間/72で10分間および100pmolの各プライマーを含んだ。

【0277】

アプタマーの逆スクリーニング-それぞれの個々のクローンに由来する選択されたssDNA分子を、5'プライマー(T3プライマー)に関して同じ配列であるB-T3(Stratagene、La Jolla、CA)およびクレノウフラグメント(2ユニット/ml)を使用してピオチン化した。一本鎖のピオチンコンジュゲート化A22アプタマーを逆スクリーニングのために調製するために、T3プライマー(配列番号18)をピオチン標識した(Stratagene、La Jolla、CA)。

【0278】

96ウエル平底ELISAプレート(Nunc、デンマーク)を、各ウエルを0.1MのNaHCO₃に希釈された100 μ lのストレプトアビジン(100 μ g/ml)で被覆し、その後、37で一晩インキュベーションすることによって調製した。PBSで数回洗浄した後、ウエルを、1%BSAを含有する200 μ lのPBSにより室温で2時間ブロッキング処理し、続いて、PBS-T(0.05%(v/v)Tween-20を含有する10mM PBS)で3回洗浄した。その後、100 μ lの2.5pmol/100 μ lのピオチン化ssDNAをウエルに加え、37で2時間インキュベーションし、その後、PBS-Tで4回洗浄した。T3プライマーを陰性コントロールとして使用した(配列番号18)。洗浄後、100 μ lの10血球凝集素ユニット(HAU)のインフルエンザウイルスまたは2 μ gのヒスチジン標識されたHA₉₁₋₂₆₁ペプチドを示されたウエルに加え、37で2時間インキュベーションした。その後、ウエルをPBS-Tで4回洗浄し、抗ヒスチジン抗体(Qiagen、Hilden、ドイツ)および抗ウイルス抗体(組換えHA₉₁₋₂₆₁で免疫化されたマウスから得られた血清サンプル)を対応のウエルに加えた。逆スクリーニングアッセイをELISAによって完了させた。

【0279】

酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)-高結合能ELISAプレート(Immunoplate、Nunc、デンマーク)を、4で一晩インキュベーションすることによって、リン酸塩緩衝化生理的食塩水(PBS)に希釈された100HAU/mlの様々なインフルエンザウイルス株を含有する100 μ lの尿膜液で被覆した。PBSによる数回の洗浄工程の後、ウエルを、1%ウシ血清アルブミン(BSA)を含有する200 μ lの

PBSでブロッキング処理し、室温で90分間インキュベーションした。その後、プレートを、0.05% (v/v) Tween-20を含有するPBS (PBS-T)で3回洗浄した。その後、各ウエルに100 μ lの連続希釈された血清サンプルを加えて、ウエルを37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベーションした。このインキュベーション期間の後、プレートをPBS-Tで5回洗浄し、結合した抗体を、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識のヤギ抗マウスIgGコンジュゲート (HRP; Jackson Laboratories) を使用して検出した。免疫複合体を、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン溶液 (TMB, Zymed) と室温で30分間インキュベーションすることによって可視化した。反応を50 μ lの2M H₂SO₄で停止させ、プレートをマルチチャンネル分光光度計 (Titer tek, Multiskan MCC/340 MK II, Lab system, フィンランド) で読み取った。

【0280】

結果

HA分子のアミノ酸₉₁₋₂₆₁に結合するオリゴヌクレオチドを同定するために、保存されたリンカーの間にランダムな30ヌクレオチドを含有するヌクレオチドライブラリーを合成した。ライブラリーは10¹⁸タイプの異なるssDNAを含み、これらをHA₉₁₋₂₆₁ペプチドにハイブリダイゼーションさせ、Ni-NTA樹脂によって精製した。精製後、ssDNAを、リンカー配列を使用するPCRによって増幅した。このプロセスを4回繰り返し、HA₉₁₋₂₆₁結合体の再スクリーニングをELISAによって行った。

【0281】

この逆スクリーニングプロセスにより、「A21」および「A22」(それぞれ、配列番号11および配列番号12)として示される2つのオリゴヌクレオチドアプタマーが得られた。A21およびA22はHA₉₁₋₂₆₁に対する同じ結合能を示し、しかしながら、完全なウイルスとの結合における著しい差が明らかであった(図2a~図2b)。従って、A22オリゴヌクレオチドの構造的および機能的な分析のみをさらに行った。A22、A21およびコントロールオリゴヌクレオチドについてのDNADrawプログラム(18)を使用して提案される二次構造が図2c~図2eに示される。

【0282】

実施例2

インフルエンザ感染からのインビトロでのアプタマーによる保護

インフルエンザ感染 (H3N2 Port Chalmers株) に対するA22アプタマーの保護効果を、MDC K細胞を使用してインビトロで調べた(19)。

【0283】

材料および実験手順

ウイルス - A / Port Chalmers / 1 / 73 (H3N2)、A / Texas / 1 / 77 (H3N2)、PR / 8 / 34 (H1N1) および Japanese / 57 (H2N2) のインフルエンザ株を11日目の孵化ニワトリ卵 (Bar On Hatchery, Hod Hasharon, イスラエル) の尿膜腔において成長させた。ウイルスの成長および精製を、BarretおよびIngliis(23)によって記載される標準的な方法に従って行った。尿膜液におけるウイルスの力価測定を血球凝集アッセイによって行った。

【0284】

細胞 - Madin - Darbyイヌ腎臓細胞 (MDC K, ATCC # CCL34) を、熱不活性化10%ウシ胎児血清 (FCS) が補充されたダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) において維持した。

【0285】

MTTアッセイ - MDC K細胞をアッセイの1日前に96ウエルプレートに入れた (7 x 10⁴ 個 / ウエル)。細胞をダルベッコリン酸塩緩衝化生理的食塩水 (DPBS) で2回洗浄し、その後、示されたアプタマー濃度の存在下または非存在下で10HAUのPo

rt Chalmers / 1 / 73 (H3N2) または 10HAU の Japan (H2N2) を含む、25mM の HEPES および 4mM の重炭酸ナトリウム (pH 7.3) が補充されたハンス平衡塩溶液 (HBSS) との 1 時間のインキュベーションを行った。感染後、細胞を成長培地において 37 で 72 時間インキュベーションした。MTT アッセイを、PBS に溶解された 4mg/ml の MTT (3-[4,5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミド、Sigma、St. Louis、米国) を細胞培養物に加え、37 で 3 時間インキュベーションすることによって行った。その後、プレートを 800 x g で 10 分間遠心分離した。上清を吸引し、ホルマザン色素を 150 µl / ウエルのイソプロピルアルコール (Merck、Darmstadt、ドイツ) に溶解し、O.D. 値を ELISA リーダーにより 540 nm で測定した。 10

【0286】

ウイルス感染前のインビトロでのウイルスからの保護 - MDC K 細胞を実験の 24 時間前に 96 ウエルプレートに置床した (7×10^4 個 / ウエル)。各ウエルを DPBS で 2 回洗浄し、その後、細胞を 50 pmol の A22 で 37 において示された時点について処理した。その後、細胞を DPBS で 2 回洗浄し、富化 HBSS において 10HAU の H3N2 を 1 時間感染させた。インキュベーション後、細胞を成長培地に移し、37 で 72 時間インキュベーションした。その後、MTT アッセイを記載のように行った。

【0287】

ウイルス感染後のインビトロでのウイルスからの保護 - MDC K 細胞をウイルス感染の 24 時間前に 96 ウエルプレートに置床した (7×10^4 個 / ウエル)。ウイルス感染を上記のように行った。感染細胞を DPBS で穏やかに 3 回洗浄した。その後、細胞を 50 pmol の A22 で 37 において 1 時間処理した。インキュベーション後、細胞を成長培地に移し、37 で 72 時間インキュベーションした。その後、MTT アッセイを記載のように行った。 20

【0288】

免疫染色 - 5×10^5 個の MDC K 細胞をガラス製カバーガラスに置いた。24 時間後、インフルエンザウイルス (Port Chalmers / 1 / 73、H3N2) を、A22 との 1 時間のプレインキュベーションとともに、またはプレインキュベーションを行うことなく加えた。さらに 48 時間後、細胞を、0.5% の Triton X-100 を含有する 3% パラホルムアルデヒドで透過処理し、続いて、新しく調製した 3% パラホルムアルデヒドにおいて固定処理した。インフルエンザ表面抗原の血球凝集素を、培養物をインフルエンザ血球凝集素に対して特異的なマウスモノクローナル抗体 (1:100 希釈、Santa Cruz Biotechnology Inc.) とインキュベーションすることによって検出した。抗体とのインキュベーションはすべてが加湿チャンバーにおいて室温で 1 時間行われ、その後、PBS における 3 回洗浄が行われた。一次抗体を、Cy3 コンジュゲート化ヤギ抗マウス免疫グロブリン (Jackson ImmunoResearch Laboratories、米国) 二次抗体を用いて検出した。核を、2 µg/ml の 4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI; Sigma、イスラエル) で染色することによって可視化した。免疫蛍光顕微鏡観察を、Nikon Eclipse E600 顕微鏡を使用して行った。写真を、Spot ソフトウェアプロ 40

【0289】

結果

細胞をインフルエンザウイルス感染からインビトロで保護するアプタマーの能力を調べた。図 3 a に示されるように、ウイルス感染 (H2N2) の前にアプタマー A22 で処理された細胞は、ウイルスに関連した細胞死の著しい減少を明らかにした。興味深いことに、保護効果は、おそらくは非感染細胞での高い濃度のために、A22 の 50 pmol ~ 100 pmol の間の濃度で最大であった (図 3 b)。従って、さらなるウイルス株 H3N2 の感染に対する 50 pmol の A22 の効果を調べた。図 3 b に示されるように、A2 50

2 は、非感染 M D C K 細胞と比較した時、H 2 N 2 および H 3 N 2 による細胞の感染に対して約 6 0 % および約 7 0 % の保護をそれぞれ誘発した。興味深いことに、図 3 b にもまた示されるように、A 2 1 アプタマーはまた、細胞死を全く低下させなかった非関連のオリゴヌクレオチドコントロールと比較した場合、ウイルスのインピト口感染性を低下させることができた。

【0290】

宿主タンパク質と結合する A 2 2 アプタマーの能力を次に明らかにした。ウイルス感染の前に、M D C K 細胞を A 2 2 (5 0 p m o l) と 3 0 分間または 6 0 分間インキュベーションし、その後、洗浄を繰り返した。図 3 c に示されるように、非処置細胞および処置細胞の生存率の間には著しい差がないことが明らかであり、また、A 2 2 に対する細胞の 2 つの暴露（すなわち、ウイルス感染の前およびウイルス感染の後）の間における何らかの差を検出することができなかった。これらの結果は、A 2 2 の阻害活性が宿主細胞上のシアル酸含有受容体を直接的に阻止することに起因しないことを示唆している。

10

【0291】

宿主細胞受容体にウイルスが結合した後に加えられた場合、A 2 2 が依然として保護的であるかどうかを調べるために、M D C K 細胞を 1 0 H A U の H 3 N 2 ウイルスと 3 0 分間または 6 0 分間インキュベーションし、その後、5 0 p m o l の A 2 2 による処理を行った。図 3 d に示されるように、ウイルスとの 6 0 分のインキュベーションの後では、A 2 2 の効果は大きくなかった。対照的に、非感染細胞と、ウイルスと 6 0 分間インキュベーションされた細胞との間における差は著しかった（ $p = 0 . 0 0 2 8$ ）。とりわけ、非常に大きい差が、感染細胞と、A 2 2 による処置の前に 3 0 分間だけウイルスとインキュベーションされた細胞との間において観測された。従って、これらの結果は、ウイルス - 宿主細胞受容体の相互作用がその最適条件に達すると、A 2 2 は細胞死を防止することができないことを示唆している。

20

【0292】

細胞に対するウイルスの結合および進入を防止することにおける A 2 2 の効果もまた、顕微鏡観察分析によって明らかにされた。光学顕微鏡観察を使用した図 4 a ~ 図 4 c において見られるように、M D C K 細胞の全体的な形態はウイルス感染により損傷を受けた（図 4 a）。比較において、A 2 2 の存在下では、破壊が阻害され、細胞形態はほとんどが保存された（図 4 b）。さらに、A 2 2 による単なる処理は細胞の形態に影響を及ぼさなかった（図 4 c）。このことは、損傷がウイルスによってのみ引き起こされたことを示す。これらの知見はさらに、C y 3 標識された特異的な抗 H A モノクローナル抗体を使用してウイルスの存在をモニターする免疫蛍光によって立証された。示されるように、ウイルスの存在が感染細胞において明瞭に現れる（図 4 d）が、ウイルスの存在は A 2 2 の添加によってほぼ完全に防止される（図 4 e）。処理されていない細胞は、A 2 2 で処理された細胞と一致するようであった。

30

【0293】

実施例 3

インフルエンザ感染からのインピボでのアプタマーによる保護

インフルエンザ感染（H 3 N 2 P o r t C h a l m e r s 株）に対する A 2 2 アプタマーの保護効果を感染マウスにおいて調べた。

40

【0294】

材料および実験手順

マウス - 1 0 週齢 ~ 1 2 週齢の B A L B / c マウスを H a r l a n L a b o r a t o r i e s (R e h o v o t , イスラエル) から購入した。

【0295】

動物感染 - マウスに、2 . 5 n m o l の A 2 2 アプタマーとともに、または A 2 2 アプタマーを伴うことなく、種々の時間間隔について、1 0 0 H A U の P o r t C h a l m e r s / 1 / 7 3 (H 3 N 2) ウイルスを含有する致死量未満の感染性尿膜液を鼻腔内に接種した。マウスの体重を 2 週間にわたってモニターした。肺におけるウイルス力価を卵

50

力価測定法(19)によって測定した。簡単に記載すると、マウスをウイルス接種後6日目に屠殺し、肺を取り出し、PBS/0.1%BSA(10%w/v)中でホモジネートした。ホモジネーション後、サンプルを遠心分離して、破砕物を除き、-70で貯蔵した。実験当日、解凍した肺ホモジネートを9日目~11日目の孵化卵の尿膜腔に注入した(10倍連続希釈物の100 μ l)。37で48時間のインキュベーションおよび4で一晩のインキュベーションの後、尿膜液を取り出し、ウイルスの存在を血球凝集アッセイにより測定した。これらのアッセイの結果をlogEID₅₀として表した(26)。

【0296】

血球凝集アッセイ - ニワトリの赤血球(CRBC)をAlsevier溶液で希釈し、0.5%の最終濃度にした。アッセイを、50 μ lのサンプルおよび50 μ lの0.5%CRBCを含有するマイクロタイプレートにおいて行った。アッセイの結果を、90分のインキュベーションが終了したときのLogEID₅₀として表した。

【0297】

組織学 - 肺の組織学のために、マウスを7日目に屠殺し、肺を取り出して10%中性緩衝化ホルマリン(pH7.0)に入れた。その後、肺を切片化し、ヘマトキシリンおよびエオシンを用いて染色した。スライドは、何も知らせていない観察者により検鏡された。

【0298】

統計学的分析 - 統計学的分析を、スチューデントt検定を使用することによって行い、p < 0.05を統計学的に有意であると見なした。

【0299】

結果 - A22の抗ウイルス性をウイルス感染の前および後におけるインピボで明らかにした。簡単に記載すると、マウスを、「非処理」、「0日」、「-1日」および「+2日」と呼ばれる4つの群に分けた。各マウスには100HAUのインフルエンザA/Texas/1/77ウイルスが抗原投与された。「0日」群におけるマウスには、ウイルスおよび2.5nmol/mlのA22の混合物が鼻腔内(i.n.)接種された。「-1日」群および「+2日」群におけるマウスには、2.5nmol/mlのA22がウイルス感染の1日前およびウイルス感染の2日後にそれぞれi.n.接種された。インフルエンザ感染を、(i)ウイルス処置後16日間の体重減少；(ii)肺のウイルス力価；(iii)肺の組織学的検査(切片はウイルス接種後7日目に採取された)を含む3つのパラメーターによってモニターした。

【0300】

非感染マウス(図5a)とは対照的に、感染マウスは、単核細胞および崩壊領域の大きな拡大を含む典型的な病理学を示した(図5b)。比較において、A22処置マウスの肺において、特に「0日」群および「-1日」群(それぞれ、図5cおよび図5d)では、はるかに少ない単核細胞浸潤が明らかであり、また、肺胞のほとんどが開いたままであった。興味深いことに、「+2日」群では、損傷部位および非損傷部位の両方を認めることができた(図5e~図5f)。これらの知見は、A22の投与が肺における炎症領域を減少させることを示唆している。さらに、コントロール群と比較した場合、処置群(+2日、0日および-1日)は、著しくより少ない体重低下および増強された回復を示した(図6a)。

【0301】

A22の保護能力もまた、マウスの肺におけるウイルス負荷量を測定する全卵力価測定法(20)を使用して調べた。図6bに示されるように、異なる時間間隔について2.5nmol/mlのA22(125pmol/マウス)で処置されたマウスは、非処置マウスと比較した場合、ウイルス攻撃に対する保護効果を明らかにした。「0日群」における保護効果は最も顕著であり、非処置群と比較した場合、肺のウイルス力価において2以上のlog差(これは99%を越える保護に等しい)で発現した。「+2日」群および「-1日」群の間におけるA22保護効果の大きな差は認められなかった。

【0302】

これらの結果は、A22が、感染前において、また、感染後数日でさえも効果的である

10

20

30

40

50

ことを示唆している。A 2 2 の低い濃度のみがこの保護実験では使用された (n m o l / m l の濃度) ので、A 2 2 の保護効果はさらに増大し得ることが考えられることが理解される。

【 0 3 0 3 】

実施例 4

アプタマー処置は様々なインフルエンザ株による感染に対する保護をもたらす

H A の受容体結合領域は非常に保存された領域であるので、A 2 2 の保護効果が他のインフルエンザ株による感染に対してもまた発現するかどうかを調べることは興味深いことであった。アプタマーの効果、現在利用することができる抗インフルエンザ治療、すなわち、ノイラミニダーゼ阻害剤 (オセルタミビル) の効果と比較することもまた興味深いことであった。

10

【 0 3 0 4 】

材料および実験手順

材料 - オセルタミビルを R o c h e (B a s e l 、スイス) から購入した。

【 0 3 0 5 】

動物および感染手順 - 本明細書中上記に記載されるように行った。

【 0 3 0 6 】

結果

結果が図 7 a に示される。図 7 a は、感染当日での A 2 2 による処置の結果として、3 つのインフルエンザ株に感染したマウスにおける肺のウイルス力価の減少を明らかにしている。A 2 2 が、A / P R / 8 / 3 4 (H 1 N 1)、A / J a p a n e s e / 3 7 (H 2 N 2)、ならびに A / T e x a s / 1 / 7 7 (H 3 N 2) のすべての試験された株による感染を防止することにおいて効率的であることは注目に値する。これらの知見は、図 3 b に示されたインビトロアッセイの結果を裏付けている。A 2 2 とは対照的に、インフルエンザの核タンパク質領域 N P 1 4 7 ~ 1 5 8 をコードするコントロールの無関係なヌクレオチド (配列番号 2 2) はウイルス力価の大きな変化をもたらさなかった。アプタマー A 2 1 が、A 2 2 よりも効果が小さいが、依然として A / T e x a s / 1 / 7 7 (H 3 N 2) の肺ウイルス力価を低下させることができたことは興味深いことである (図 7 b を参照のこと) 。

20

【 0 3 0 7 】

インフルエンザ感染を阻害する A 2 2 アプタマーの能力もまた、現在利用することができる抗インフルエンザ薬の 1 つ (ノイラミニダーゼ阻害剤オセルタミビル) の能力と比較した。この目的のために、A 2 2 およびオセルタミビルの両方を、鼻腔内経路を使用してウイルスとともに 1 回投与した。下記の表 4 に示されるように、2 0 μ g / マウスのオセルタミビル (1 m g / k g 体重) の用量はウイルス力価を 0 . 6 2 l o g E I D 5 0 ほど減少させた。このことはウイルス負荷量における 4 . 1 7 倍の減少を表している。これは、この特定の実験における A 2 2 により影響される 1 . 1 l o g E I D 5 0 ほどの減少 (ウイルス負荷量における 1 0 倍越える減少) と対比される。

30

【表 4】

40

表 4

処置	<i>Alog EID50</i>	減少倍数	保護 (%)
A22	1.11	12.88	92.3
オセルタミビル	0.62	4.17	76.03

【 0 3 0 8 】

これらの結果は、本発明のアプタマー配列についての作用機構、本質的には、ウイルス細胞表面上の H A の受容体結合領域に対する直接的な結合、それにより、宿主細胞に対す

50

るウイルスの結合を妨げ、そして、その結果として、宿主細胞へのウイルス進入を妨げることを示唆している。

【0309】

実施例 5

多数のインフルエンザ株とのアプタマーの交差反応性

多数のインフルエンザ株に対する本発明の A22 アプタマーの交差反応性を、ELISA アッセイを使用して決定した。

【0310】

材料および実験手順 - 実施例 1 に記載される通りに行った。

【0311】

結果

本発明の DNA アプタマーは HA₉₁₋₂₆₁ の保存された配列に基づいて設計されたので、HA₉₁₋₂₆₁ と様々なインフルエンザ株との間での交差反応が ELISA によって明らかにされた。図 8a ~ 図 8e に示されるように、この保存されたペプチドに対して作製された抗体は検討中のすべてのインフルエンザ株と交差反応した。従って、このことは、このペプチドが保存されていることを立証しており、また、本発明のアプタマー薬物の広範囲の潜在的可能性を裏付けている。

【0312】

実施例 6

組換え HA₉₁₋₂₆₁ ペプチドの作製および特長づけ

実験の手順

RT-PCR による HA₉₁₋₂₆₁ ペプチドの作製 - インフルエンザ株 A / Port Chalmers / 1 / 73 の総 RNA を単離し、HA タンパク質の残基 91 ~ 97 および残基 255 ~ 261 に対応する 2 つのプライマー (それぞれ、5' - GGATCCA GCAAAGCTTTCAGCAACTGT - 3' (配列番号 20) および 5' - GTCGACGCGCATTTTGAAGTAACCC - 3' (配列番号 21))、ならびに Taq ポリメラーゼ (Invitrogen、Carlsbad、CA) を用いる逆転写酵素 (RT) - PCR のために使用した。得られた PCR 生成物 (これは HA タンパク質の球状領域の一部 (91 ~ 261 のアミノ酸) をコードする) を DNA 配列分析によって確認した。その後、PCR 生成物を遺伝子産物の大腸菌における過剰発現のために pQE 30 プラスミド (Qiagen、Hilden、ドイツ) にクローン化した。5 時間の IPTG 誘導によって得られた過剰発現ペプチドを、Ni-NTA カラム (Qiagen) を使用して精製した。PCR 生成物はさらに、マウスの筋肉における注射のために、pCDNA3.1 HisC プラスミド (Invitrogen、Carlsbad、CA) にクローン化された。免疫化研究のために、プラスミド DNA を、Endofree プラスミドギガキット (Qiagen) を使用して増幅した。

【0313】

結果

インフルエンザウイルス RNA の HA₉₁₋₂₆₁ 領域をコードする DNA 構築物を哺乳動物発現および細菌発現のために作製した。この目的のために、HA₉₁₋₂₆₁ 配列をコードする cDNA フラグメントを、インフルエンザ HA のアミノ酸残基 91 ~ 97 およびアミノ酸残基 255 ~ 261 (それぞれ配列番号 20 及び 21) に対応するプライマーを使用して A 型インフルエンザウイルス (すなわち、H3N2) から PCR によって増幅した。得られた PCR 生成物を pQE30 プラスミドにクローン化し、その N 末端部分を、精製のために、読み枠を一致させて 6 個の His 残基で修飾した。過剰発現させ、精製した HA₉₁₋₂₆₁ タンパク質フラグメントは、図 9a に示されるように、12% SDS-PAGE において 25 kDa のバンドとして移動した。

【0314】

HA₉₁₋₂₆₁ の抗原性を、HA₉₁₋₁₀₈ ペプチドに対して惹起された特異的なウサギ抗体を用いた ELISA アッセイ、または、インフルエンザウイルスに対するウサ

10

20

30

40

50

ギ抗血清を用いたE L I S Aアッセイによって確認した(図9b)。

【0315】

DNAワクチン接種のために、HA₉₁₋₂₆₁ペプチドをコードするPCR生成物をpHA₉₁₋₂₆₁哺乳動物発現ベクターにクローン化し、CMVプロモーターのもとでマウス細胞において発現させた。PCR生成物のBamHI/SalIフラグメントをDNA配列決定分析によって確認し、その後、読み枠を一致させたATG開始コドンおよびN末端の6個のHis残基のもとでpCDNA3.1HisCベクターのBamHI/XhoI部位に挿入した。

【0316】

実施例7

ペプチドおよびDNAのワクチン接種により生じる体液性免疫応答

材料および実験手順

免疫化手順および感染手順 - 8匹~10匹のマウスからなる群を、HA₉₁₋₂₆₁をコードするプラスミドDNAの100μgで筋肉内(i.m.)に免疫化した。マウスに、最初の免疫化のために使用されたのと同じ量の抗原を使用して、3週間間隔で2回の追加抗原刺激を行った。

【0317】

HA₉₁₋₂₆₁ペプチドに対する免疫化のために、50μlのPBSにおいて動物あたり50μgのペプチドを、エーテルで軽く麻酔したマウスの鼻孔に(i.n.)投与し、または、完全フロイントアジュバント(CFA)における同じペプチドで肉趾において注射した。ペプチドワクチンおよびDNAワクチンの混合使用(組み合わせられたDNAプライミング-タンパク質追加抗原刺激)のために、マウスには、2回のi.m.注射がプラスミドpHA₉₁₋₂₆₁を使用して行われ、次いで、HA₉₁₋₂₆₁ペプチドによる鼻腔内への追加抗原刺激が行われた。

【0318】

マウスの感染を、マウスあたり1HAUのインフルエンザウイルスを含有する感染性尿膜液の、軽いエーテル麻酔のもとでの鼻腔内接種によって最後の追加抗原刺激の1ヶ月後に行った。

【0319】

血清および肺ホモジネートの調製 - 免疫化マウスにおける特異的な抗インフルエンザ抗体の産生を測定するために、IgGアッセイ用の血清を、2回目および3回目の免疫化の3週間後に集められた血液から作製した。(0.1%BSA/PBSに懸濁された)肺ホモジネートに由来する上清液をIgAアッセイおよび肺ウイルス力価の測定のために集めた。

【0320】

統計学的分析 - 統計学的分析を、Stat-ViewIIソフトウェア(Abacus Concepts、Berkeley、CA)を使用して行った。フィッシャーPLSD検定を、確率(p)値を計算するために利用した。結果が、少なくとも2回の繰り返された独立した実験の平均および標準誤差として表される。

【0321】

結果

異なるワクチン接種法により誘導される体液性免疫応答 - 本明細書中上記に記載されるHA₉₁₋₂₆₁のペプチド調製物およびDNA調製物を、抗体を誘導するその能力を測定するためにマウスに投与した。

【0322】

最後の免疫化の2週間後、HA₉₁₋₂₆₁ペプチドまたはプラスミドpHA₉₁₋₂₆₁のいずれかで免疫化されたマウス(群あたり2匹のマウス)に由来する肺ホモジネートをIgAレベルの測定のために集めた。免疫化マウスにおけるIgGレベルを測定するために、IgGアッセイを行った。簡単に記載すると、血清を3回目の免疫化の3週間後に集められた血液から調製した。各群のサンプルを一緒にプールし、完全なウイルスを認

10

20

30

40

50

識する抗体だけでなく、 $HA_{9,1-261}$ ペプチドと反応し得る抗体の存在について E L I S A によって分析した。図 10 a に示されるように、 $HA_{9,1-261}$ ペプチドを用いた肉趾による免疫化のみが I g G 抗体を誘発させ、その一方で、 $HA_{9,1-261}$ ペプチドを認識する検出可能な I g G 抗体は鼻腔内免疫化の後では認められなかった。しかしながら、完全なウイルスを認識する著しいレベルの I g G 抗体 (図 10 b) が、アジュバントを何ら伴わない $HA_{9,1-261}$ ペプチドを用いた鼻腔内免疫化の後において依然として認められた。

【0323】

図 10 c に示されるように、 $HA_{9,1-261}$ ペプチドによって誘導される抗体は、H 1 N 1 (P R / 8 / 3 4) および H 2 N 2 (J a p a n e s e / 5 7) を含む異なるインフルエンザウイルス株との交差反応性を示した。

10

【0324】

興味深いことに、DNA プラスミド $pHA_{9,1-261}$ を用いた免疫化は抗体応答を誘発しなかった (図 10 a)。

【0325】

図 11 a に示されるように、 $HA_{9,1-261}$ ペプチドまたは $pHA_{9,1-261}$ プラスミドのいずれも、このペプチドフラグメントを認識する I g A 抗体の産生を誘発することができなかった。しかしながら、 $HA_{9,1-261}$ ペプチドで免疫化されたマウスは、完全なウイルスを認識する著しいレベルの I g A 抗体を産生した (図 11 b)。対照的に、I g A 応答が、 $pHA_{9,1-261}$ プラスミドで免疫化されたマウスでは検出されなかった。

20

【0326】

その後、相乗的または付加的な抗体応答をもたらす $HA_{9,1-261}$ ペプチドおよび DNA の両方の能力を検討した。この目的のために、DNA プライミングおよびその後のタンパク質追加抗原刺激による免疫化法を行った。図 10 a ~ 図 10 c および図 11 a ~ 図 11 b に示されるように、DNA およびペプチドワクチンの組み合わせられた注射は、完全なウイルスに対する著しいレベルの I g G 抗体および I g A 抗体を誘発した。しかしながら、 $HA_{9,1-261}$ タンパク質フラグメント単独での注射と比較した場合、明らかな付加的な効果はなかった。

【0327】

従って、これらの結果は、本発明の教示に従って作製されたペプチドワクチンおよび DNA ワクチンはともに体液性免疫応答を誘導することを示しており、しかし、それをコードする DNA と比較した場合、著しくより大きい抗体産生がペプチドによる免疫化のときに明らかであったことを示している。

30

【0328】

さらに、異なるインフルエンザ株との I g G 抗体の交差反応性は、HA 分子の $HA_{9,1-261}$ 球状領域が万能的なワクチン接種をもたらし得ることを示唆している。

【0329】

I g A 抗体および I g G 抗体を誘導する本発明のワクチンの能力は特に重要である。これは、I g G は血清中に産生されると考えられる一方で、I g A 抗体は、重要な局所的抗インフルエンザ効果を発揮し得る肺において主に産生されるからである。これらの結果は、気道疾患では、ワクチン保護が気道分泌 I g A の増大と相関するという知見 [L u e (1 9 8 8) 、 J . I m m u n o l . 、 1 4 0 : 3 7 9 3 ~ 3 8 0 0 ; N e d r u d (1 9 8 7) 、 J . I m m u n o l . 、 1 3 9 : 3 4 8 4 ~ 3 4 9 2] に照らしてさらに強められる。

40

【0330】

実施例 8

ペプチドおよび DNA のワクチン接種により生じる細胞性免疫応答

材料および実験手順

脾臓細胞増殖アッセイ - B A L B / c マウスを、上記で記載されたように 3 週間の間隔

50

で、アジュバントを伴うことなく $50 \mu\text{g} / 50 \mu\text{l}$ の HA_{91-261} ペプチドで (i.n.) 免疫化し、または、PBS における $100 \mu\text{g}$ の pHA_{91-261} プラスミドで (i.m.) 免疫化した。脾臓を3回目の免疫化の14日後に解剖し、 HA_{91-261} ペプチドに対する増殖応答を調べた。細胞を、 5×10^5 細胞/ウエルを RPMI - HEPE S (Sigma、St. Louis、米国) に含有する 0.2 ml の培養物の三連を使用して、96ウエル平底プレート (Nunc、デンマーク) において培養した。脾臓細胞を示された濃度の HA_{91-261} ペプチドまたは不活性化された精製ウイルスで刺激し、48時間培養した。細胞を 1 mCi (37 Bq) の [^3H]チミジン (Amersham Pharmacia、英国) で一晚パルス処理した。チミジン取り込みを Packard - カウンターで測定した。

10

【0331】

サイトカインアッセイ - 抗体および精製サイトカインを Phamingen (San Diego、CA) から得た。精製された抗サイトカイン捕獲 mAb を、炭酸塩緩衝液 (0.1 M NaHCO_3 、 $\text{pH} 8.2$) において $2 \mu\text{g} / \text{ml}$ (ラット抗マウス IL - 4) または $4 \mu\text{g} / \text{ml}$ (ラット抗マウス IL - 2、IL - 10 および IFN -) に希釈して、ELISA プレートに被覆し、4 で一晚インキュベーションした。PBS - Tween (0.05% の Tween - 20 を含有する 10 mM PBS) で洗浄した後、プレートを、 10% ウシ胎児血清 (Biological Industries、イスラエル) を含む PBS を用いて、ウエルあたり $200 \mu\text{l}$ で室温で2時間でブロッキング処理した。標準サンプルおよび希釈サンプルをウエルに加え、4 で一晚インキュベーションした。プレートを洗浄し、PBS / 10% 血清におけるビオチン化抗サイトカイン検出 mAb を各ウエルに1時間加えた。その後、ペルオキシダーゼコンジュゲート化アビジンを加え、アッセイを、ELISA について記載された工程と同じ工程を使用して進めた。サイトカインを、上記のように捕捉および検出された精製サイトカインの標準曲線との比較によって定量した。

20

【0332】

細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) アッセイ - CTL 殺傷アッセイを、本質的には、Zweierink 他 (1997、Eur. J. Immunol.、7: 630 ~ 635) によって記載されるように行った。簡単に記載すると、 HA_{91-261} ペプチドおよび/または pHA_{91-261} DNA で免疫化されたマウスに由来する脾臓細胞を、インフルエンザ A / Texas / 77 ウイルスをインビトロ感染させた同系の実験未使用の脾臓細胞で5日間刺激した。P815 標的細胞 (ATCC TIB 64) を、RPMI + HEPE S (n - (2 - ヒドロキシエチル) ピペラジン n' - (2 - エタンスルホン酸)) において、 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ で、放射性クロム酸ナトリウム (^{51}Cr 、 10^6 個の細胞に対して $5 \mu\text{Ci}$) およびインフルエンザウイルスと90分間インキュベーションした。エフェクター脾臓細胞を集め、洗浄し、徹底的に洗浄された標的細胞と様々なキラー対標的比で 37°C において5時間インキュベーションした。標的細胞の溶解を培地への ^{51}Cr 放出によってモニターし、自然放出についての補正の後の総放出 (これは 1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) による標的細胞の溶解によって測定される) の百分率として表した。

30

40

【0333】

結果

HA_{91-261} による増殖性脾臓細胞応答の誘導 - Tヘルパー活性を生じさせる際の効率を評価するために、免疫化マウスの脾臓における細胞性免疫応答をチミジン取り込みにより調べた。図12aに示されるように、ペプチド免疫化マウスから得られた脾臓細胞は、 HA_{91-261} ペプチドと同時にインキュベーションされたとき、非常に増殖した。興味深いことに、 HA_{91-261} ペプチドに対するこの細胞応答は、示された濃度の HA_{91-261} ペプチド (すなわち、 $5 \mu\text{g} / \text{ml} \sim 20 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、ならびに $3.1 / 5 \mu\text{g}$ 、 $4.7 / 10 \mu\text{g}$ および $6.2 / 20 \mu\text{g}$ の刺激) との相互作用によって示されるように用量依存的であった。 HA_{91-261} ペプチドで免疫化されたマウスはまた、

50

完全なウイルスに対する正の増殖応答を示した(図12b)。対照的に、DNAフラグメントで免疫化されたマウスから得られた脾臓細胞において観測された増殖応答はほとんど検出できなかった。組み合わせられたDNAプライミング-タンパク質追加抗原刺激のとき、正の応答を完全なウイルスに対してのみ認めることができ、そして、この場合でさえも、その応答は、HA₉₁₋₂₆₁ペプチド単独で得られた応答よりも大きくなかった(図12b)。

【0334】

HA₉₁₋₂₆₁ペプチドによる免疫化の後で産生されたT細胞サブタイプを特徴づけるために、サイトカイン放出プロファイルを明らかにした。図13a~図13bに示されるように、HA₉₁₋₂₆₁で免疫化されたマウスから得られた脾臓細胞のみが、精製ペプチドおよび完全なインフルエンザウイルスの両方に応答して著しいレベルのIL-2(図13a)およびIFN- γ (図13b)を分泌した。このことは、これらのリンパ球がTh1サブタイプに属することを示す。この細胞サブタイプは抗体依存的な細胞媒介型細胞傷害性および感染細胞のクリアランスに関係づけられる。対照的に、Th2応答を表すIL-4およびIL-10は検出することができなかった(データは示されず)。サイトカイン分泌が、DNAまたはそのペプチドの組合せで免疫化されたマウスから得られた細胞によって全く観測されなかった。

10

【0335】

pHA₉₁₋₂₆₁DNA免疫化によるCTL応答の誘導-CTL記憶細胞を活性化するために、pHA₉₁₋₂₆₁DNA構築物またはHA₉₁₋₂₆₁ペプチドで免疫化されたマウスから得られた脾臓細胞を、インフルエンザウイルスを感染させた抗原呈示細胞で刺激した。得られたエフェクター細胞を、非処置であるか、または様々なエフェクター対標的細胞比でウイルスを感染させた⁵¹Cr標識のP815標的細胞とインビトロで同時インキュベーションした。

20

【0336】

図14a~図14bに示されるように、CTLが、DNA構築物で免疫化されたマウスにおいてウイルス刺激の後でのみ明らかであり、そのような刺激は、ウイルス感染した標的細胞の特異的な溶解をもたらした。そのような応答は、HA₉₁₋₂₆₁ペプチドまたは組み合わせられたDNAプライミング-タンパク質追加抗原刺激で免疫化されたマウスでは観測されなかった。

30

【0337】

DNAワクチン接種により誘導されるCTL活性は、DNAワクチン接種後におけるウイルス抗原に対する好ましいCTL応答を立証する以前の知見[Raz(1996)、Nat'l. Acad. Sci. USA、93:5141~5145; Ulmer(1993)、Science、259:1745~1749]と一致している。例えば、異種ウイルスの攻撃に対するマウスのクラスI限定CTLおよび保護の誘導が、NPまたはHAをコードするプラスミドDNAに関して明らかにされている[Johnson(2000)、J. Gen. Virol.、81:1737~1745]。

【0338】

しかし、これらの結果は、HA分子の同じ領域に対応するDNAフラグメントおよびペプチドフラグメントにより誘発される免疫応答経路の違いを示唆している。

40

【0339】

実施例9

HAペプチド免疫化はインフルエンザウイルス感染から保護する

材料および実験手順

ウイルス抗原投与に対する保護アッセイ-免疫化後1ヶ月目に、免疫化マウスに、1HAU/マウスを含有する感染性尿膜液のi.n.接種物を投与した。5日後、(上記で記載されたように)マウスを屠殺し、肺および血液サンプルを取り出し、-70℃で保存した。アッセイの直前に、肺を解凍し、PBS/0.1%BSA(10%w/v)中でホモジネートし、破砕物を除くために遠心分離した。ウイルス力価を全卵力価測定法[Fay

50

ollie (1991)、J. Immunol.、147:4069~4073]によって測定した。肺ホモジネート(100 μ lの10倍連続希釈物)を9日目~11日目の孵化卵の尿膜腔に注入した。37 $^{\circ}$ Cで48時間のインキュベーションおよび4 $^{\circ}$ Cで一晩のインキュベーションの後、尿膜液を取り出し、ウイルスの存在を、50 μ lの尿膜液と、生理的食塩水における0.5%ニワトリ赤血球の50 μ lとを含有するマイクロタイタープレートにおいて、赤血球凝集によって測定した。結果が、特定のホモジネート希釈度(10 $^{-8}$)における陽性肺の百分率、ならびにLogEID₅₀(20)として表される。

【0340】

結果

HA₉₁₋₂₆₁ペプチドおよび対応するDNAフラグメントpHA₉₁₋₂₆₁の両方によって誘導される正の体液性免疫応答および細胞性免疫応答に照らして、ウイルス抗原投与に対する保護免疫性をもたらすこれらの薬剤の能力を検討した。ペプチドまたはDNA構築物による鼻腔内免疫化または筋肉内免疫化(3週間の間隔での3回の投与)をそれぞれ行った後、マウスを最後の追加抗原刺激の1ヶ月後に1HAUのインフルエンザA/Texas/1/77ウイルスで抗原投与した。5日後、動物を屠殺し、肺における感染性ウイルスの存在を測定した。図15a~図15bに示されるように、DNA構築物またはHA₉₁₋₂₆₁ペプチドのいずれかで免疫化されたマウスは、非免疫化マウスと比較して、ウイルス抗原投与に対する著しいレベルの保護(80%に近い)を明らかにした。しかしながら、DNAおよびペプチドの組み合わせられたワクチン接種は、完全なウイルスに対する著しい細胞性免疫応答を誘発したとしても、保護を誘導しなかった。

10

20

【0341】

これらの結果は、本発明の教示に従って作製されたペプチドワクチン接種およびDNAワクチン接種はともにウイルス感染に対して動物を保護することを示している。

【0342】

本発明を、その具体的実施態様とともに説明してきたが、多くの変形と変更が当業技術者には明らかであることは明白である。したがって、本発明は、本願の特許請求の範囲の精神と広い範囲内に入っているこのような変形と変更をすべて含むものである。本明細書に記載のすべての刊行物、特許及び特許願は、あたかも、個々の刊行物、特許又は特許願各々が、本願に具体的にかつ個々に参照して示されているように、本願に援用するものである。さらに、本願における任意の文献の引用もしくは確認は、このような文献が本発明に対する従来技術として利用できるという自白とみなすべきではない。

30

参考文献のリスト

(追加の参考文献は本文中に引用されている)

1. Demichelli V., Jefferson T., Rivetti D., Deeks J. Prevention and early treatment of influenza in healthy adults. *Vaccine*, 18, 957-1030 (2000).
2. Wood AJ., Prevention and treatment of influenza. *The New England Journal of Medicine*. 343, 1778-1787 (2000).
3. Gravenstein S., Davidson EH. Current strategies for management of influenza in the elderly population. *Clin. Infect.Diseases*. 35; 729-37 (2002). 10
4. Skehel JJ., Cross K., Steinhauer D., Wiley DC. Influenza fusion peptides. *Biochem.Society Transactions*. 29, 623-26 (2001).
5. Skehel JJ., Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The influenza hemagglutinin. *Annu.Rev. Biochem.* 69, 531-69 (2000).
6. Eckert DM., Kim PS. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 777-810 (2001). 20
7. Ellington AD., Szostak JW., In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346, 818-822 (1990).
8. Wagner R., Matrosovich M., Klenk HD. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infection. *Rev.Med.Virol.* 12, 159-166 (2002)
9. Wilson IA., Skehel JJ., Wiley DC. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 A resolution. *Nature*. 289, 366-373 (1981). 30
10. Edwards MJ., Dimmock NJ. Hemagglutinin 1- specific immunoglobulin G and Fab molecules mediate postattachment neutralization of an early fusion event. *J Virol.* 75, 10208-10218 (2001).
11. Edwards MJ., Dimmock NJ. A haemagglutinin (HA1)-specific Fab neutralizes influenza A virus by inhibiting fusion activity. *J Virol.* 82, 1387-1395 (2001). 40
12. Edwards MJ., Dimmock NJ. Two influenza a virus-specific Fabs neutralize by inhibiting virus attachment to target cells, while

- neutralization by their IgGs is complex and occurs simultaneously through fusion inhibition and attachment inhibition. *Virology*. 278, 423-435 (2000).
13. Jeon SH., Arnon R. Immunization with influenza virus hemagglutinin globular region containing the receptor-binding pocket. *Viral Immunol.* 15, 165-176, (2002).
 14. Muller GM., Shapira M., Arnon R. Anti-influenza response achieved by immunization with a synthetic conjugate. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 79, 569-573, (1982). 10
 15. Arnon R, Horwitz RJ. Synthetic peptide based vaccines as vaccines. *Curr.Opin.Immunol.* 4, 449-53, (1992).
 16. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science.* 249, 505-510 (1990).
 17. Sekkai D, Dausse E., Di Primo C., Darfeuille F., Boiziau C., Troulme JJ. In vitro selection of DNA aptamers against the HIV-1 TAR RNA hairpin. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 12, 265-71 (2002) 20
 18. Matzura O., Wennborg A. RNA draw: an integrated program for RNA secondary structure calculation and analysis under 32-bit Microsoft Windows. *Computer applications in the Biosciences.* 12, 247-249 (1996).
 19. Levi R., Bear-Tzahar T., Arnon R. Microculture virus titration- a simple colourimetric assay for influenza virus titration. *J.Virol.Methods.* 52, 55-64 (1995). 30
 20. Barret T., Inglis SC., Growth purification and titration influenza viruses, in virology: a practical approach (Ed. Mahy WJ) IRL pres, Washington DC, pp. 119-151.
 21. Gerhard W. The role of the antibody response in influenza virus infection, 171-190.
 22. Mozdzanowska K., Furchner M., washko G., Mozdzanowski J., Gerhard W. A pulmonary influenza virus infection in SCID mice can be cured by treatment with hemagglutinin-specific antibodies that display very low virus-neutralizing activity *in vitro*. *J. Virol.* 71, 4347-4355 (1997). 40

23. Brown LE., Murray JM., White DO., Jackson DC. An analysis of the properties of monoclonal antibodies directed to epitopes on influenza virus haemagglutinin. *Arch.Virol.* 114, 1-26 (1990).
24. Vanlandschoot P., Beirnaert E., Barrere B., Calder L., Millar B., Wharton S., Minjou W., Fiers W. An antibody which binds to the membrane – proximal end of influenza virus haemagglutinin (H3 subtype) inhibits the low-pH-induced conformational change and cell-cell fusion but does not neutralize virus. *J.Gen.Virol.* 79, 1781-1791 (1990).
25. Brody EN., Gold L., Aptamers as therapeutic and diagnostic agents. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 74, 5-13 (2000).
26. Hesselberth J., Robertson MP., Jhaveri S., Ellington AD., *In vitro* selection of nucleic acids for diagnostic applications. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 74, 15-25 (2000).

10

20

【配列表フリーテキスト】

【0343】

配列番号 2 ~ 10, 13, 14 および 15 は合成ペプチドの配列である。配列番号 11 および 12 は合成オリゴヌクレオチドの配列である。配列番号 16 ~ 22 は一本鎖 DNA オリゴヌクレオチドの配列である。

【図面の簡単な説明】

【0344】

【図1a】本発明の核酸分子に取り込むことができる核酸の修飾を表す、Eaton (1997)、Curr. Opin. Chem. Biol., 1:10~16 から改変された概略図であり、5位が修飾された 2'-デオキシウリジンおよびウリジンを示す。 30

【図1b】本発明の核酸分子に取り込むことができる核酸の修飾を表す、Eaton (1997)、Curr. Opin. Chem. Biol., 1:10~16 から改変された概略図であり、8位が修飾された 2'-デオキシアデニン、アデニンおよびグアノシンを示す。

【図1c】本発明の核酸分子に取り込むことができる核酸の修飾を表す、Eaton (1997)、Curr. Opin. Chem. Biol., 1:10~16 から改変された概略図であり、2'-修飾ウリジンを示す。

【図2】図2a~図2bは、ELISAによって測定されたときの、本発明の教示に従って作製されたインフルエンザ特異的アプタマー (A21およびA22) およびコントロールの一本鎖アプタマーの完全なインフルエンザウイルスまたは HA₉₁₋₂₆₁ ペプチドに対する結合レベルを表すヒストグラムである。図2c~図2eは、DNA draw ソフトウェア (18) によって作製されるような、A22 アプタマーの提案される二次構造 (図2c)、A21 アプタマーの提案される二次構造 (図2d)、および、NP147~158 をコードするコントロールオリゴヌクレオチドの提案される二次構造 (図2e) の概略図である。 40

【図3a-b】図3aは、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミド (MTT) アッセイを使用して測定されたときの、インフルエンザウイルスで処理された MDC K 細胞の生存性に対する本発明の A22 アプタマーの効果を示す用量応答曲線である。図3bは、H3N2 感染 MDC K 細胞および H2N 50

2 感染 M D C K 細胞に対する本発明の (それぞれ 5 0 p m o l での) A 2 1 アプタマーおよび A 2 2 アプタマーの保護効果を表すヒストグラム表示である。

【図 3 c - d】図 3 c は、M T T アッセイによって測定されたときの、宿主細胞タンパク質とは無関係な A 2 2 の細胞保護効果を図示するヒストグラム表示である。図 3 d は、M T T アッセイによって測定されたときの、感染 M D C K 細胞に対する A 2 2 の保護効果を図示するヒストグラムである。

【図 4】インフルエンザによる細胞の感染に対する A 2 2 の効果を表す顕微鏡写真である (図 4 a ~ 図 4 f)。

【図 5】A 2 2 の存在下または非存在下でのインフルエンザウイルス感染 B A L B / c マウスの肺切片を示す顕微鏡写真である (図 5 a ~ 図 5 f)。

【図 6 a】体重によって測定されたときのインフルエンザウイルス感染マウスに対する A 2 2 の保護効果を図示するグラフである。

【図 6 b】肺のウイルス負荷量によって測定されたときのインフルエンザウイルス感染マウスに対する A 2 2 の保護効果を図示するグラフである。

【図 7】図 7 a は、A 2 2 アプタマーを使用したときの、インフルエンザのいくつかの株を (それぞれ 1 0 H A U で) 用いたマウス感染の阻害を表すグラフである。図 7 b は、本発明の A 2 1 アプタマーおよび A 2 2 アプタマー、ならびにコントロールのオリゴヌクレオチドおよび抗インフルエンザ薬オセルタミビルを使用したときの、A / T e x a s / 1 / 7 7 インフルエンザ株によるマウス感染の阻害を表すグラフである。

【図 8 a - d】E L I S A によって測定されたときの、組換え H A _{9 1 - 2 6 1} フラグメントに対する抗体と様々なインフルエンザウイルス株との交差反応効果を図示するグラフである。

【図 8 e】E L I S A によって測定されたときの、組換え H A _{9 1 - 2 6 1} フラグメントに対する抗体と様々なインフルエンザウイルス株との交差反応効果を図示するグラフである。

【図 9】図 9 a は、N i - N T A カラムによって精製された H A _{9 1 - 1 0 8} ペプチドの S D S - P A G E 分析を表す顕微鏡写真である。図 9 b は、E L I S A アッセイによって測定されたときの H A _{9 1 - 1 0 8} ペプチドの抗原性を表すグラフである。

【図 1 0】図 1 0 a ~ 図 1 0 b は、E L I S A アッセイによって測定されたときの本発明の H A _{9 1 - 2 6 1} ペプチドの免疫原性を表すグラフ表示である。図 1 0 c は、抗 H A _{9 1 - 2 6 1} ペプチドと多数のインフルエンザウイルス株との交差反応性を表すヒストグラムである。

【図 1 1】肺ホモジネート物の E L I S A アッセイによって測定されたときの、H A _{9 1 - 2 6 1} ペプチド (黒三角) または D N A ワクチン (黒四角) によるマウスの鼻腔内免疫化の後における本発明の H A _{9 1 - 2 6 1} ペプチド (図 1 1 a) または A / T e x a s / 7 7 ウイルス (図 1 1 b) との反応性を有する I g A 抗体の産生を図示するグラフである (図 1 1 a ~ 図 1 1 b)。

【図 1 2】H A _{9 1 - 2 6 1} ペプチド (図 1 2 a) またはウイルス粒子 (図 1 2 b) によるインビトロ刺激に应答した H A _{9 1 - 2 6 1} D N A および / または H A _{9 1 - 2 6 1} ペプチドによる免疫刺激マウスから得られた脾臓細胞の増殖を表すヒストグラムである。

【図 1 3】インフルエンザウイルス刺激に应答した脾臓細胞によるサイトカイン分泌を表すヒストグラムである (図 1 3 a ~ 図 1 3 b)。

【図 1 4】本発明のペプチドワクチンおよび / または D N A ワクチンで免疫化されたマウスにおける C T L 应答を表すヒストグラムである (図 1 4 a ~ 図 1 4 b)。

【図 1 5】本発明の p H A _{9 1 - 2 6 1} D N A 構築物またはペプチド構築物で免疫化されたマウスにおける致死量未満のインフルエンザウイルス抗原投与感染に対する保護を表すヒストグラムである (図 1 5 a ~ 図 1 5 b)。

【配列表】

10

20

30

40

SEQUENCE LISTING

<110> Arnon, Ruth
 Ho Jeon, Sung
 Kayhan, Basak
 BEN-YEDIDYA Tamar

<120> NUCLEIC ACID MOLECULES, POLYPEPTIDES, ANTIBODIES AND COMPOSITIONS
 CONTAINING SAME USEFUL FOR TREATING AND DETECTING INFLUENZA
 VIRUS INFECTION

<130> 27165

<160> 22

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> Influenza A virus

<400> 1

Gln Asp Phe Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly
 1 5 10 15

His His Ala Val Pro Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Ile Thr Asn Asp
 20 25 30

Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ser Ser Thr
 35 40 45

Gly Lys Ile Cys Asn Asn Pro His Arg Ile Leu Asp Gly Ile Asn Cys
 50 55 60

Thr Leu Ile Asp Ala Leu Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Gly Phe Gln
 65 70 75 80

Asn Glu Thr Trp Asp Leu Phe Val Glu Arg Ser Lys Ala Phe Ser Asn
 85 90 95

Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Leu Val
 100 105 110

Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Ile Asn Glu Gly Phe Thr Trp Thr
 115 120 125

Gly Val Thr Gln Asn Gly Gly Ser Asn Ala Cys Lys Arg Gly Pro Asp
 130 135 140

Ser Gly Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Tyr Lys Ser Gly Ser Ala
 145 150 155 160

Tyr Pro Val Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Asp Asn Phe Asp Lys
 165 170 175

Leu Tyr Ile Trp Gly Val His His Pro Ser Thr Asp Gln Glu Gln Thr
 180 185 190

Asn Leu Tyr Val Gln Ala Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys Arg
 195 200 205

10

20

30

40

Ser Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Trp Val Arg
210 215 220

Gly Leu Ser Ser Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly
225 230 235 240

Asp Ile Leu Val Ile Asn Ser Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Gly
245 250 255

Tyr Phe Lys Met Arg Thr Gly Lys Ser Ser Ile Met Arg Ser Asp Ala
260 265 270

Pro Ile Gly Thr Cys Ile Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile
275 280 285

Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Ile Thr Tyr Gly Ala
290 295 300

Cys Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met
305 310 315 320

Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg
325

<210> 2
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 2

Ser Lys Ala Phe Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5 10 15

Ser Leu

<210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 3

Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
1 5 10

<210> 4
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 4

10

20

30

Cys Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met
 1 5 10 15

Arg Asn Val

<210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 5

Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Arg Gly Tyr
 1 5 10 15

<210> 6
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 6

Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly
 1 5 10

<210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 7

Gly Thr His Pro Arg Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asn Asp Leu Leu Glu
 1 5 10 15

Asn

<210> 8
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 8

Phe Val Gln Asn Ala Leu Asn Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp
 1 5 10 15

Arg Ala Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys
 20 25

<210> 9
 <211> 17
 <212> PRT

10

20

30

40

<213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Synthetic peptide
 <400> 9
 Phe Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe
 1 5 10 15

Val

<210> 10
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Synthetic peptide
 <400> 10

10

Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg Ser His Arg Gln
 1 5 10 15

Met Val Ala Thr Thr
 20

<210> 11
 <211> 67
 <212> RNA
 <213> Artificial sequence

20

<220>
 <223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 11
 aaauaaccuu cacuaaaggg cgcuaauuug uucagguugg ucuuccuaau augguccaau 60
 aaguuaa 67

<210> 12
 <211> 68
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 12
 aattaaccct cactaaaggg ctgagtcctc aaaccgcaat acactgggtg tatggtcgaa 60
 taagttaa 68

30

<210> 13
 <211> 171
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide
 <400> 13
 Ser Lys Ala Phe Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 1 5 10 15

40

Ser Leu Arg Ser Leu Val Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Ile Asn
20 25 30

Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn Gly Gly Ser Asn Ala
35 40 45

Cys Lys Arg Gly Pro Asp Ser Gly Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu
50 55 60

Tyr Lys Ser Gly Ser Ala Tyr Pro Val Leu Asn Val Thr Met Pro Asn
65 70 75 80

Asn Asp Asn Phe Asp Lys Leu Tyr Ile Trp Gly Val His His Pro Ser
85 90 95

Thr Asp Gln Glu Gln Thr Asn Leu Tyr Val Gln Ala Ser Gly Arg Val
100 105 110

Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly
115 120 125

Ser Arg Pro Trp Val Arg Gly Leu Ser Ser Arg Ile Ser Ile Tyr Trp
130 135 140

Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp Ile Leu Val Ile Asn Ser Asn Gly Asn
145 150 155 160

Leu Ile Ala Pro Arg Gly Tyr Phe Lys Met Arg
165 170

<210> 14
<211> 146
<212> FRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 14

Gly Thr Leu Glu Phe Ile Asn Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly Val Thr
1 5 10 15

Gln Asn Gly Gly Ser Asn Ala Cys Lys Arg Gly Pro Asp Ser Gly Phe
20 25 30

Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Tyr Lys Ser Gly Ser Ala Tyr Pro Val
35 40 45

Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Asp Asn Phe Asp Lys Leu Tyr Ile
50 55 60

Trp Gly Val His His Pro Ser Thr Asp Gln Glu Gln Thr Asn Leu Tyr
65 70 75 80

Val Gln Ala Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser Gln Gln
85 90 95

Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Trp Val Arg Gly Leu Ser

10

20

30

40

100 105 110

Ser Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp Ile Leu
 115 120 125

Val Ile Asn Ser Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Gly Tyr Phe Lys
 130 135 140

Met Arg
 145

<210> 15
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

10

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 15

Gly Thr Leu Glu Phe Ile Asn Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly Val Thr
 1 5 10 15

Gln Asn Gly Gly Ser Asn Ala Cys Lys Arg Gly Pro Asp Ser Gly Phe
 20 25 30

Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Tyr Lys Ser Gly Ser Ala Tyr Pro Val
 35 40 45

Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Asp Asn Phe Asp Lys Leu Tyr Ile
 50 55 60

20

Trp Gly Val His His Pro Ser Thr Asp Gln Glu Gln Thr Asn Leu Tyr
 65 70 75 80

Val Gln Ala Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser Gln Gln
 85 90 95

Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Trp Val Arg Gly Leu Ser
 100 105 110

Ser Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp Ile Leu
 115 120 125

Val Ile
 130

30

<210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 16
 aattaaccct cactaaaggg

20

<210> 17
 <211> 18

40

<212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Single strand DNA oligonucleotide
 <400> 17
 tatggtcgaa taagttaa 18

<210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Single strand DNA oligonucleotide 10
 <400> 18
 aattaaccct cactaaaggg 20

<210> 19
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Single strand DNA oligonucleotide
 <400> 19
 ttaacttatt cgaccata 18

<210> 20
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence 20
 <220>
 <223> Single strand DNA oligonucleotide
 <400> 20
 ggatccagca aagctttcag caactgt 27

<210> 21
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Single strand DNA oligonucleotide
 <400> 21
 gtcgacgcgc attttgaagt aacccc 26
 30

<210> 22
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Single strand DNA oligonucleotide
 <400> 22
 ACTTATCAGC GGACCCGTGC CTTAGTTCG TACTGGTGAT 40

【 図 1 a 】

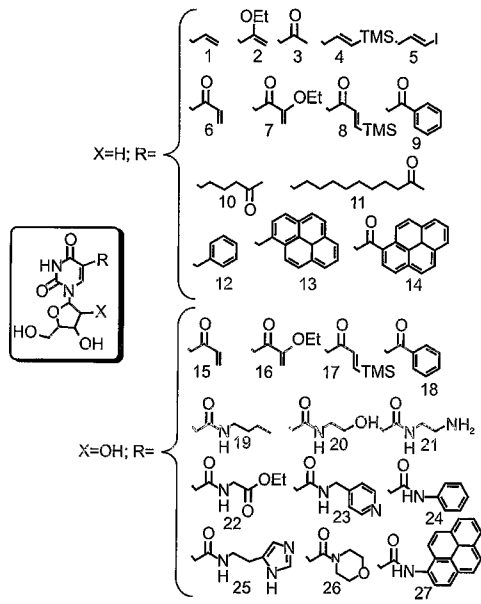


Fig. 1a

【 図 1 b 】

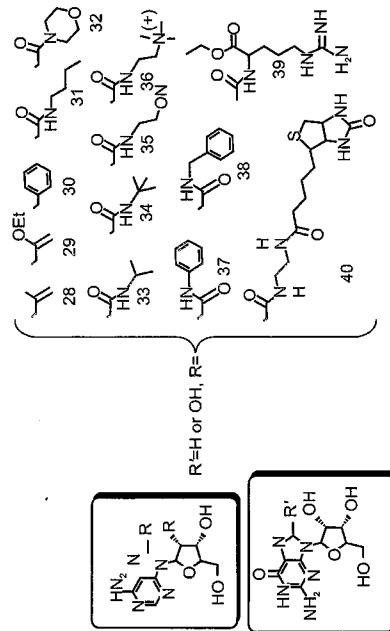


Fig. 1b

【 図 1 c 】

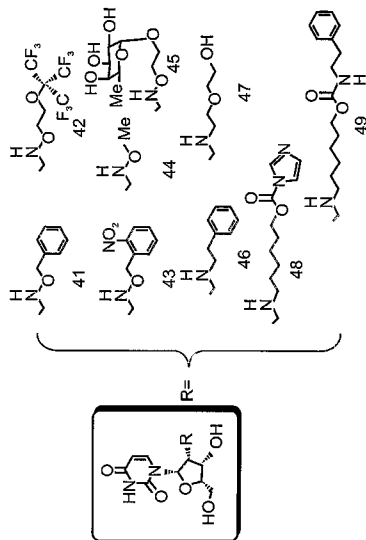


Fig. 1c

【 図 2 】

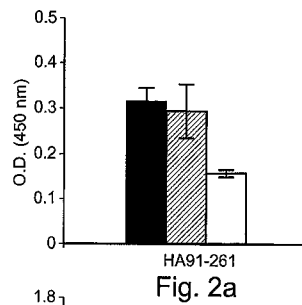


Fig. 2a

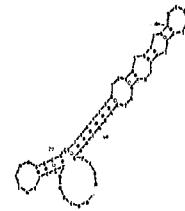


Fig. 2d

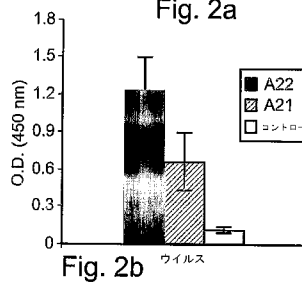


Fig. 2b

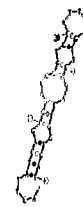


Fig. 2e

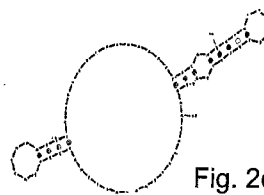


Fig. 2c

【 図 3 a - b 】

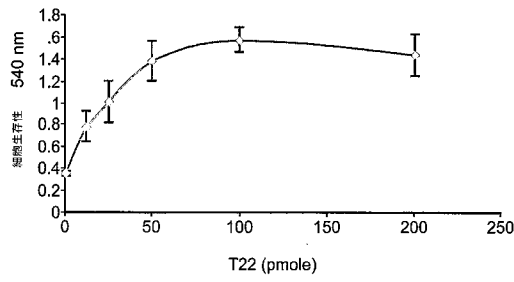


Fig. 3a

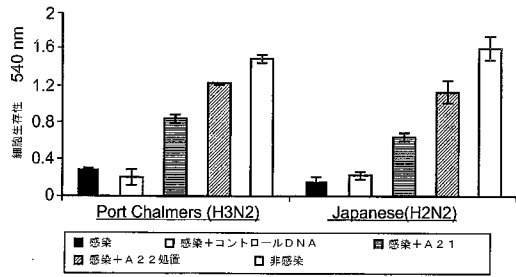


Fig. 3b

【 図 3 c - d 】

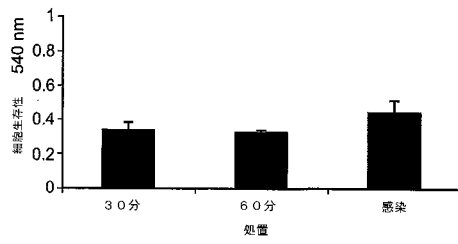


Fig. 3c

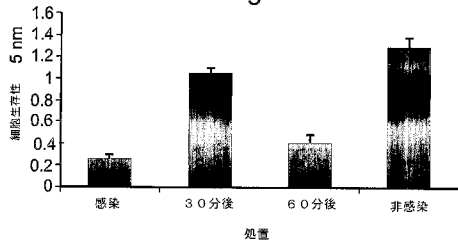


Fig. 3d

【 図 6 a 】

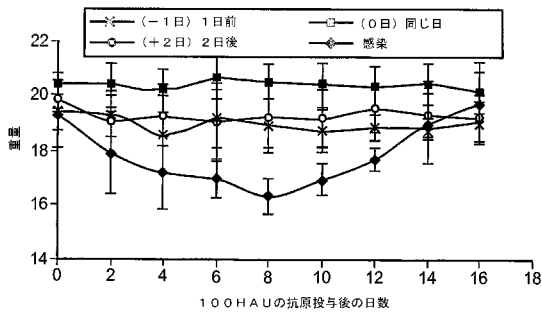


Fig. 6a

【 図 7 】

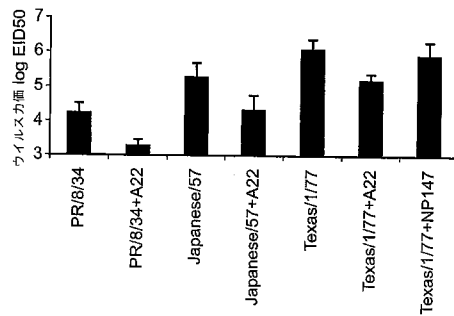


Fig. 7a

【 図 6 b 】

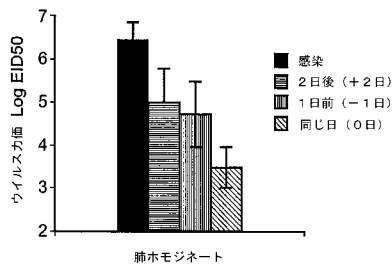


Fig. 6b

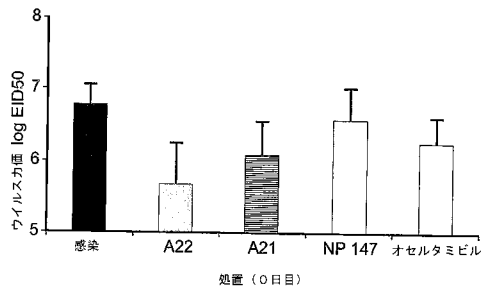


Fig. 7b

【 図 8 a - d 】

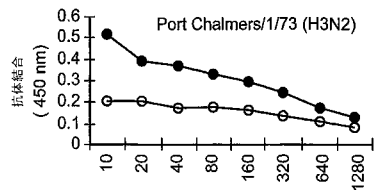


Fig. 8a

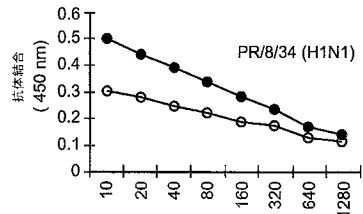


Fig. 8b

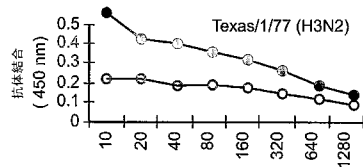


Fig. 8c

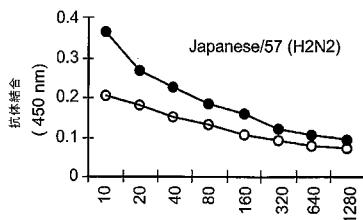


Fig. 8d

【 図 8 e 】

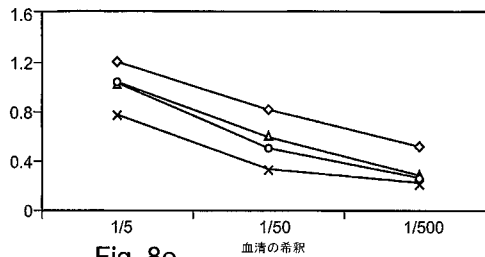


Fig. 8e

【 図 1 0 】

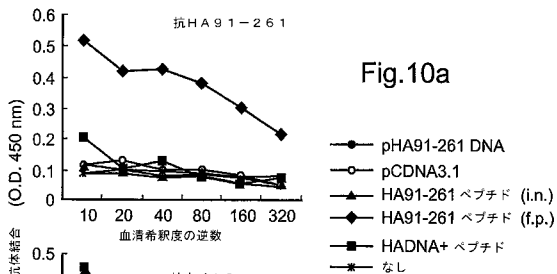


Fig. 10a

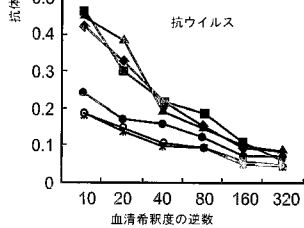


Fig. 10b

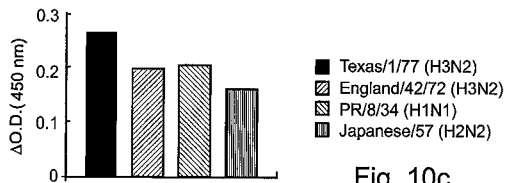


Fig. 10c

【 図 1 1 】

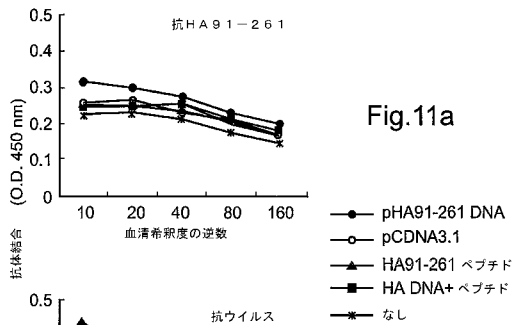


Fig. 11a

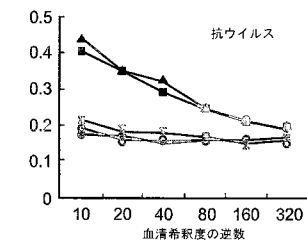
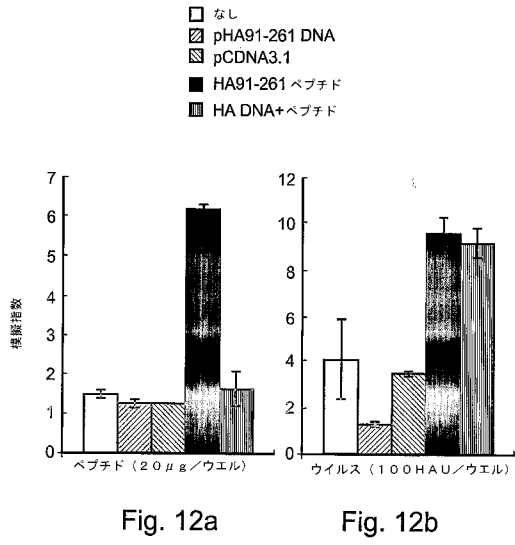
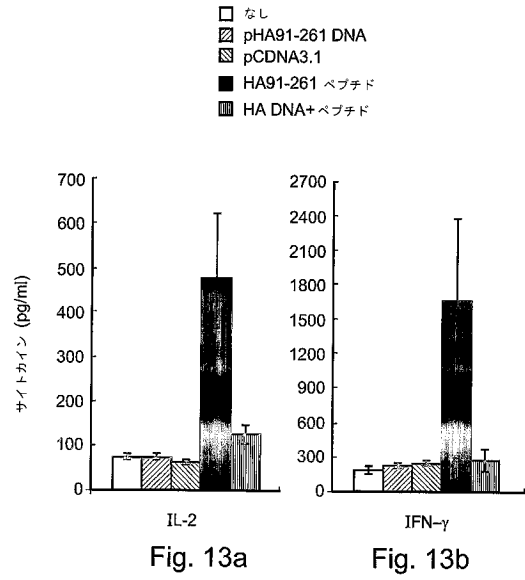


Fig. 11b

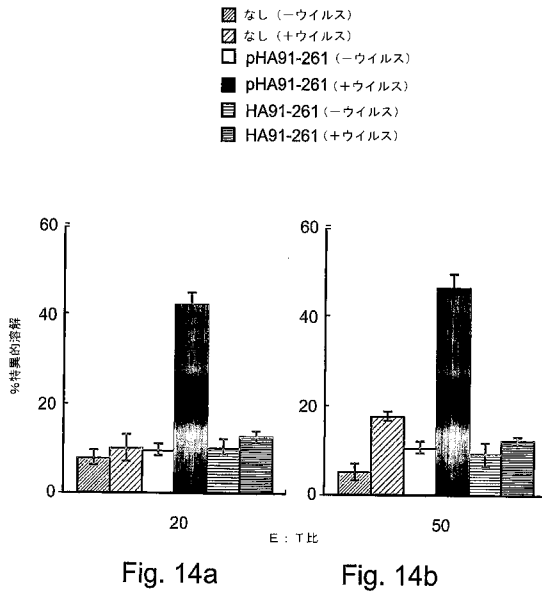
【 図 1 2 】



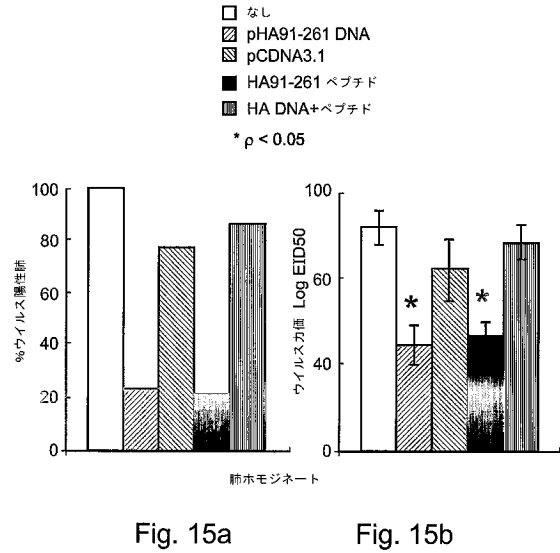
【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】

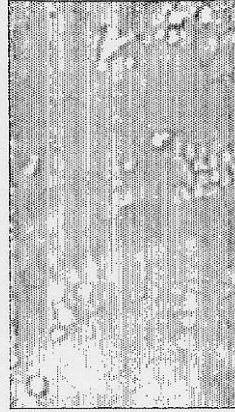
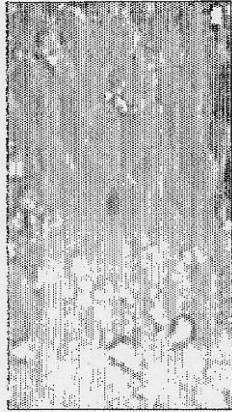
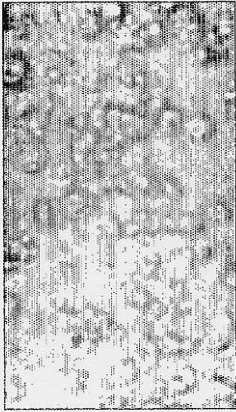


【 図 4 】

感染MDCK

感染MDCK+A22

MDCK+A22

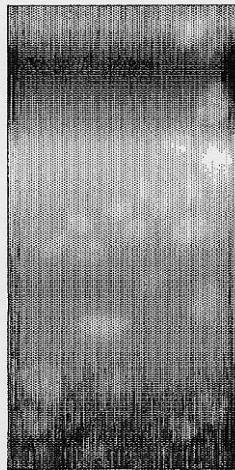
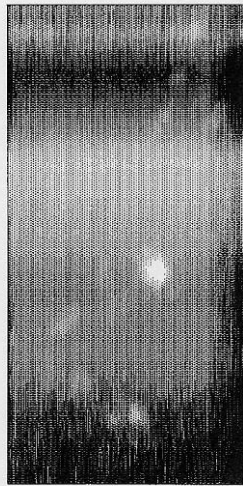


光学顕微鏡で
見た培養物

Fig. 4a

Fig. 4b

Fig. 4c



免疫蛍光染色

Fig. 4d

Fig. 4e

Fig. 4f

【 図 5 】

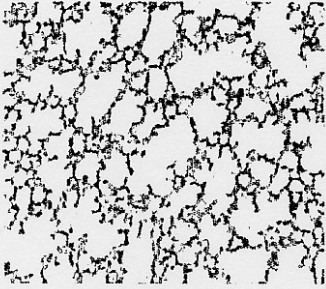


Fig. 5a

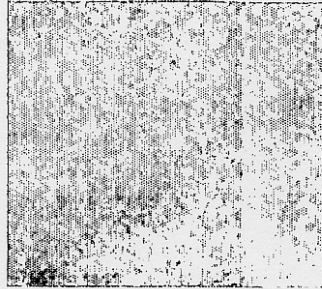


Fig. 5b

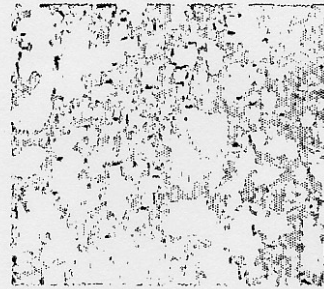


Fig. 5c

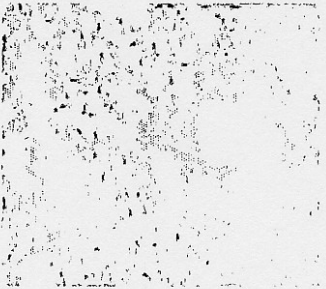


Fig. 5d

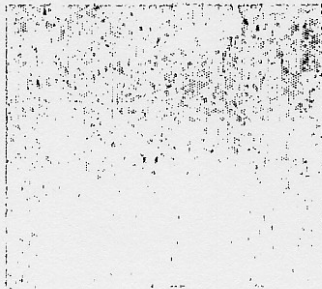


Fig. 5e



Fig. 5f

【 図 9 】

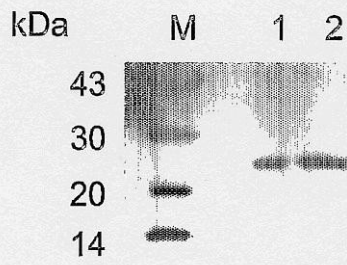


Fig. 9a

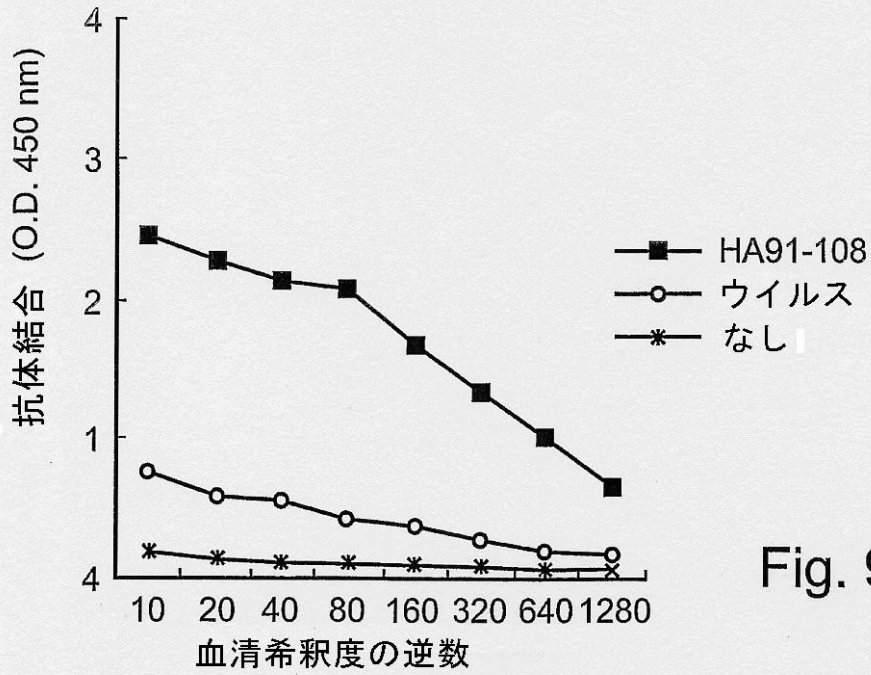


Fig. 9b

【 国際調査報告 】

60600840017



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IL04/00182

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(B) : C12Q 1/68; C07H 21/02, 21/04; A01N 43/04; A61K, 31/70 US CL : 435/6; 536/23.1, 23.72, 24.32; 514/44 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6; 536/23.1, 23.72, 24.32; 514/44		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6,369,208 B1 (COLE et al) 09 April 2002 (09.04.2002), columns 33-34.	1, 3, 8, 10-13, 25, 27, 32, 34-37, 39, 41, 46, and 48-51
X	Lee M.T. Definition of the minimal viral components required for the initiation of unprimed RNA synthesis by influenza virus RNA polymerase. Nucleic Acids Research 2002, Vol 30, No. 2, pages 429-438, especially page 433.	1, 3, 4, 8, 10, 11, 13, 25, 27, 28, 32, 34, 35, 37, 39, 41, 42, 46, 48, 49, and 51
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 04 January 2006 (04.01.2006)		Date of mailing of the international search report 22 FEB 2006
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Louis Humphrey, Ph.D. <i>Valerie Bolt Harris</i> Telephone No. <i>(571) 272-1600</i> <i>for</i>

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

10.7.2006

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/IL04/00182

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-13,25-37,39-51 and 157
- Remark on Protest** The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/IL04/00142

Continuation of Item 4 of the first sheet:
Title exceeds 7 words.

New Title: Compositions of Nucleic Acids for Treating and Detecting Influenza Virus

BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claims 1-13, 25-37, 39-51, and 157, drawn to a polynucleotide that specifically binds an influenza virus polypeptide, a pharmaceutical composition comprising the polynucleotide, and an article-of-manufacture comprising the composition.

Group II, claims 14-24, drawn to a method of generating a polynucleotide that specifically binds an influenza virus polypeptide.

Group III, claims 25, 38, 39, 52, 53, and 89-101, drawn to a pharmaceutical composition comprising an antiviral agent conjugated to a polynucleotide that specifically binds an influenza virus polypeptide.

Group IV, claims 54-68, drawn to a method of treating or preventing influenza virus infection using the polynucleotide that specifically binds an influenza virus polypeptide.

Group V, claims 69-78, drawn to a method of identifying influenza virus in a biological sample using the polynucleotide that specifically binds an influenza virus polypeptide.

Group VI, claims 79-88, drawn to a method of targeting an antiviral agent to an influenza virus infected tissue comprising administering the antiviral agent conjugated to the polynucleotide that specifically binds an influenza virus polypeptide.

Group VII, claims 102-113, drawn to a polypeptide comprising an amino acid sequence at least 60% homologous to SEQ ID NO: 13, and a pharmaceutical composition comprising the polypeptide.

Group VIII, claims 114-120, drawn to an antibody or antibody fragment against a polypeptide that is at least 60% homologous to SEQ ID NO: 13.

Group IX, claims 121-126, and 129-134, drawn to a polynucleotide encoding a polypeptide that is at least 60% homologous to SEQ ID NO: 13, a nucleic acid construct comprising the polynucleotide, and a pharmaceutical composition comprising the polynucleotide.

Group X, claims 128, drawn to a host cell comprising a nucleic acid construct comprising the polynucleotide encoding a polypeptide that is at least 60% homologous to SEQ ID NO: 13.

Group XI, claims 135-140, and 141, in part, drawn to a method of treating or preventing influenza virus infection comprising providing polypeptide that is at least 60% homologous to SEQ ID NO: 13.

Group XII, claim 141, in part, drawn to a method of treating or preventing influenza virus infection comprising providing the polynucleotide encoding a polypeptide that is at least 60% homologous to SEQ ID NO: 13.

4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/IL04/00142

Group XIII, claims 141, in part, drawn to a method of treating or preventing influenza virus infection comprising providing a polypeptide in combination with the polynucleotide encoding the polypeptide.

Group XIV, claims 142-147, and 148, in part, drawn to a method of treating or preventing influenza virus infection comprising providing an antibody or antibody fragment against a polypeptide that is at least 60% homologous to SEQ ID NO: 13.

Group XV, claims 148, in part, drawn to a method of treating or preventing influenza virus infection comprising providing an antibody or antibody fragment in combination with a polynucleotide encoding the antibody or antibody fragment.

Group XVI, claims 149-156, drawn to a method of identifying influenza virus in a biological sample using an antibody or antibody fragment.

This application contains claims directed to more than one species of the generic invention. These species are deemed to lack unity of invention because they are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

In order for more than one species to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid. The species are as follows:

For Groups I-VI, IX, X, and XII-XIV, Applicant is required to select a specific nucleic acid sequence, as exemplified in claims 2, 26, 40, 55, 90, and 157, as well as a specific target polypeptide, as exemplified in claims 4, 5, 15, 28, 29, 42, 43, 57, 58, 71, 72, 81, 82, 92, and 93.

For Groups VII, VIII, XI, and XIII-XVI, Applicant is required to select a specific amino acid sequence as exemplified in claims 103-107, 109-113, 115-120, 130-134, 136-140, 142-147, and 150-154.

For Groups III and VI, Applicant is required to select a specific antiviral agent as exemplified in claim 53.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

MEDLINE, WEST: influenza RNA aptamer, influenza nucleic acid detection, hemagglutinin probe, sialic acid receptor detection; STIC: SEQ ID NO:11

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 6
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/711	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 39/145 (2006.01)	A 6 1 K 39/145	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 37/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	G 0 1 N 33/566	
	G 0 1 N 33/569	L

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, M G, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 アルノン, ルース
イスラエル, 7 6 1 0 0 レホボト, ザ ウェイズマン インスティテュート オブ サイエ
ンス, シャイン レジデンス 9

(72) 発明者 ジオン, スン - ホ
大韓民国京畿道水原市勸善区細柳洞 2, 9 7 9 - 1 0 (1 1 / 3)

(72) 発明者 カヤン, バシャク
トルコ, アンカラ, ウミトイ, フンダ ソカク ナンバー 2 9, エルデムケント シテ
シイ

(72) 発明者 ベン - イエディディヤ, タマル
イスラエル, 7 6 8 0 4 マズケレット バチャ, ハザイト ストリート 6

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA14 BA32 BA51 CA01 CA11 GA11 HA11
4B063 QA01 QA18 QQ10 QQ91 QR32 QR35 QR48 QR55 QS32 QX01
4B065 AA95X AA95Y AB01 AC14 BA01 CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA02 AA07 AA13 AA19 BA01 BA02 BA08 BA18 BA23 CA01
CA53 DA42 MA02 NA14 ZA071 ZA081 ZB021 ZB111 ZB331 ZB332
ZC411 ZC412 ZC751
4C085 AA03 AA13 AA14 AA37 BA55 CC08 DD61 DD62 EE01 EE03
4C086 AA01 AA02 EA16 EA17 EA18 MA01 MA02 MA04 NA14 ZA07
ZA08 ZB02 ZB11 ZB33 ZC41 ZC75
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA01 DA76 DA86 EA29 EA53 FA74

专利名称(译)	核酸分子，多肽，抗体和含有它们的组合物可用于治疗和检测流感病毒感染		
公开(公告)号	JP2006525796A	公开(公告)日	2006-11-16
申请号	JP2006502644	申请日	2004-02-24
[标]申请(专利权)人(译)	耶达研究及发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	耶达研究及发展有限公司		
[标]发明人	アルノンルース ジオンスンホ カヤンバシャク ベンイエディディヤタマル		
发明人	アルノン, ルース ジオン, スン-ホ カヤン, バシャク ベン-イエディディヤ, タマル		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 C07K14/11 C07K16/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K31/7105 A61K31/711 A61K38/00 A61K39/145 A61K39/395 A61K45/00 A61P11/00 A61P29/00 A61P31/12 A61P37/00 A61P43/00 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/569 A61K31/7088 A61K31/7115 A61K47/26 A61K47/48 A61P31/16 C07H21/00 C07K17/00 C12N C12N1/00 C12N15/00 C12N15/115 C12N15/44 C12Q1/70		
CPC分类号	A61P11/00 A61P29/00 A61P31/12 A61P31/16 A61P37/00 A61P43/00 C12N15/115 C12N2310/16 C12N2310/322 G01N33/56983 G01N2333/11 C07H21/04		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.A C07K14/11 C07K16/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A A61K31/7105 A61K31/711 A61K37/02 A61K39/145 A61K39/395.D A61K45/00 A61P11/00 A61P29/00 A61P31/12 A61P37/00 A61P43/00.121 G01N33/53.M G01N33/53.D G01N33/566 G01N33/569.L		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA14 4B024/BA32 4B024/BA51 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/GA11 4B024 /HA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ10 4B063/QQ91 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QS32 4B063/QX01 4B065/AA95X 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065 /BA01 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA19 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA18 4C084/BA23 4C084/CA01 4C084 /CA53 4C084/DA42 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZA071 4C084/ZA081 4C084/ZB021 4C084 /ZB111 4C084/ZB331 4C084/ZB332 4C084/ZC411 4C084/ZC412 4C084/ZC751 4C085/AA03 4C085 /AA13 4C085/AA14 4C085/AA37 4C085/BA55 4C085/CC08 4C085/DD61 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/EA17 4C086/EA18 4C086/MA01 4C086 /MA02 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA07 4C086/ZA08 4C086/ZB02 4C086/ZB11 4C086/ZB33 4C086/ZC41 4C086/ZC75 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA01 4H045 /DA76 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA53 4H045/FA74		
代理人(译)	Kazehaya信明 浅野纪子		
优先权	60/449863 2003-02-27 US		
其他公开文献	JP2006525796A5		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

与细胞流感病毒感染有关的多肽，和能够特异性结合本发明多肽的多核苷酸序列。还提供了使用这种核酸分子，多核苷酸和针对它们的抗体来诊断，治疗和预防流感病毒感染的方法。

シリアルナンバー タンパク質 (アミノ酸位置)	ペプチド配列	配列番号	参考文献
HA (91-108)	Ser-Lys-Ala-Phe-Ser-Asn-Cys-Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala-Ser-Leu	2	米国特許第4474757号
HA (306-318)	Pro-Lys-Tyr-Val-Lys-Gln-Asn-Thr-Leu-Lys-Leu-Ala-Thr	3	Rothbard (1998) Cell 52(4):515-23
HA (305-323)	Cys-Pro-Lys-Tyr-Val-Lys-Gln-Asn-Thr-Leu-Lys-Leu-Ala-Thr-Gly-Met-Arg-Asn-Val	4	Rothbard (1998) Cell 52(4):515-23
NP (335-350)	Ser-Ala-Ala-Phe-Glu-Asp-Leu-Arg-Val-Leu-Ser-Phe-Ile-Arg-gly-Tyr	5	Dyer and Middleton Histocompatibility testing, a practical approach Ed. Rickwood and Hames IRL Press Oxford (1993); Guhukota (1996) Biomolecular Engineering 13:81.
NP (380-393)	Glu-Leu-Arg-Ser-Arg-Tyr-Txp-Ala-Ile-Arg-Thr-Arg-Ser-Gly	6	Dyer and Middleton Histocompatibility testing, a practical approach Ed. Rickwood and Hames IRL Press Oxford (1993); Guhukota (1996) Biomolecular Engineering 13:81.
M1 (220-236)	Gly-Thr-His-Pro-Ser-Ser-Ser-Ala-Gly-Leu-Lys-Asn-Asp-Leu-Leu-Glu-Asn	7	米国特許第5243030号
M1 (79-104)	Phe-Val-Gln-Asn-Ala-Leu-Asn-Gly-Asn-Gly-Asp-Pro-Asn-Asn-Met-Asp-Arg-Ala-Val-Lys-Leu-Tyr-Arg-Lys-Leu-Lys	8	米国特許第5243030号
M1 (64-80)	Phe-Thr-Leu-Thr-Val-Pro-Ser-Glu-Arg-Gly-Leu-Gln-Arg-Arg-Phe-Val	9	米国特許第5243030号
M1 (149-169)	Ala-Thr-Cys-Glu-Gln-Ile-ala-Asp-Ser-Gln-His-Arg-Ser-His-Arg-Gln-Met-Val-ala-Thr-Thr	10	米国特許第5243030号