

(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2020-510682

(P2020-510682A)

(43) 公表日 令和2年4月9日(2020.4.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/11 (2006.01)	C O 7 K 14/11	2 G O 4 5
GO 1 N 33/569 (2006.01)	G O 1 N 33/569 Z N A L	4 B O 6 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	4 C O 8 4
GO 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50 Z	4 H O 4 5
GO 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15 Z	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 38 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-548846 (P2019-548846)
 (86) (22) 出願日 平成29年11月29日 (2017.11.29)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年5月28日 (2019.5.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2017/013843
 (87) 国際公開番号 WO2018/101747
 (87) 国際公開日 平成30年6月7日 (2018.6.7)
 (31) 優先権主張番号 10-2016-0159926
 (32) 優先日 平成28年11月29日 (2016.11.29)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 韓国 (KR)

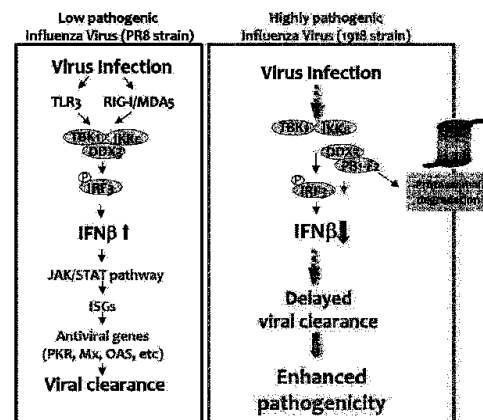
(71) 出願人 519191835
 ダンディ バイオサイエンス インコーポ
 レイテッド
 DANDI BIOSCIENCE IN
 C
 大韓民国 05029 ソウル、クァンジ
 ング、ヌントンロー、120、304ホ
 、(ファヤンードン、バイオメディカル
 サイエンス ビルディング)
 (74) 代理人 110000729
 特許業務法人 ユニাস国際特許事務所
 (72) 発明者 キム、キョンファン
 大韓民国 05834 ソウル、ソンパー
 グ、チョンテロー、24、232-150
 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高病原性インフルエンザウイルス検出用マーカーおよびその用途

(57) 【要約】

本発明は、高病原性ウイルス検出用マーカーおよびその用途に関し、より具体的には、P B 1 - F 2 タンパク質の68番目および69番目のアミノ酸が置換されたタンパク質変異体を含む高病原性ウイルス検出用マーカー、前記タンパク質変異体を測定する製剤を含む高病原性ウイルス検出用組成物およびこれを含む検出キット、前記タンパク質変異体を測定する段階を含む高病原性ウイルスの検出方法、68番目および69番目のアミノ酸が置換されたP B 1 - F 2 タンパク質とD D X 3の結合阻害剤を有効成分として含むインフルエンザAウイルスに対する抗ウイルス用組成物、およびインフルエンザAウイルスに対する抗ウイルス物質のスクリーニング方法に関する。本発明では、1918 P B 1 - F 2 タンパク質と前記ウイルスの高病原性間の相関関係およびその分子機序を最初に解明した結果、インフルエンザウイルスのP B 1 - F 2 タンパク質配列で68番目および69番目のアミノ酸が置換されたタンパク質変異体は、高病原性ウイルスを検出するためのマーカーとして利用可能であり、前記変異体を測定することによって、高病原性の



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号 1 のアミノ酸配列からなる P B 1 - F 2 タンパク質の 6 8 番目および 6 9 番目のアミノ酸が置換されたタンパク質変異体を含む、高病原性ウイルス検出用マーカー組成物。

【請求項 2】

前記タンパク質変異体は、6 8 番目および 6 9 番目のアミノ酸がそれぞれスレオニン (Threonine) およびプロリン (proline) で置換されている、請求項 1 に記載のマーカー組成物。

【請求項 3】

前記タンパク質変異体は、配列番号 2 のアミノ酸配列からなる、請求項 2 に記載のマーカー組成物。

【請求項 4】

前記ウイルスは、インフルエンザウイルスである、請求項 1 に記載のマーカー組成物。

【請求項 5】

配列番号 1 のアミノ酸配列からなる P B 1 - F 2 タンパク質の 6 8 番目および 6 9 番目のアミノ酸が置換されたタンパク質変異体を測定する製剤を含む、高病原性ウイルス検出用組成物。

【請求項 6】

前記タンパク質変異体は、6 8 番目および 6 9 番目のアミノ酸がそれぞれスレオニン (Threonine) およびプロリン (proline) で置換されている、請求項 5 に記載の検出用組成物。

【請求項 7】

前記タンパク質変異体は、配列番号 2 のアミノ酸配列からなる、請求項 6 に記載の検出用組成物。

【請求項 8】

前記ウイルスは、インフルエンザウイルスである、請求項 5 に記載の検出用組成物。

【請求項 9】

前記タンパク質変異体を測定するための製剤は、前記タンパク質に特異的に結合する抗体である、請求項 5 に記載の検出用組成物。

【請求項 10】

請求項 5 に記載の検出用組成物を含む、高病原性ウイルス検出キット。

【請求項 11】

配列番号 1 のアミノ酸配列からなる P B 1 - F 2 タンパク質の 6 8 番目および 6 9 番目のアミノ酸が置換されたタンパク質変異体を測定する段階を含む、高病原性ウイルス検出方法。

【請求項 12】

前記タンパク質変異体は、6 8 番目および 6 9 番目のアミノ酸がそれぞれスレオニン (Threonine) およびプロリン (proline) で置換されている、請求項 11 に記載の検出方法。

【請求項 13】

前記タンパク質変異体は、配列番号 2 のアミノ酸配列からなる、請求項 12 に記載の検出方法。

【請求項 14】

前記ウイルスは、インフルエンザウイルスである、請求項 11 に記載の検出方法。

【請求項 15】

D D X 3 (D E A D box protein 3) と P B 1 - F 2 タンパク質の結合阻害剤を有効成分として含む、インフルエンザ A ウイルスに対する抗ウイルス用組成物であって、

前記 P B 1 - F 2 タンパク質は、配列番号 1 のアミノ酸配列で 6 8 番目および 6 9 番目

10

20

30

40

50

のアミノ酸が置換されている、組成物。

【請求項 16】

前記 DDX3 は、配列番号 3 のアミノ酸配列からなる、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記結合阻害剤は、核酸、化合物、微生物培養液または抽出物、天然物抽出物、ペプチド、基質類似体、アプタマー (aptamer)、および抗体からなる群より選択されるいずれか 1 つである、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 18】

前記 PB1 - F2 タンパク質は、68 番目および 69 番目のアミノ酸がそれぞれスレオニン (Threonine) およびプロリン (proline) で置換されている、請求項 15 に記載の組成物。

10

【請求項 19】

前記 PB1 - F2 タンパク質は、配列番号 2 のアミノ酸配列からなる、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記組成物は、細胞内インターフェロン β (IFN β) の生成を増加させる、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 21】

(a) インビトロ上で細胞に候補物質を処理する段階；

(b) 前記細胞で DDX3 (DEAD box protein 3) と PB1 - F2 タンパク質の結合を測定する段階；および

20

(c) 候補物質非処理群に比べて前記 DDX3 と PB1 - F2 タンパク質の結合を減少させる物質をインフルエンザ A ウイルスに対する抗ウイルス物質として選定する段階を含む、インフルエンザ A ウイルスに対する抗ウイルス物質のスクリーニング方法であって、

前記 PB1 - F2 タンパク質は、配列番号 1 のアミノ酸配列で 68 番目および 69 番目のアミノ酸が置換されている、スクリーニング方法。

【請求項 22】

前記候補物質は、核酸、化合物、微生物培養液または抽出物、天然物抽出物、ペプチド、基質類似体、アプタマー (aptamer)、および抗体からなる群より選択される、請求項 21 に記載のスクリーニング方法。

30

【請求項 23】

前記核酸は、siRNA、shRNA、microRNA、アンチセンス RNA、アプタマー (aptamer)、LNA (locked nucleic acid)、PNA (peptide nucleic acid)、およびモルフォリノ (morpholino) よりなる群から選択される、請求項 22 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 24】

前記 (b) 段階は、ウェスタンブロッティング (western blotting)、免疫沈降法 (immunoprecipitation)、免疫化学染色法 (immunohistochemistry)、および免疫蛍光染色法 (immunofluorescence) からなる群より選択される方法を利用して測定する、請求項 21 に記載のスクリーニング方法。

40

【請求項 25】

前記 PB1 - F2 タンパク質は、68 番目および 69 番目のアミノ酸がそれぞれスレオニン (Threonine) およびプロリン (proline) で置換されている、請求項 21 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 26】

前記 PB1 - F2 タンパク質は、配列番号 2 のアミノ酸配列からなる、請求項 25 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 27】

DDX3 (DEAD box protein 3) と PB1 - F2 タンパク質の結合

50

阻害剤を有効成分として含む抗ウイルス用組成物を個体に投与する段階を含む、インフルエンザAウイルスの治療方法。

【請求項28】

DDX3 (DEAD box protein 3) とPB1-F2タンパク質の結合阻害剤を有効成分として含む抗ウイルス用組成物の、インフルエンザAウイルス治療用途。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、高病原性インフルエンザウイルス検出用マーカーおよびその用途に関し、より具体的には、PB1-F2タンパク質の68番目および69番目のアミノ酸が置換されたタンパク質変異体を含む高病原性ウイルス検出用マーカー、前記タンパク質変異体を測定する製剤を含む高病原性ウイルス検出用組成物およびこれを含む検出キット、前記タンパク質変異体を測定する段階を含む高病原性ウイルスの検出方法、68番目および69番目のアミノ酸が置換されたPB1-F2タンパク質とDDX3の結合阻害剤を有効成分として含むインフルエンザAウイルスに対する抗ウイルス用組成物、およびインフルエンザAウイルスに対する抗ウイルス物質のスクリーニング方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

インフルエンザAウイルス (Influenza A virus; IAV) は、ヒトおよび動物の両方共を感染させることができる病原菌であって、1918年に5000万人の犠牲者を出したスペインかぜを誘発したウイルスである。PB1-F2は、+1 open reading frameからPB1遺伝子部位により暗号化されたインフルエンザウイルスの非構造タンパク質である。現在まで多様な研究を通じてPB1-F2タンパク質は、アポトーシス誘導および先天免疫反応阻害を含む多様な機能を有することが報告され、非常に高病原性のインフルエンザウイルスにおいて病原性に関連したウイルス性を示す重要な因子として知られている。前記タンパク質は、サイトカイン生成を阻害し、二次的バクテリア感染の免疫病理学を増加させ、マウスモデルでインフルエンザAウイルスの感染中にウイルス消滅 (viral clearance) を遅延させることによって発病に寄与すると報告されてきた。

20

30

【0003】

インフルエンザウイルス感染に対する最初の防御機作のうち、第1型インターフェロン (type I IFN) は、宿主の抗ウイルス免疫反応の重要な因子であり、適応免疫反応の調節子である。宿主がインフルエンザのようなウイルスまたは他の病原菌に感染した場合、先天免疫反応を誘導するPRRs (pattern-recognition receptors) と知られた三つの主なタンパク質が病原菌のPAMPs (pathogen-associated molecular pattern) を認識する。このようなPRRは、TLR (Toll-like receptors)、RLRs (retinoic acid inducible gene-1 (RIG-I)-like receptors)、およびNLRs (nucleotide-binding domain-leucine-rich repeat-containing molecules) であり、インフルエンザウイルスに感染した場合、RIG-IがウイルスRNAの主なセンサーとして作用してtype I IFNの生成を誘導する。このような経路でDDX3 (DEAD box protein 3) と他のリン酸化酵素との複合体の形成は、type I IFNの生成誘導に必須なものであると知られている。

40

【0004】

たとえばIFNシステムが強い抗ウイルス活性を有するとしても、インフルエンザウイルスもやはり宿主内でそれらの複製および増殖のためにIFN反応を弱化させることができるように進化してきた。例えば、H5N1鳥インフルエンザウイルスのような高病原性ウ

50

イルスのNS1タンパク質は、type I IFNに対する強い阻害効果を有し、またInfarn1-/-マウスで急激な好中球募集、深刻な肺損傷および急激な炎症性サイトカイン分泌を誘導することが報告されている(Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99: 10736-10741)。

【0005】

本発明では、インフルエンザAウイルス感染の発病機序で高病原性1918株のPB1-F2タンパク質の影響を調べてみるために、ウイルスの病毒性とPB1-F2タンパク質間の相関関係を調査し、type I IFN反応阻害と関連した分子的機序を解明しようとした。

【発明の概要】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明者らは、高病原性を示すインフルエンザAウイルス1918株でPB1-F2タンパク質が病毒性に及ぼす影響および相関関係を調査した結果、1918株のPB1-F2タンパク質配列上の68番目および69番目のアミノ酸がウイルスの低い安定性を媒介し、細胞内DDX3との結合を通じて抗ウイルス反応を誘導するIFN β の発現を阻害して、ウイルスの病毒性を増加させることを確認し、1918 PB1-F2タンパク質と前記ウイルスの高病原性間の相関関係およびその分子機序を最初に解明した結果、これに基づいて本発明を完成した。

【0007】

20

そこで、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列からなるPB1-F2タンパク質の68番目および69番目のアミノ酸が置換されたタンパク質変異体を含む、高病原性ウイルス検出用マーカー組成物を提供することを目的とする。

【0008】

また、本発明は、前記タンパク質変異体を測定する製剤を含む、高病原性ウイルス検出用組成物および前記組成物を含む高病原性ウイルス検出キットを提供することを他の目的とする。

【0009】

また、本発明は、前記タンパク質変異体を測定する段階を含む、高病原性ウイルス検出方法を提供することをさらに他の目的とする。

30

【0010】

また、本発明は、DDX3(DEAD box protein 3)とPB1-F2タンパク質の結合阻害剤を有効成分として含む、インフルエンザAウイルスに対する抗ウイルス用組成物を提供することをさらに他の目的とする。

【0011】

また、本発明は、インフルエンザAウイルスに対する抗ウイルス物質のスクリーニング方法を提供することをさらに他の目的とする。

【0012】

しかしながら、本発明が解決しようとする技術的課題は、以上で言及した課題に制限されず、言及されていない他の課題は、下記の記載から当業者に明確に理解され得る。

40

【課題を解決するための手段】

【0013】

前記のような本発明の目的を達成するために、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列からなるPB1-F2タンパク質の68番目および69番目のアミノ酸が置換されたタンパク質変異体を含む、高病原性ウイルス検出用マーカー組成物を提供する。

【0014】

また、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列からなるPB1-F2タンパク質の68番目および69番目のアミノ酸が置換されたタンパク質変異体を測定する製剤を含む、高病原性ウイルス検出用組成物およびこれを含む検出キットを提供する。

【0015】

50

また、本発明は、配列番号 1 のアミノ酸配列からなる P B 1 - F 2 タンパク質の 6 8 番目および 6 9 番目のアミノ酸が置換されたタンパク質変異体を測定する段階を含む、高病原性ウイルス検出方法を提供する。

【 0 0 1 6 】

本発明の一具現例として、前記タンパク質変異体は、6 8 番目および 6 9 番目のアミノ酸がそれぞれスレオニン (T h r e o n i n e) およびプロリン (p r o l i n e) で置換されたものであってもよい。

【 0 0 1 7 】

本発明の他の具現例として、前記タンパク質変異体は、配列番号 2 のアミノ酸配列からなるものであってもよい。

10

【 0 0 1 8 】

本発明のさらに他の具現例として、前記ウイルスは、インフルエンザウイルスであってもよい。

【 0 0 1 9 】

本発明のさらに他の具現例として、前記タンパク質変異体を測定する製剤は、前記タンパク質に特異的に結合する抗体であってもよい。

【 0 0 2 0 】

また、本発明は、D D X 3 (D E A D b o x p r o t e i n 3) と P B 1 - F 2 タンパク質の結合阻害剤を有効成分として含む、インフルエンザ A ウイルスに対する抗ウイルス用組成物を提供し、

20

前記 P B 1 - F 2 タンパク質は、配列番号 1 のアミノ酸配列で 6 8 番目および 6 9 番目のアミノ酸が置換されたものであってもよい。

【 0 0 2 1 】

本発明の一具現例として、前記 D D X 3 は、配列番号 3 のアミノ酸配列からなるものであってもよい。

【 0 0 2 2 】

本発明の他の具現例として、前記結合阻害剤は、核酸、化合物、微生物培養液または抽出物、天然物抽出物、ペプチド、基質類似体、アプタマー (a p t a m e r) 、および抗体より構成された群から選択されるいずれか一つのものであってもよい。

【 0 0 2 3 】

本発明のさらに他の具現例として、前記 P B 1 - F 2 タンパク質は、6 8 番目および 6 9 番目のアミノ酸がそれぞれスレオニン (T h r e o n i n e) およびプロリン (p r o l i n e) で置換されたものであってもよい。

30

【 0 0 2 4 】

本発明のさらに他の具現例として、前記 P B 1 - F 2 タンパク質は、配列番号 2 のアミノ酸配列からなるものであってもよい。

【 0 0 2 5 】

本発明のさらに他の具現例として、前記組成物は、細胞内インターフェロン β (I F N β) の生成を増加させることができる。

【 0 0 2 6 】

また、本発明は、(a) インビトロ上で細胞に候補物質を処理する段階；

(b) 前記細胞で D D X 3 (D E A D b o x p r o t e i n 3) と P B 1 - F 2 タンパク質の結合を測定する段階；および

(c) 候補物質非処理群に比べて前記 D D X 3 と P B 1 - F 2 タンパク質の結合を減少させる物質をインフルエンザ A ウイルスに対する抗ウイルス物質として選定する段階を含む、インフルエンザ A ウイルスに対する抗ウイルス物質のスクリーニング方法を提供し、

前記 P B 1 - F 2 タンパク質は、配列番号 1 のアミノ酸配列で 6 8 番目および 6 9 番目のアミノ酸が置換されたものであってもよい。

【 0 0 2 7 】

本発明の一具現例として、前記候補物質は、核酸、化合物、微生物培養液または抽出物

40

50

、天然物抽出物、ペプチド、基質類似体、アプタマー (a p t a m e r) 、および抗体よりなる群から選択されるものであってもよい。

【 0 0 2 8 】

本発明の他の具現例として、前記核酸は、 s i R N A 、 s h R N A 、 m i c r o R N A 、アンチセンスRNA、アプタマー (a p t a m e r) 、 L N A (l o c k e d n u c l e i c a c i d) 、 P N A (p e p t i d e n u c l e i c a c i d) 、およびモルフォリノ (m o r p h o l i n o) よりなる群から選択されるものであってもよい。

【 0 0 2 9 】

本発明のさらに他の具現例として、前記 (b) 段階は、ウェスタンブロッティング (w e s t e r n b l o t t i n g) 、免疫沈降法 (i m m u n o p r e c i p i t a t i o n) 、免疫化学染色法 (i m m u n o h i s t o c h e m i s t r y) 、および免疫蛍光染色法 (i m m u n o f l u o r e s c e n c e) よりなる群から選択される方法を利用して測定するものであってもよい。

10

【 0 0 3 0 】

また、 D D X 3 (D E A D b o x p r o t e i n 3) と P B 1 - F 2 タンパク質の結合阻害剤を有効成分として含む抗ウイルス用組成物を個体に投与する段階を含むインフルエンザAウイルスの治療方法を提供する。

【 0 0 3 1 】

また、本発明は、 D D X 3 (D E A D b o x p r o t e i n 3) と P B 1 - F 2 タンパク質の結合阻害剤を有効成分として含む抗ウイルス用組成物のインフルエンザAウイルス治療用途を提供する。

20

【発明の効果】

【 0 0 3 2 】

本発明者らは、インフルエンザAウイルス感染の発病機序で高病原性の1918株と低い病原性を示すPR8株を利用して1918株のPB1-F2タンパク質配列上の68番目および69番目のアミノ酸が前記ウイルスの低い安定性を媒介し、細胞内DDX3との結合を通じて抗ウイルス反応を誘導するIFN β の発現を抑制することによって、ウイルスの病毒性を増加させることを解明したところ、インフルエンザウイルスのPB1-F2タンパク質配列で68番目および69番目のアミノ酸が置換されたタンパク質変異体は、高病原性ウイルスを検出するためのマーカーとして利用可能であり、前記変異体を測定することによって、高病原性のウイルスを有用に検出することができる。

30

【 0 0 3 3 】

また、本発明で新しく解明したPB1-F2タンパク質変異体によるウイルスの先天免疫反応回避機序は、抗ウイルス剤の開発のための新しい理解を提供するものであり、本発明による抗ウイルス用組成物は、抗ウイルス治療剤の開発に有用に利用され得る。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 4 】

【図1】図1は、A549およびU937細胞にPR8株 (P R 8) 、 P R 8 株において1918株のPB1-F2タンパク質でアミノ酸配列を変化させたウイルス (P R 8 - P B 1 - F 2 (1 9 1 8)) およびPB1-F2タンパク質を欠損させたPR8株 (以下、 P R 8 - P B 1 - F 2 (-) という) をそれぞれMOI 1または5で24時間の間感染させた後、ウェスタンブロットを用いてPB1-F2タンパク質の発現レベルを測定して、インフルエンザAウイルス1918株のPB1-F2タンパク質 (以下、 1 9 1 8 P B 1 - F 2) の低い安定性を確認した結果である。

40

【図2】図2aおよび図2bは、1918 PB1-F2タンパク質がプロテアソーム依存的経路により分解されることを確認した結果であって、図2aは、A549細胞にそれぞれF1a g - t a g g e d P R 8または1918 PB1-F2発現プラスミドをトランスフェクションし、プロテアソーム阻害剤であるMG132を処理した後、RT-PCRおよびウェスタンブロットを用いてPB1-F2 mRNAおよびタンパク質発現レベルを測定した結果であり、図2bは、ユビキチン化分析を通じてPB1-F2タンパク

50

質がユビキチン - プロテアソームシステムを通じて分解されることを確認した結果である。

【図 3】図 3 a ~ 図 3 d は、1918 PB1 - F2 タンパク質安定性の分子的決定因子を解明した結果であって、図 3 a は、PR8 および 1918 PB1 - F2 の多様な変異プラスミドを示すものであり、図 3 b は、A549 細胞に PB1 - F2 キメラ変異体である PR8 - N + 1918 - C および 1918 - N + PR8 - C をそれぞれトランスフェクションした後、RT - PCR およびウェスタンブロットを用いて PB1 - F2 mRNA およびタンパク質発現レベルを測定した結果であり、図 3 c は、PR8 PB1 - F2 配列の一部アミノ酸を 1918 PB1 - F2 で置換して作製した c - 末端の点突然変異体の発現プラスミドを細胞にトランスフェクションした後、図 3 b と同じ方法で PB1 - F2 mRNA およびタンパク質発現レベルを測定した結果であり、図 3 d は、PR8 および 1918 株の PB1 - F2 タンパク質骨格に 68 および 69 番目のアミノ酸を互いに代替してクローニングした後、それぞれのプラスミドを細胞にトランスフェクションし、図 3 b と同じ方法で PB1 - F2 mRNA およびタンパク質発現レベルを測定した結果である。

【図 4】図 4 a ~ 図 4 d は、1918 PB1 - F2 タンパク質により IFN β 誘導が阻害されることを確認した結果であって、図 4 a は、PR8 および 1918 PB1 - F2 発現プラスミドをトランスフェクションした細胞で NF - κ B ルシフェラーゼ活性および炎症誘発サイトカイン (IL6、IL1 β 、および IL32) の mRNA 発現レベルを測定した結果であり、図 4 b は、PR8 および 1918 PB1 - F2 発現プラスミドをトランスフェクションした A549 および U937 細胞で semi - quantitative PCR および real - time PCR を通じて IFN β mRNA の発現レベルを測定した結果であり、図 4 c は、U937 細胞でルシフェラーゼレポート分析を通じて IFN β のプロモーター活性を測定した結果であり、図 4 d は、A549 および U937 細胞に PR8 および 1918 株のインフルエンザ A ウイルスを MOI 1 で感染させた後、RT - PCR およびウェスタンブロットを用いて細胞内 IFN β mRNA およびタンパク質発現レベルを測定した結果である。

【図 5】図 5 a および図 5 b は、1918 PB1 - F2 タンパク質のプロテアソーム依存的分解と type I IFN 誘導抑制の相関関係を解明した結果であって、図 5 a は、PR8 および 1918 PB1 - F2 発現プラスミドをトランスフェクションした A549 および U937 細胞で semi - quantitative RT - PCR およびウェスタンブロットを用いてプロテアソーム阻害剤である MG132 の処理有無による IFN β mRNA およびタンパク質発現レベルを測定した結果であり、図 5 b は、PR8 PB1 - F2 配列の 68 および 69 番目のアミノ酸を 1918 PB1 - F2 のもので置換して作製した突然変異体発現プラスミドを細胞にトランスフェクションした後、semi - quantitative RT - PCR およびウェスタンブロットを用いて IFN β mRNA およびタンパク質発現レベルを測定した結果である。

【図 6】図 6 a ~ 図 6 f は、1918 PB1 - F2 の 68 および 69 番目のアミノ酸がインフルエンザ A ウイルス 1918 株の病原性に及ぼす影響を解明した結果であって、図 6 a および図 6 b は、マウスに PR8 および 1918 株のインフルエンザウイルスをそれぞれ 5×10^2 PFU および 1×10^3 PFU で鼻腔投与した後、14 日間マウスの体重変化および生存率を測定した結果であり、図 6 c は、PR8 PB1 - F2 タンパク質の 68 および 69 番目のアミノ酸を 1918 PB1 - F2 のもので置換した変異インフルエンザウイルスをマウスに感染させた後、体重および生存率を測定した結果であり、図 6 d ~ 図 6 f は、図 6 c と同じ変異インフルエンザウイルスを多様な用量 (6×10^2 、 8×10^2 、および 1×10^3 PFU) で感染させた後、体重および生存率を測定した結果である。

【図 7】図 7 a ~ 図 7 d は、インフルエンザ A ウイルス感染モデルで 1918 PB1 - F2 による IFN β 誘導阻害を確認した結果であって、図 7 a は、PR8、1918、および PB1 - F2 欠損 1918 (PB1 - F2 (-)) ウイルスを 5×10^2 PFU で

マウスに感染させ、2日後にウェスタンブロットを用いてマウス肺組織でウイルスタンパク質であるPB1-F2、NP(neucleoprotein)、およびHA(hemagglutinin)の発現レベルを測定した結果であり、図7bは、図7aの各グループマウスの肺組織粉砕液を利用したplaque assayを通じて前記各インフルエンザAウイルスの力価を測定した結果であり、図7cは、図7aの各グループマウスの肺組織を利用してRT-PCRを実施してIFN β mRNAの発現レベルを測定した結果であり、図7dは、ELISAを通じて図7aの各グループマウスの肺で分泌されたIFN β タンパク質水準を測定した結果である。

【図8】図8a~図8fは、1918 PB1-F2とDDX3の結合を介したIFN β 誘導阻害機序を解明した結果であって、図8aは、1918 PB1-F2と相互作用するものとして導き出されたタンパク質のうちウイルス感染に関連した機能を有するタンパク質を示すものであり、図8bは、A549細胞にDDX3発現プラスミド(HA-tagged DDX3)および、PR8または1918のPB1-F2発現プラスミド(flag-tagged PB1-F2)をトランスフェクションした後、IPを実施したり、PR8 PB1-F2の68および69番目のアミノ酸を1918 PB1-F2のもので置換させて作製した変異体(I68T、L69P、およびI68T/L69P)発現プラスミドをトランスフェクションした後、MG132処理条件で1918のPB1-F2とDDX3タンパク質の結合を確認した結果であり、図8cは、A549細胞をそれぞれPR8、1918、およびPR8-PB1-F2(-)ウイルスで感染させた後、ウェスタンブロットを用いてDDX3タンパク質の発現レベルを測定した結果であり、図8dは、マウスに前記各インフルエンザAウイルスを感染させた後、肺組織でDDX3タンパク質の発現レベルを測定した結果であり、図8eは、1918 PB1-F2によるIRF3の核内への移動有無を測定した結果であり、図8fは、A549細胞にPR8および1918のPB1-F2発現プラスミドおよびDDX3発現プラスミドをトランスフェクションした後、IFN β mRNA発現変化を分析した結果である。

【図9】図9a~図9dは、in vivoモデルで組換えDDX3処理による1918 PB1-F2インフルエンザウイルスの病原性減少を確認した結果であって、図9aは、in vivo実験過程を絵で示すものであり、図9bは、1918インフルエンザAウイルスを感染させたマウスモデルで組換えDDX3タンパク質投与後2週間の生存率を測定した結果であり、図9cは、前記マウスモデルの肺組織で1918インフルエンザAウイルスの力価を測定した結果であり、図9dは、前記マウスモデルの肺組織でIFN β mRNAの発現レベルを測定した結果である。

【図10】図10は、本発明によるインフルエンザAウイルス1918株の先天免疫反応回避を介した高病原性誘発機序を総合して示すものである。

【発明を実施するための形態】

【0035】

本発明者らは、高病原性を示すインフルエンザAウイルス1918株においてPB1-F2タンパク質が病毒性に及ぼす影響および相関関係を調査した結果、1918株のPB1-F2タンパク質配列上の68番目および69番目のアミノ酸が前記ウイルスの低い安定性をもたらし、細胞内DDX3との結合を通じて抗ウイルス反応を誘導するIFN β の発現を阻害することによってウイルスの病毒性を増加させることを確認し、組換えDDX3タンパク質を1918 PB1-F2インフルエンザウイルスが感染したマウスに注入して、IFN β の発現が回復され、生存率の増加を通じてウイルスの病原性が減少することを確認した。これを通じて、1918 PB1-F2タンパク質と前記ウイルスの高病原性間の相関関係およびその分子機序を最初に解明したところ、これに基づいて本発明を完成した。

【0036】

そこで、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列からなるPB1-F2タンパク質の68番目および69番目のアミノ酸が置換されたタンパク質変異体を含む、高病原性ウイルス検出用マーカー組成物を提供する。

10

20

30

40

50

【0037】

本発明において、前記PB1-F2タンパク質は、好ましくは+1 open reading frameからPB1遺伝子部位により暗号化されたインフルエンザウイルスの非構造タンパク質である。前記タンパク質は、CD8⁺T細胞および肺胞マクロファージでミトコンドリアに結合して、シトクロムcの放出を媒介してアポトーシスを誘導すると知られており、1次的ウイルスおよび2次的バクテリア感染時に深刻性を増加させると報告されたことがあり、インフルエンザウイルスで高病原性と関連があることが報告された。これより、本発明の実施例では、インフルエンザAウイルス1918株の高病原性に対してPB1-F2タンパク質が及ぼす影響を調べてみるために、前記1918株および低病原性のPR8株のPB1-F2タンパク質を比較分析することによって、高病原性とPB1-F2の相関関係およびその分子機序を最初に解明した。

10

【0038】

本発明の一実施例では、低病原性のインフルエンザAウイルスPR8株と比較して高病原性を示す1918株のPB1-F2タンパク質が顕著に低い安定性を有し、これは、ユビキチン-プロテアソームシステムを介した速いタンパク質分解により起こることを確認した（実施例2および3参照）。

【0039】

本発明の他の実施例では、高病原性の1918株由来PB1-F2タンパク質だけで分解が誘導される原因を調べてみるために、アミノ酸を置換させて作製した多様なPB1-F2タンパク質変異体を利用してPB1-F2タンパク質の発現様相を分析した結果、PB1-F2タンパク質のアミノ酸配列上で68および69番目のアミノ酸が前記タンパク質の安定性に影響を及ぼすことを確認した（実施例4参照）。

20

【0040】

本発明のさらに他の実施例では、インフルエンザAウイルス1918の感染時にPB1-F2タンパク質の不安定性が宿主の防御システムに及ぼす影響を調べてみるために、先天免疫反応でウイルスに対する防御に大変重要な役割をするtype I IFN誘導に対するPB1-F2タンパク質の影響を分析した。その結果、PR8株とは異なり、1918株ではPB1-F2によりIFN β の発現が抑制され、そのプロモーター活性も阻害されることを確認した（実施例5参照）。また、このような現象は、プロテアソーム依存的分解を阻害したときに現れず、1918 PB1-F2タンパク質で不安定性を決定するものと確認された68および69番目のアミノ酸がtype I IFN誘導阻害反応に影響を及ぼすことを確認することによって、1918 PB1-F2タンパク質のプロテアソーム依存的分解を介した不安定性とtype I IFN誘導阻害反応間に相関関係があることを確認した（実施例6参照）。

30

【0041】

本発明のさらに他の実施例では、PR8株および1918株のインフルエンザウイルスをそれぞれ感染させたマウスモデルで1918株感染時に高い病毒性が誘発されることを確認し、PB1-F2タンパク質の68および/または69番目のアミノ酸を置換させて作製したタンパク質変異体を利用してPB1-F2タンパク質の68および69番目位置のアミノ酸がインフルエンザAウイルス1918株の高い病原性に寄与することを確認した（実施例7参照）。

40

【0042】

本発明のさらに他の実施例では、インフルエンザAウイルス感染モデルで1918株のPB1-F2タンパク質がIFN β 誘導を阻害し、結局、ウイルス消滅反応が正確に起こらないため、ウイルス力価が高く維持されることが分かった（実施例8参照）。

【0043】

前記のような本発明の実施例を通じてPB1-F2タンパク質の68番目および69番目のアミノ酸が置換されたタンパク質、好ましくは1918株と同一にそれぞれスレオニンおよびプロリンで置換されたPB1-F2タンパク質変異体を高病原性ウイルス検出用マーカーとして利用することができ、前記変異体を測定して高病原性ウイルス検出用途に

50

活用することができる。

【0044】

したがって、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列からなるPB1-F2タンパク質の68番目および69番目のアミノ酸が置換されたタンパク質変異体を測定する製剤を含む、高病原性ウイルス検出用組成物、および前記組成物を含む高病原性ウイルス検出キットを提供する。

【0045】

本発明において、前記タンパク質変異体は、68番目および69番目のアミノ酸がそれぞれスレオニン(Threonine)およびプロリン(proline)で置換されたものであってもよく、配列番号2のアミノ酸からなるものであってもよい。

10

【0046】

本発明において、前記ウイルスは、好ましくはインフルエンザウイルスであってもよいが、これに制限されるものではない。

【0047】

本発明において、前記タンパク質変異体を測定する製剤は、前記タンパク質に特異的に結合する抗体であってもよいが、これに制限されるものではない。

【0048】

本発明で使用される用語「抗体」は、免疫学的に特定の抗原と反応性を有する免疫グロブリン分子を含み、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を全部含む。また、前記抗体は、キメラ性抗体(例えば、ヒト化ミュリン抗体)および異種結合抗体(例えば、二重特異性抗体)のような遺伝工学により生産された形態を含む。

20

【0049】

本発明の検出キットは、分析方法に適合した一種類またはそれ以上の他の構成成分の組成物、溶液または装置から構成される。

【0050】

また、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列からなるPB1-F2タンパク質の68番目および69番目のアミノ酸が置換されたタンパク質変異体を測定する段階を含む、高病原性ウイルス検出方法を提供する。

【0051】

本発明のさらに他の実施例では、1918株のPB1-F2タンパク質によるIFN β 誘導抑制反応が前記PB1-F2タンパク質と細胞内DDX3タンパク質間の結合を通じてDDX3の機能を阻害することによって起こり(実施例9参照)、1918株のPB1-F2タンパク質が存在する場合にも、組換えDDX3タンパク質を処理する場合、IFN β 誘導抑制が回復され、これを通じて、ウイルス消滅反応が誘導されることを確認した(実施例10参照)。

30

【0052】

したがって、1918株のように68番目および69番目のアミノ酸がそれぞれスレオニンおよびプロリンで置換されたPB1-F2タンパク質および細胞内DDX3の結合を抑制することによって、高病原性インフルエンザAウイルスの増殖を阻害するのに利用することができる。

40

【0053】

よって、本発明の他の様態として、本発明は、DDX3(DEAD box protein 3)とPB1-F2タンパク質の結合阻害剤を有効成分として含む、インフルエンザAウイルスに対する抗ウイルス用組成物を提供し、前記PB1-F2タンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列で68番目および69番目のアミノ酸が置換されたものであってもよい。

【0054】

本発明において、前記PB1-F2タンパク質は、68番目および69番目のアミノ酸がそれぞれスレオニン(Threonine)およびプロリン(proline)で置換されたものであってもよく、配列番号2のアミノ酸配列からなるものであってもよい。

50

【0055】

本発明で使用される用語「抗ウイルス」とは、体内でウイルスの増殖を阻害して、体内に侵入したウイルスの作用を弱くしたり消滅させることを意味し、より詳細には、ウイルスの核酸合成過程、遺伝子発現過程、またはウイルス複製過程などを阻害することによって、ウイルスの増殖を阻害することを意味し、本発明では、インフルエンザAウイルス、より好ましくはインフルエンザAウイルス1918株(A/Brevig Mission/1/1918(H1N1))を対象とする。

【0056】

前記DDX3は、細胞内で多様な機能をするDEAD boxファミリーRNAヘリカーゼであって、遺伝子発現の色々な段階、すなわち転写、核およびミトコンドリアmRNAの成熟、翻訳開始、リボソームおよびスプライソソームの再配列などに関与し、C型肝炎ウイルス(HCV)RNA複製に関与し、HBV感染による肝臓癌で発現が減少していると報告されたことがあり、腫瘍抑制タンパク質として機能することが知られている。また、TBK1(TANK-binding kinase 1)およびIKKε(IK-B kinase-epsilon)依存的IRF3活性化によるIFNβ誘導に関与すると知られている。前記DDX3タンパク質は、配列番号3のアミノ酸配列からなるものであってもよい。

10

【0057】

本発明において、前記結合阻害剤は、核酸、化合物、微生物培養液または抽出物、天然物抽出物、ペプチド、基質類似体、アプタマー(aptamer)、および抗体から構成された群から選択されるいずれか一つであってよいが、これらに制限されるものではない。

20

【0058】

本発明のさらに他の様態として、本発明は、(a)インビトロ上で細胞に候補物質を処理する段階；

(b)前記細胞でDDX3(DEAD box protein 3)とPB1-F2タンパク質の結合を測定する段階；および

(c)候補物質非処理群に比べて前記DDX3とPB1-F2タンパク質の結合を減少させる物質をインフルエンザAウイルスに対する抗ウイルス物質として選定する段階を含む、インフルエンザAウイルスに対する抗ウイルス物質のスクリーニング方法を提供し、前記PB1-F2タンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列で68番目および69番目のアミノ酸が置換されたものであってもよい。

30

【0059】

本発明において、前記候補物質は、核酸、化合物、微生物培養液または抽出物、天然物抽出物、ペプチド、基質類似体、アプタマー(aptamer)、および抗体よりなる群から選択されるものであってもよく、前記核酸は、siRNA、shRNA、microRNA、アンチセンスRNA、アプタマー(aptamer)、LNA(locked nucleic acid)、PNA(peptide nucleic acid)、およびモルフォリノ(morpholino)よりなる群から選択されるものであってもよいが、これらに制限されるものではない。

40

【0060】

前記(b)段階でDDX3とPB1-F2タンパク質の結合を測定する段階は、ウェスタンブロッティング、免疫沈降法、免疫化学染色法、および免疫蛍光染色法よりなる群から選択される方法を利用して行われ得るが、これに制限されるものではない。

【0061】

以下、本発明の理解を助けるために好ましい実施例を提示する。しかしながら、下記の実施例は、本発明をより容易に理解するために提供されるものに過ぎず、下記実施例によって本発明の内容が限定されるものではない。

【実施例】

【0062】

50

[実施例 1 . 実験準備および実験方法]

(1 - 1 . 細胞培養)

A549 および 293T 細胞は、熱処理して不活性化させた 10% FBS (fetal bovine serum) (Gibco - BRL , Gaithersburg , MD) および 1% ペニシリン / ストレプトマイシン (Gibco - BRL , Gaithersburg , MD) が添加された DMEM (Dulbecco ' s modified Eagle ' s medium) (Gibco - BRL , Gaithersburg , MD) 培地で 37 °C および 5% CO₂ 条件下で培養した。U937 細胞は、前記細胞と同じ条件で 10% FBS および 1% ペニシリン / ストレプトマイシンが添加された RPMI 培地 (Gibco - BRL , Gaithersburg , MD) で培養した。トランスフェクションは、製造社のプロトコルによって Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を利用して行った。

10

【 0063 】

(1 - 2 . プラスミド作製)

PR8 PB1 - F2 および 1918 PB1 - F2 の発現プラスミドは、EcoRI および XhoI 制限酵素部位を利用して p cDNA3 . 1 (+) ベクター (Invitrogen) に PCR を通じてクローニングした。キメラ変異体、すなわち PR8 株由来 PB1 - F2 の N 末端ドメインおよび 1918 株の C 末端ドメイン；および 1918 株由来 PB1 - F2 の N 末端および PR8 株の C 末端ドメイン変異体は、PCR で増幅させて、p cDNA3 . 1 (+) ベクターにクローニングした。これに加えて、アミノ酸置換を介した PR8 由来 PB1 - F2 の変異体 (R59K 、 R60Q 、 R59K / R60Q 、 R59K / R60Q / N66S 、 R59K / R60Q / N66S / I68T 、 R59K / R60Q / N66S / I68T / L69P) は、PCR で増幅した後、p cDNA3 . 1 (+) ベクターにクローニングした。本実験で使用したプライマー配列は、下記表 1 に示した。また、DDX3 発現プラスミドは、HindIII および XhoI 制限酵素部位を利用して p cDNA3 . 1 (+) ベクターにクローニングし、IRF3 および TLR3 発現ベクターは、延世大学校の他の研究チームから提供されて使用した。

20

【 0064 】

【表 1】

プライマー		配列	配列番号
PB1-F2	Forward	5'-acc gaa ttc atg gac tac aag gat gac gac-3'	4
	Reverse	5'-acc ctc gag cta ctc gtg ttt gct gaa-3	5
R59K	Forward	5'-gtg tat tgg aag cga tgg ctt tcc ttg-3'	6
	Reverse	5'-caa gga aag cca tcg ctt cca ata cac-3'	7
R59K/R60Q	Forward	5'-gtg tat tgg agg caa tgg ctt tcc ttg-3'	8
	Reverse	5'-caa gga aag cca ttg cct cca ata cac-3'	9
R59K/R60Q/N66S	Forward	5'-gtg tat tgg aag cga tgg ctt tcc ttg-3'	10
	Reverse	5'-caa gga aag cca tcg ctt cca ata cac-3'	11
R59K/R60Q/N66S/ I68T	Forward	5'-ctt tcc ttg agg aat ccc acc ccg-3'	12
	Reverse	5'-cgg ggt ggg att cct caa gga aag-3'	13
R59K/R60Q/N66S/ I68T/L69P	Forward	5'-ctt gag gag tcc cat ccc ggt atc ttt-3'	14
	Reverse	5'-caa aga tac cgg gat ggg act cct caa-3'	15
I68T	Forward	5'-ttg agg aat ccc acc ctg gta ttt ttg-3'	16
	Reverse	5'-caa aaa tac cag ggt ggg att cct caa-3'	17
L69P	Forward	5'-agg aat ccc atc ccg gta ttt ttg aaa-3'	18
	Reverse	5'-ttt caa aaa tac cgg gat ggg att cct-3'	19
I68T/L69P	Forward	5'-ttg agg aat ccc acc ccg gta ttt ttg aaa-3'	20
	Reverse	5'-ttt caa aaa tac cgg ggt ggg att cct caa-3'	21
T68I	Forward	5'-ctt gag gag tcc cat ccc ggt atc ttt g-3'	22
	Reverse	5'-caa aga tac cgg gat ggg act cct caa-3'	23
P69L	Forward	5'-gga gtc cca ccc tggtatct ttg aaa ac-3'	24
	Reverse	5'-gtt ttc aaa gat acc agg gtg gga ctc c-3'	25
T68I/P69L	Forward	5'-ttg agg agt ccc atc ctg gta tct ttg aaa-3'	26
	Reverse	5'-ttt caa aga tac cag gat ggg act cct caa-3'	27

【 0 0 6 5 】

(1 - 3 . 抗体および試薬)

anti - FLAG M2モノクローナル抗体、anti - HA , および anti - β - actin抗体は、Sigma (St . Louis , MO) で購入し、Lamin A / C抗体は、Cell signaling Technology (Beverly ,

10

20

30

40

50

MA)で購入して使用した。ウイルスPB1-F2タンパク質検出のためのマウスポリクローナル抗体は、大腸菌(E.coli)で発現させた全長配列の組換えPB1-F2タンパク質を利用して製造した。DDX3抗体、Anti-mouse、およびanti-rabbit IgG HRP(horseradish peroxidase)抗体は、Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA)で購入し、Anti-NP抗体は、NPタンパク質で免疫させたウサギ(Lab Frontier)から得た。本実施例で使用したMG132およびPoly(I:C)は、それぞれCalbiochem(Germany)およびInvivoGenで購入した。

【0066】

(1-4. インフルエンザウイルス)

Influenza A/Puerto Rico/8/34(H1N1)ウイルス(IAV(PR8))、PB1-F2タンパク質を欠損させたウイルス(IAV PB1-F2(-))、または、PR8ウイルス骨格でA/Brevig Mission/1/1918(H1N1)ウイルス(IAV(1918))のPB1-F2タンパク質でアミノ酸配列を置換させたウイルスをインビトロおよびインビボ実験で利用した。部位特異的変異を利用してPB1-F2変異ウイルスを製造するために、A/Puerto Rico/8/34(H1N1)のPB1-F2タンパク質内68Ile(ATC)または69Leu(CTG)残基をそれぞれThr(ACC)およびPro(CCG)で置換した。変異されたPB1-F2タンパク質を発現する組換えウイルスを得るために、逆遺伝学技術を利用した。簡単に、野生型の遺伝子部位を暗号化する7個のcDNAと一つの変異されたPB1部位をpHW2000ベクターにクローニングし、293T細胞に共にトランスフェクションした。3日後、上澄み液を回収して、ブランクアッセイを実施した。精製したブランクは、ウイルスを増幅させるためにMDC K細胞に接種した。

【0067】

(1-5. インフルエンザウイルス感染)

6~8週齢の雌性Balb/cマウスを利用して、麻酔したマウスにインフルエンザウイルスを50μlの量で鼻腔を通じて感染させた。本動物実験は、建国大学校の実験動物運営委員会の承認を受けて進めた。細胞内インフルエンザウイルス感染のためには、A549およびU937細胞をPBSで洗浄し、インフルエンザウイルスをMOI 1で感染させた。24時間後、細胞を回収し、RT-PCRおよびウェスタンブロット分析を実施した。

【0068】

(1-6. リアルタイムPCR)

細胞およびマウス組織にTrizolを処理して溶解させて全RNAを抽出した。前記抽出されたRNA 2μgおよびM-MLV逆転写酵素(iNtRON, Seoul, Korea)を利用して最終量が20μlになるように反応溶液を製造してcDNAを合成し、これを鋳型としてPCRを実施した。反応条件は、下記条件、すなわち1次変性94で5分間実行後、94(30秒)、55~60(30秒)、および72(30秒)で25~30サイクル反復、および最終延長過程72で5分間実施して増幅させた。本実験で使用したプライマー配列は、下記表2に示した。定量的リアルタイムPCR(Quantitative Real-time PCR)は、SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems)を利用して行い、PCR増幅は、Applied Biosystems(ABI7500)real-time PCR装置を利用した。相対的なmRNA発現量の定量的分析は、 $\Delta\Delta Ct$ 方法を利用して行い、結果は、calibrator($RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$)に対する相対的なn乗差異で示した。

【0069】

【表 2】

プライマー		配列	配列番号
IFN β	Forward	5'-gcc tgg ctt cca tca tga ac-3'	28
	Reverse	5'-gag gca tca act gac agg tc-3	29
PB1-F2	Forward	5'-atg gga ccg gaa cag gat aca cca-3'	30
	Reverse	5'-cta ctc gtg ttt gct gaa caa cct-3'	31
IL-1 β	Forward	5'-tca ggc agg ccg cgt cag tt-3'	32
	Reverse	5'-ttg ctg tga gtc ccg gag cgt-3'	33
IL-6	Forward	5'-agc gcc ttc ggt cca gtt gc-3'	34
	Reverse	5'-tgc cag tgc ctc ttt gct gct-3'	35
IL-32	Forward	5'-gaa ggc ccg aat ggt aat gc-3'	36
	Reverse	5'-tcg gca ccg taa tcc atc tc-3'	37
GAPDH	Forward	5'-cgt ctt cac cac cat gga ga-3'	38
	Reverse	5'-cgg cca tca cgc cac agt tt-3'	39

10

【0070】

(1-7. ウェスタンブロット)

20

細胞に l y s i s b u f f e r (2 5 m m o l / L T r i s - H C l , p H 7 . 5 , 1 % N P 4 0 およびタンパク質分解酵素カクテル) を処理し、遠心分離して、細胞内タンパク質が溶出された上澄み液を得た。50 μ g のタンパク質を 12 ~ 15 % のアクリルアミドゲル上にローディングした後、S D S - P A G E を実施して、タンパク質がサイズ別に分離されるようにした後、ウェスタンブロットを実施した。化学的発光を介したタンパク質検出は、E C L D e t e c t i o n R e a g e n t s (G E H e a l t h c a r e , B u c k i n g h a m s h i r e , U K) を利用し、B i o - I m a g i n g a n a l y z e r (L A S - 4 0 0 0 , F u j i , T o k y o , J a p a n) を利用して標的タンパク質の発現レベルを確認した。

【0071】

30

(1-8. ルシフェラーゼレポート分析法)

細胞に L i p o f e c t a m i n e 2 0 0 0 を利用してトランスフェクションを実施し、48時間後、l u c i f e r a s e a s s a y s y s t e m (P r o m e g a , M a d i s o n , W I , U S A) を利用してルシフェラーゼ活性を測定した。すべてのサンプルに対して β - ガラクトシダーゼの活性を測定して結果を補正し、実験は、独立して、3回実施して平均 $\pm$ 標準偏差値で示した。

【0072】

(1-9. I F N β 含量の測定)

マウスの肺組織粉砕液を 10 , 0 0 0 $\times$ g で5分間遠心分離して上澄み液を回収し、前記上澄み液を利用して製造元のプロトコルに従って I F N β E L I S A k i t (R & D) を利用して I F N β タンパク質水準を測定した。

40

【0073】

(1-10. タンパク質発現プラスミドの作製)

L y s R S - R 9 - D D X 3 を暗号化する p G E - L y s R S - R 9 - D D X 3 の発現プラスミドは、T7プロモーター - L y s R S - T E V タンパク質分解酵素認識配列 - m u l t i c l o n i n g s i t e s (K p n I - B a m H I - E c o R V - S a l I - H i n d I I I) およびヒスチジン t a g から構成された p G E - L y s R S - 4 ベクターを利用して作製した。L y s R S - R 9 - D D X 3 遺伝子は、下記表3のプライマー配列を利用して P C R で増幅させ、増幅産物は、K p n I / S a l I で切断して、p G E - L y s R S - 4 の K p n I / S a l I サイトに導入して作製した。

50

【 0 0 7 4 】

【 表 3 】

プライマー		配列	配列番号
LysRS-R9- DDX3	Forward	5'-gtc acg ggt acc cgt cgc cgt cgc cgt cgc cgt atg agt cat gtg gca gtg-3'	40
	Reverse	5'-gtc acg gtc gac gtt acc cca cca gtc aac ccc ctg gga gtt a-3'	41

【 0 0 7 5 】

〔 実施例 2 . インフルエンザ A ウイルス 1 9 1 8 株の P B 1 - F 2 タンパク質安定性の分析 〕

多様な研究を通じてインフルエンザウイルスの P B 1 - F 2 タンパク質が多様な機能を有していることが知られて来ており、最近には、1 9 1 8 流行性インフルエンザの高い死亡率が 1 9 1 8 株の P B 1 - F 2 タンパク質と関連があることが報告されたことがある。これより、本実施例では、1 9 1 8 インフルエンザウイルス P B 1 - F 2 タンパク質の分子および機能的特性を調べてみるために、まず、A / B r e v i g M i s s i o n / 1 / 1 9 1 8 (H 1 N 1) (以下、1 9 1 8 株という) と A / P u e r t o R i c o / 8 / 1 9 3 4 (H 1 N 1) (以下、P R 8 株という) インフルエンザウイルスの P B 1 - F 2 タンパク質を比較分析した。

【 0 0 7 6 】

このために、A 5 4 9 および U 9 3 7 細胞を前記各インフルエンザウイルス、すなわち P R 8 株 (P R 8)、P R 8 株において 1 9 1 8 株の P B 1 - F 2 タンパク質でアミノ酸配列を変化させたウイルス (P R 8 - P B 1 - F 2 (1 9 1 8)) および P B 1 - F 2 タンパク質を欠損させた P R 8 株 (P R 8 - P B 1 - F 2 (-)) を M O I 1 または 5 で 2 4 時間の間感染させた後、細胞でウェスタンブロットを用いて P B 1 - F 2 タンパク質の発現様相を観察した。その結果、図 1 に示されたように、P R 8 の P B 1 - F 2 タンパク質は発現する反面、1 9 1 8 の P B 1 - F 2 タンパク質は、検出されないことを確認した。このような結果を通じて、P R 8 株と比較して 1 9 1 8 株の P B 1 - F 2 タンパク質安定性が低いことが分かった。

【 0 0 7 7 】

〔 実施例 3 . プロテアソーム依存的経路による 1 9 1 8 P B 1 - F 2 タンパク質分解確認 〕

前記実施例 2 の結果に基づいて、P R 8 株と 1 9 1 8 株の P B 1 - F 2 タンパク質発現様相に違いが現れる理由が、プロテアソーム媒介タンパク質分解によるのかを調べるために、プロテアソーム阻害剤である M G 1 3 2 を処理した条件で P B 1 - F 2 タンパク質の発現様相を観察した。

【 0 0 7 8 】

より具体的に、A 5 4 9 細胞に P R 8 株および 1 9 1 8 株の F l a g - t a g g e d P B 1 - F 2 発現プラスミドをそれぞれトランスフェクションした後、M G 1 3 2 を 6 時間の間処理して細胞を回収して、R T - P C R およびウェスタンブロットを用いて P B 1 - F 2 m R N A およびタンパク質の発現レベルを分析した。その結果、図 2 a に示されたように、M G 1 3 2 を処理するか処理しない場合、いずれも 1 9 1 8 P B 1 - F 2 の m R N A が検出された反面、P B 1 - F 2 タンパク質は、M G 1 3 2 が処理された場合にのみ発現することを確認した。このような結果を通じて 1 9 1 8 P B 1 - F 2 タンパク質の低い安定性がプロテアソーム依存的経路と関連があることが分かった。

【 0 0 7 9 】

ユビキチン - プロテアソーム系は、タンパク質分解を誘導し、多くのタンパク質の機能を調節すると知られている。P B 1 - F 2 タンパク質が前記ユビキチン - プロテアソーム系により分解されることを確認するために、ユビキチン化アッセイを実施した。その結果、図 2 b に示されたように、P B 1 - F 2 タンパク質は、ユビキチン依存的プロテアソーム

経路を通じて分解されることが分かった。

【 0 0 8 0 】

[実施例 4 . 1 9 1 8 P B 1 - F 2 タンパク質安定性の分子的決定因子の解明]

前記実施例 2 および 3 の結果に基づいて、P B 1 - F 2 タンパク質の安定性を決定する分子的因子を解明するために、P R 8 および 1 9 1 8 P B 1 - F 2 の多様な変異プラスミドを作製し、図 3 a に示した。

【 0 0 8 1 】

より具体的には、A 5 4 9 細胞に図 3 a に示した P B 1 - F 2 キメラ変異体である P R 8 - N + 1 9 1 8 - C および 1 9 1 8 - N + P R 8 - C をそれぞれトランスフェクションした後、前記実施例 3 の方法と同一に R T - P C R およびウェスタンブロットを実施して、P B 1 - F 2 の m R N A およびタンパク質の発現レベルを測定した。その結果、図 3 b に示すように、プロテアソーム阻害剤である M G 1 3 2 が処理されない場合、P R 8 - N + 1 9 1 8 - C をトランスフェクションした細胞で P B 1 - F 2 タンパク質が発現されず、これを通じて P B 1 - F 2 の C - 末端部分に前記タンパク質の安定性を決定する部位が存在することが分かった。

10

【 0 0 8 2 】

次に、P B 1 - F 2 タンパク質の安定性決定部位をより詳しく調べてみるために、P R 8 P B 1 - F 2 配列の一部のアミノ酸を 1 9 1 8 P B 1 - F 2 で置換する方法を利用して C 末端の点突然変異体を作製した後、R T - P C R およびウェスタンブロットを実施した。その結果、図 3 c に示したように、M G 1 3 2 が処理されない条件で R 5 9 K / R 6 0 Q / N 6 6 S 変異体を導入させた場合には、P B 1 - F 2 タンパク質が発現する反面、R 5 9 K / R 6 0 Q / N 6 6 S / I 6 8 T 変異体および R 5 9 K / R 6 0 Q / N 6 6 S / I 6 8 T / L 6 9 P 変異体を導入させた場合には、P B 1 - F 2 タンパク質が発現しないことを観察した。これを通じて、P B 1 - F 2 タンパク質の 6 8 および 6 9 番目の位置が前記タンパク質の安定性に大変重要であることが分かった。

20

【 0 0 8 3 】

さらに、P B 1 - F 2 タンパク質の 6 8 および 6 9 番目のアミノ酸の位置が前記タンパク質の不安定性を決定する因子であることを再び検証するために、P R 8 株の P B 1 - F 2 タンパク質上で 6 8 および 6 9 番目のアミノ酸を 1 9 1 8 株由来の P B 1 - F 2 に置き換え、またその逆の置き換えも行って、それぞれクローニングした後、それぞれのプラスミドを細胞にトランスフェクションし、R T - P C R およびウェスタンブロットを実施した。その結果、図 3 d に示したように、M G 1 3 2 が処理されていない条件で 6 8、6 9 番目のアミノ酸いずれかを置換した場合、および 6 8 と 6 9 番目のアミノ酸の両方を置換した場合、P R 8 株骨格の場合、P B 1 - F 2 タンパク質の発現が阻害され、1 9 1 8 株骨格の場合、前記タンパク質発現が増加することを確認した。これを通じて、P B 1 - F 2 タンパク質の安定性が 6 8 および 6 9 番目のアミノ酸に依存的であることを分かった。

30

【 0 0 8 4 】

さらに、各 P B 1 - F 2 クローンの細胞内局在を分析した結果、P R 8 P B 1 - F 2 タンパク質は、一次的にミトコンドリアに局在する反面、1 9 1 8 P B 1 - F 2 タンパク質は、細胞質に広がっているか、核に存在した。したがって、P B 1 - F 2 タンパク質の 6 8 および 6 9 番目のアミノ酸は、P B 1 - F 2 タンパク質の細胞内局在を決定するのに重要であることが分かった。前記結果は、I l e 6 8 および L e u 6 9 が P B 1 - F 2 タンパク質の安定性を決定する分子的因子であることを意味するものである。

40

【 0 0 8 5 】

[実施例 5 . 1 9 1 8 P B 1 - F 2 タンパク質による I F N β 分泌阻害の確認]

宿主で 1 9 1 8 P B 1 - F 2 タンパク質の不安定性が及ぼす影響を調べてみるために、炎症誘発サイトカインの m R N A 発現および N F - κ B ルシフェラーゼ活性を分析した。その結果、図 4 a に示したように、P R 8 と 1 9 1 8 株間の P B 1 - F 2 タンパク質による差異は大きくないことを確認した。

【 0 0 8 6 】

50

先天免疫反応体系の重要な構成要素である type I IFN 反応は、ウイルス病原体に対する防御に大変重要であると知られている。例えば、多くの研究を通じてインフルエンザ感染に対する宿主の防御体系で type I IFN が大変重要な役割をすることが報告されてきた。そこで、本発明者らは、PB1-F2 タンパク質により IFN β 誘導が影響を受けるかを検証するために、A549 および U937 細胞にそれぞれ PR8 または 1918 株の PB1-F2 タンパク質を発現するプラスミドをトランスフェクションした後、半定量的 RT-PCR を実施した。

【0087】

その結果、図 4 b に示したように、二種類の細胞の両方で 1918 PB1-F2 の場合、PR8 株と対照的に、細胞で IFN β 誘導を強く阻害することを観察した。また、図 4 c から明らかなように、U937 細胞に IFN β ルシフェラーゼレポータプラスミドと各 PB1-F2 または NS1 発現プラスミドを共にトランスフェクションし、細胞を回収する 12 時間前に poly I:C を処理した後、ルシフェラーゼ分析を実施した結果、1918 PB1-F2 により IFN β プロモーターの活性が阻害されることを確認した。

10

【0088】

前記結果に基づいて実際にインフルエンザウイルスに感染した細胞で 1918 PB1-F2 タンパク質の発現が IFN β 遺伝子の発現に影響を及ぼすかを調べてみるために、A549 および U937 細胞にそれぞれのインフルエンザ A ウイルス、すなわち PR8 および 1918 株を MOI 1 で細胞に感染させた後、RT-PCR およびウェスタンブロットを実施して、細胞内 IFN β mRNA およびタンパク質発現変化を観察した。

20

【0089】

その結果、図 4 d に示したように、ウイルス感染により誘導される細胞内 IFN β mRNA の発現が 1918 PB1-F2 タンパク質により阻害されることを確認した。

【0090】

このような結果は、ウイルスが感染した細胞で 1918 PB1-F2 タンパク質が type I IFN 反応を阻害することを意味するものである。

【0091】

[実施例 6 . 1918 PB1-F2 タンパク質のプロテアソーム依存的分解と type I IFN 誘導阻害の相関関係の解明]

前記実施例 2 および 3 の結果を通じて 1918 PB1-F2 タンパク質が顕著に低い安定性を有することを確認したところ、これに基づいて 1918 PB1-F2 の安定性と前記タンパク質による IFN β 誘導阻害能間の相関関係があるかを調べてみようとした。このために、A549 および U937 細胞に PR8 および 1918 PB1-F2 発現プラスミドをトランスフェクションし、18 時間後にプロテアソーム阻害剤である MG132 を 6 時間の間処理した後、semi-quantitative RT-PCR およびウェスタンブロットを実施して、IFN β の発現を観察した。

30

【0092】

その結果、図 5 a に示したように、MG132 が処理されていない条件では、1918 PB1-F2 により IFN β の mRNA およびタンパク質発現が阻害された反面、MG132 が処理された場合、IFN β の発現阻害が現れないことを確認した。このような結果は、1918 PB1-F2 による IFN β 誘導阻害に PB1-F2 の安定性が重要な影響を及ぼすことを意味する。

40

【0093】

ひいては、PB1-F2 タンパク質の安定性を決定する分子的因子として解明された 1918 PB1-F2 の 68 および 69 番目の位置のアミノ酸が IFN β の発現阻害に影響を及ぼすかを検証するために、A549 細胞に PB1-F2 の 68 および 69 番目のアミノ酸を置換させた変異体をトランスフェクションさせた後、半定量的 RT-PCR およびウェスタンブロットを実施して、IFN β の発現を観察した。

【0094】

その結果、図 5 b に示したように、PB1-F2 の 68 および 69 番目のアミノ酸に T

50

(トリプトファン)および/または、P(プロリン)が位置する場合(I 6 8 T、L 6 9 P、I 6 8 T / L 6 9 P)、IFN β のmRNAおよびタンパク質発現が阻害されることを確認した。

【0095】

前記結果は、1918 PB1-F2タンパク質のプロテアソーム依存的分解とtype I IFNの強い発現阻害能間に相関関係があることを意味するものである。

【0096】

[実施例7. 1918 PB1-F2の68および69番目のアミノ酸がインフルエンザAウイルス1918株の病原性に及ぼす影響の解明]

インフルエンザAウイルス1918株が宿主に感染した場合、PB1-F2タンパク質がウイルス病原性に及ぼす影響を調べてみるために、マウスにPR8および1918株のインフルエンザウイルスを 5×10^2 PFUまたは 1×10^3 PFUで鼻腔投与した後、14日間マウスの体重変化および生存率を観察した。

【0097】

その結果、図6aおよび図6bに示したように、PR8株に比べて1918株のインフルエンザウイルスを感染させた場合、マウスで高い病毒性が誘発されることを確認した。

【0098】

さらに、前記実施例4および6の結果を通じてPB1-F2タンパク質の68および69番目のアミノ酸位置が前記タンパク質の不安定性およびIFN β 誘導を決定する因子であることを確認された。これに基づいて前記アミノ酸位置がインフルエンザウイルスの病原性に重要な影響を及ぼすかを検証しようとした。このために、PR8 PB1-F2タンパク質の68および69番目のアミノ酸を1918 PB1-F2のもので置換した変異インフルエンザウイルスをマウスに感染させた後、体重および生存率の変化を観察した。

【0099】

その結果、図6cに示したように、PR8株およびPB1-F2タンパク質欠損ウイルス(PB1-F2(-))を感染させた場合と比較するとき、変異ウイルス(I 6 8 T、L 6 9 P、I 6 8 T / L 6 9 P)を感染させたマウスでは、1918 PB1-F2ウイルスを感染させた場合と類似した程度に体重が減少した。

【0100】

これに加えて1918 PB1-F2の病毒性に前記位置のアミノ酸が及ぼす影響を調べてみるために、I 6 8 T、L 6 9 P、およびI 6 8 T / L 6 9 P変異ウイルスを多様な用量(6×10^2 、 8×10^2 、および 1×10^3 PFU)でマウスに感染させた後、体重および生存率を測定した。その結果、図6d~図6fに示したように、1918 PB1-F2タンパク質の68および69番目のアミノ酸がいずれもウイルスの病毒性に寄与することを確認した。

【0101】

上記結果を通じてPB1-F2タンパク質の68および69番目の位置のアミノ酸がインフルエンザAウイルス1918株の高い病原性に寄与することが分かった。

【0102】

[実施例8. インビボで1918 PB1-F2によるIFN β 誘導阻害の確認]

1918 PB1-F2タンパク質が実際にインフルエンザウイルス感染モデルでIFN β の誘導を阻害するかを検証するために、各インフルエンザウイルス、すなわちPR8、1918、およびPB1-F2欠損1918(PB1-F2(-))を 5×10^2 PFUでマウスに感染させ、2日後、ウェスタンブロットを用いてマウス肺組織でウイルスタンパク質であるPB1-F2、NP(neucleoprotein)、およびHA(hemagglutinin)の発現レベルを分析した。その結果、図7aに示したように、1918株ウイルスを感染させた場合、HAおよびNPウイルスタンパク質がPR8株ウイルスを感染させたマウスに比べてさらに高く発現したことを確認した。

【0103】

このようなウイルスタンパク質の発現レベルがウイルス複製と関連があるかを調べてみるために、肺組織粉碎液で plaque assay を通じてウイルス力価を測定した。その結果、図 7 b に示したように、1918 株ウイルスの力価が PR8 株および PB1-F2 欠損ウイルスに比べて約 10 倍高いことを確認し、これは、1918 株のウイルス消滅過程に欠損があることを意味するものである。

【0104】

したがって、前記結果に基づいて各ウイルスが感染したマウス肺組織で 1918 株ウイルスの感染が IFN β 誘導を阻害するかを検証するために、RT-PCR を実施して、IFN β mRNA の発現レベルを測定した。その結果、図 7 c に示したように、1918 株ウイルスが感染した場合にのみ、IFN β の発現が顕著に阻害されたことを確認した。

10

【0105】

これに加えて、ELISA を通じて前記各ウイルスが感染したマウス肺で IFN β タンパク質の分泌量を測定した結果、図 7 d に示したように、PR8 株および PB1-F2 欠損ウイルスを感染させた場合に比べて 1918 株ウイルスが感染したマウスで IFN β タンパク質分泌量がさらに低いことを確認した。

【0106】

前記結果は、1918 株ウイルスが感染したマウスで PB1-F2 が IFN β 誘導を阻害することを意味する。

【0107】

[実施例 9 . 1918 PB1-F2 と DD $\times$ 3 の結合を介した IFN β 誘導阻害の解明]

20

1918 PB1-F2 による IFN β 誘導抑制の分子的機序を解明するために、IP を実施して 1918 PB1-F2 と相互作用するタンパク質を分析した。その結果、LC-MS/MS 分析を通じて合計 134 種のタンパク質が 1918 PB1-F2 と相互作用することが明らかになった。ひいては、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) プログラムを利用して PB1-F2 と相互作用するタンパク質に対する生物学的機能による分析を実施し、ウイルス感染に関連したタンパク質に着目して分析した。その結果、図 8 a に示したように、DD $\times$ 3X、HSP90AA1、および HSPD1 タンパク質が導き出された。これらのタンパク質は、ウイルス感染に関連したものであって、TBK1、IRF3 および INF α 2 タンパク質と相互作用すると知られている。

30

【0108】

そこで、前記結果を通じて導き出された DD $\times$ 3 に焦点を合わせて 1918 PB1-F2 と DD $\times$ 3 間の相互作用を評価するために、A549 細胞に DD $\times$ 3 を発現するプラスミド (HA-tagged DD $\times$ 3) および、PR8 または 1918 の PB1-F2 発現プラスミド (Flag-tagged PB1-F2) をトランスフェクションした後、MG132 処理条件で IP を実施した。その結果、図 8 b に示したように、1918 PB1-F2 と DD $\times$ 3 が結合することを確認した。ひいては、PR8 PB1-F2 の 68 および 69 番目のアミノ酸を 1918 PB1-F2 のもので置換させて作製した変異タンパク質 (I68T、L69P、および I68T/L69P) の発現プラスミドをトランスフェクションして、同じ実験を行った結果を通じて、DD $\times$ 3 と相互作用することを確認した。

40

【0109】

次に、1918 PB1-F2 タンパク質による DD $\times$ 3 阻害の有無を検証するために、A549 細胞を各インフルエンザウイルスで感染させた。その結果、図 8 c に示したように、1918 PB1-F2 タンパク質により DD $\times$ 3 の発現が減少した。また、各インフルエンザウイルスで感染させたマウスの肺組織でも、図 8 d のように、細胞内 DD $\times$ 3 の発現が減少したことを確認した。

【0110】

さらには、IFN β 誘導反応で IRF3 のリン酸化および核内への移動が現れるので、

50

本発明者らは、1918 PB1-F2がIRF3の核内への移動を阻害するかを調べてみるために、IRF3の核内への移動を評価した。その結果、図8eに示したように、1918 PB1-F2タンパク質によりIRF3の核内への移動が減少する反面、DDX3の添加によってこのような現象が回復されることを確認した。このような結果は、1918 PB1-F2がDDX3との相互作用を通じてIFN β 誘導を抑制することを意味する。

【0111】

上記結果をもう一度検証するために、A549細胞にPR8および1918のPB1-F2発現プラスミドおよびDDX3発現プラスミドをトランスフェクションした後、IFN β mRNA発現量変化をtrans-complementationアッセイを通じて分析した結果、図8fに示したように、1918 PB1-F2によりIFN β mRNAの発現が減少したが、DDX3発現によりIFN β mRNAの発現が再び増加することを確認した。

10

【0112】

この結果は、1918 PB1-F2タンパク質がDDX3との結合を通じてIFN β 誘導を抑制することを意味するものである。

【0113】

[実施例10．インビボで組換えDDX3処理による1918 PB1-F2インフルエンザウイルスの病原性減少の確認]

前記実施例の結果を通じて解明された1918 PB1-F2とDDX3の相互作用によるIFN β の分泌阻害機序を証明するために、IFN β 誘導でDDX3の役割を検証しようとした。このために、インビボ実験を通じて1918インフルエンザウイルスを感染させたマウスモデルで組換えDDX3タンパク質の投与によりIFN β 誘導抑制が回復され得るかを検証するために行い、実験過程を図9aに示した。

20

【0114】

その結果、図9bに示したように、DDX3を投与したマウス全部が2週間生存したことを確認した。これに加えて、マウス肺のウイルス力価を測定した結果、図9cから明らかのように、対照群グループに比べてDDX3タンパク質を投与したマウスで37倍程度低いことを確認し、これは、DDX3添加によってウイルス消滅が起こったことを意味するものである。また、図9dを通じてマウス肺組織でDDX3タンパク質発現により細胞内IFN β の発現が増加することを確認した。

30

【0115】

前記結果を通じてDDX3が1918 PB1-F2ウイルス感染からマウスを保護することが分かった。また、本実施例を通じて解明した高病原性のインフルエンザウイルス1918株の先天免疫反応回避モデルを図10に図示した。

【0116】

前記記述した本発明の説明は、例示のためのものであり、本発明の属する技術分野における通常の知識を有する者は、本発明の技術的思想や必須の特徴を変更することなく、他の具体的な形態に容易に変形可能であることを理解することができる。したがって、以上で記述した実施例は、すべての面において例示的なものであり、限定的でないものと理解しなければならない。

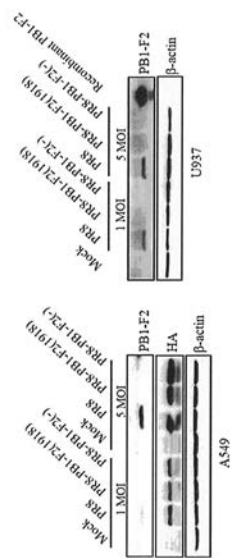
40

【産業上の利用可能性】

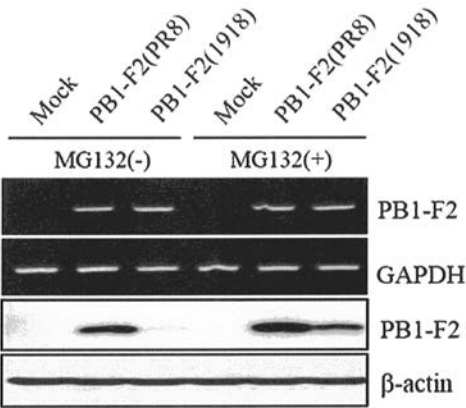
【0117】

本発明で新しく解明したPB1-F2タンパク質変異体によるウイルスの先天免疫反応回避機序は、抗ウイルス剤の開発のための新しい理解を提供するものであり、本発明による抗ウイルス用組成物は、抗ウイルス治療剤の開発に有用に利用され得るものである。

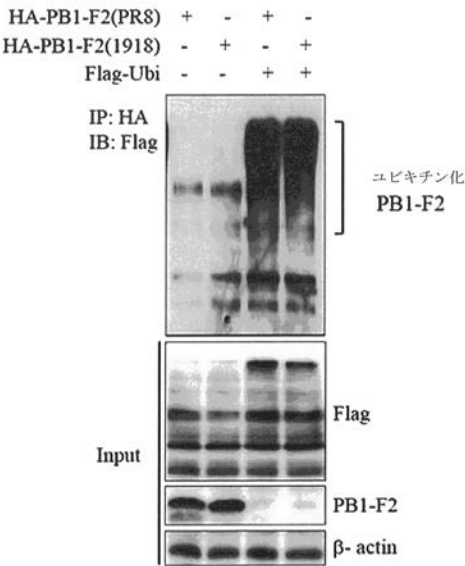
【 図 1 】



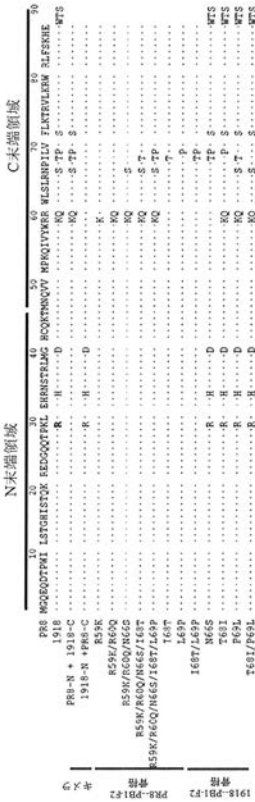
【 図 2 a 】



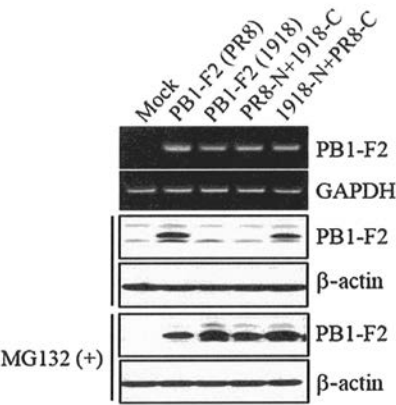
【 図 2 b 】



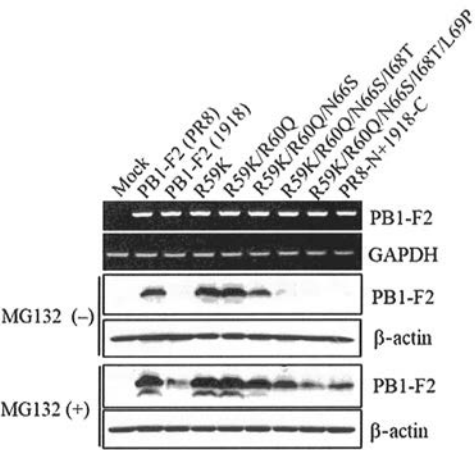
【 図 3 a 】



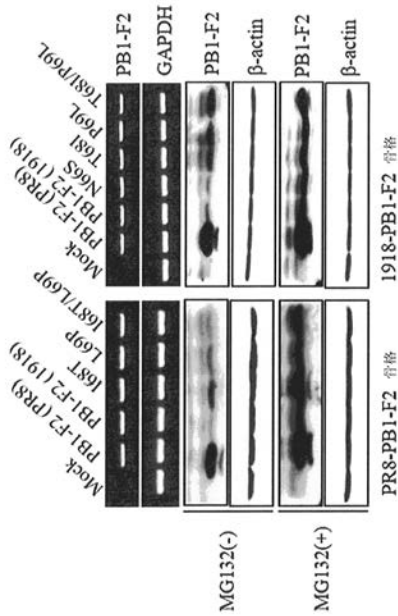
【 図 3 b 】



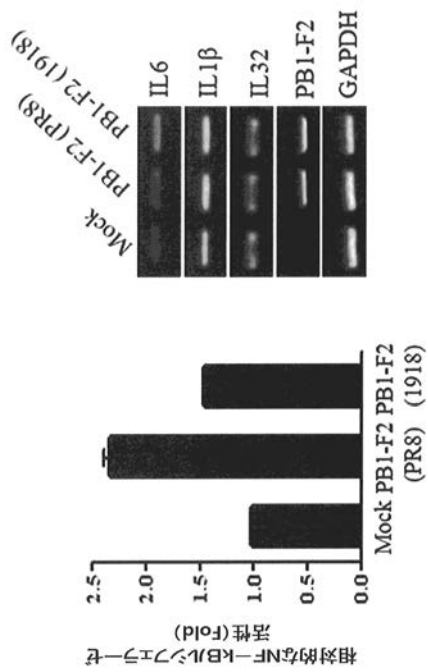
【 図 3 c 】



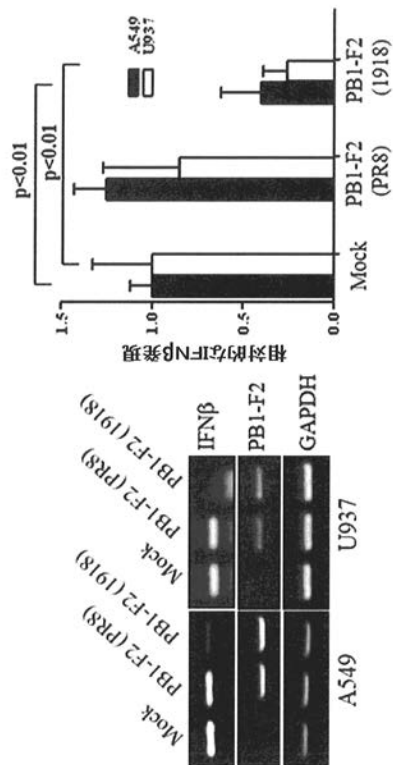
【 図 3 d 】



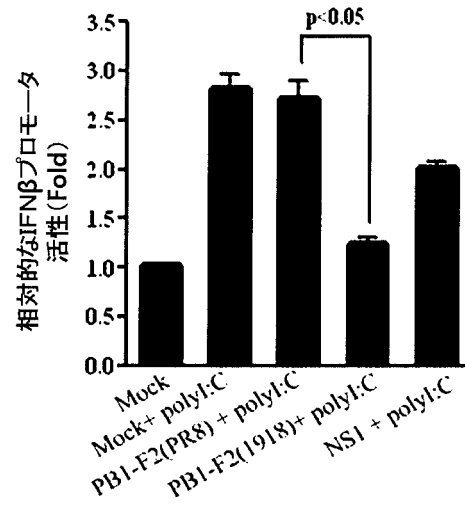
【 図 4 a 】



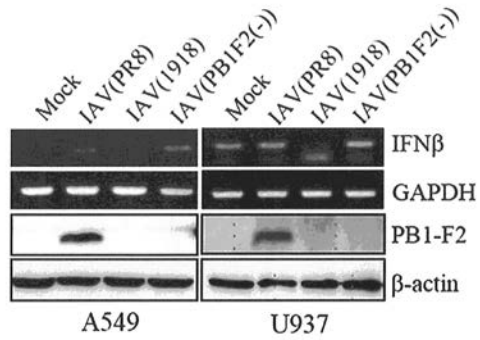
【 図 4 b 】



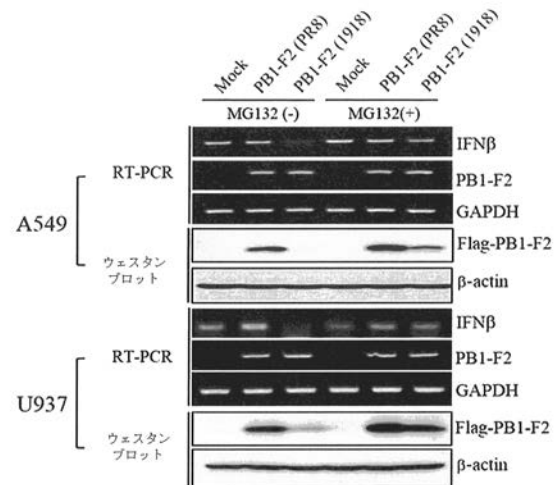
【 図 4 c 】



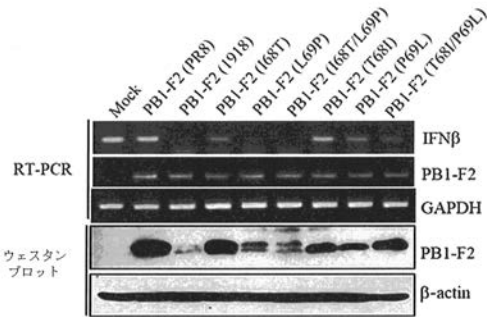
【 図 4 d 】



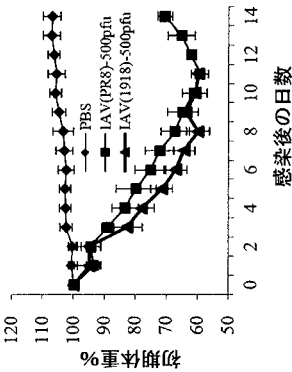
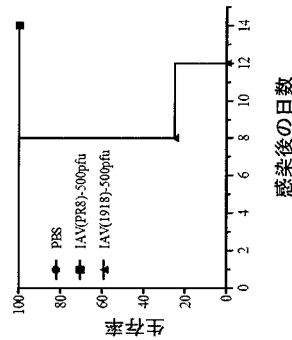
【 図 5 a 】



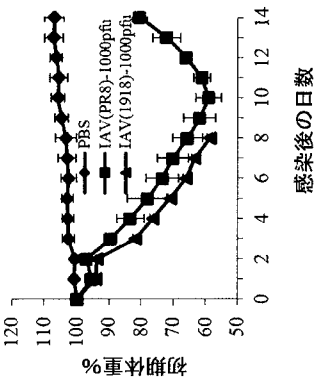
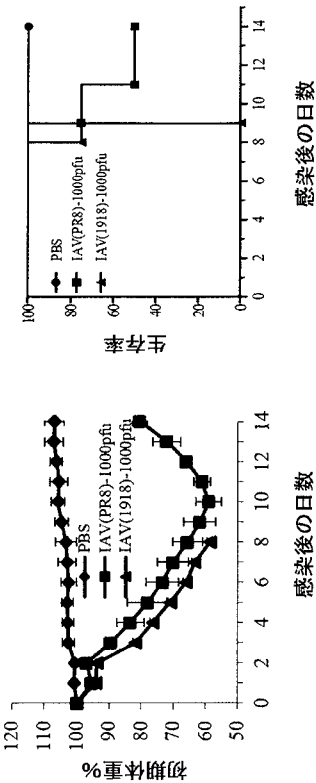
【 図 5 b 】



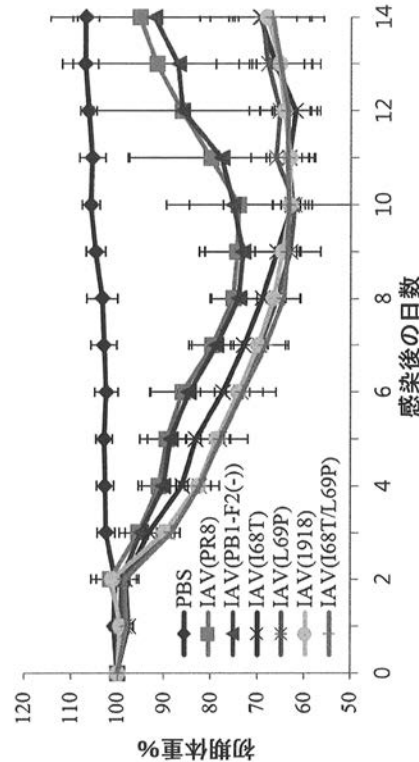
【 図 6 a 】



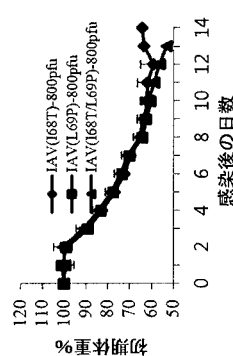
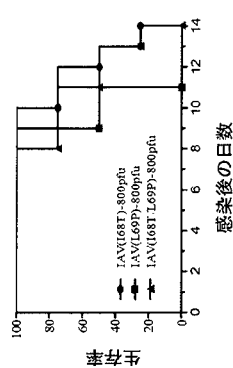
【 図 6 b 】



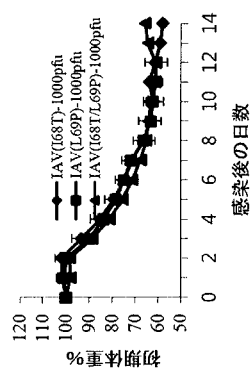
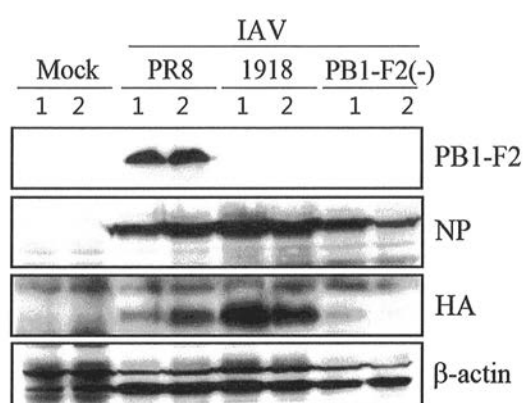
【 図 6 c 】



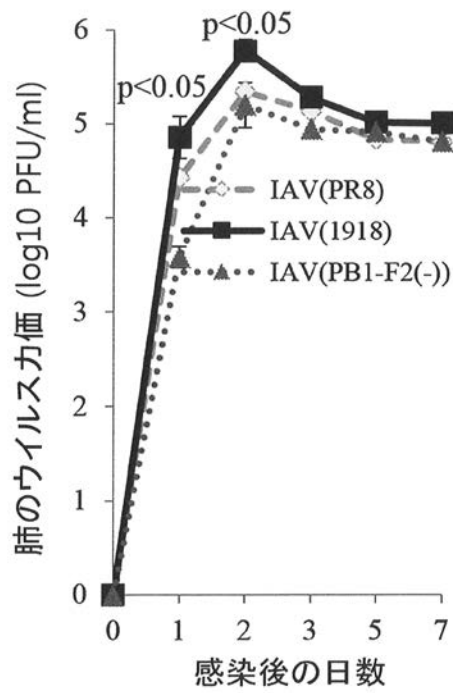
【 図 6 e 】



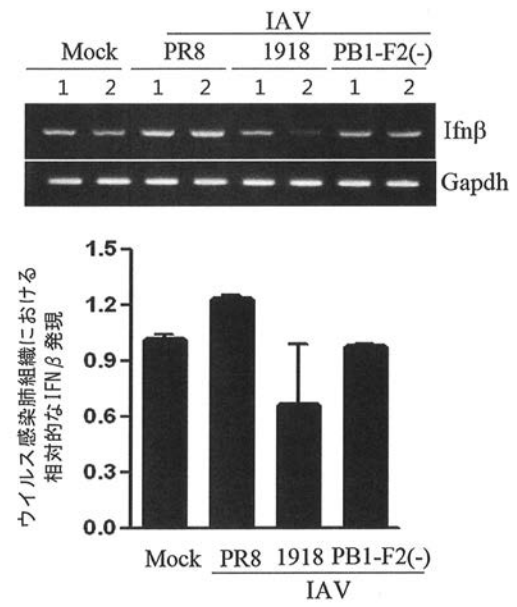
【 図 7 a 】



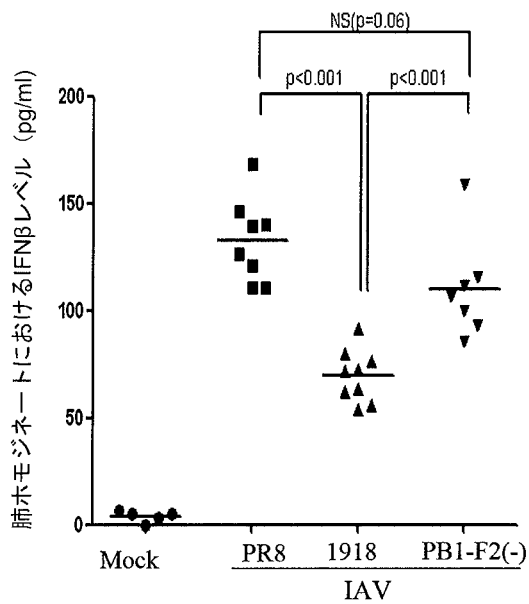
【図 7 b】



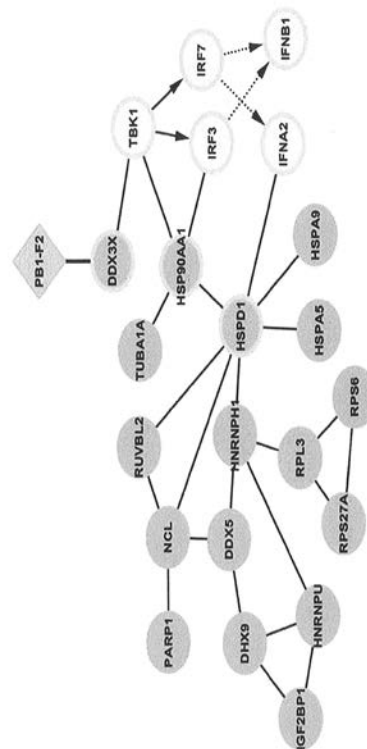
【図 7 c】



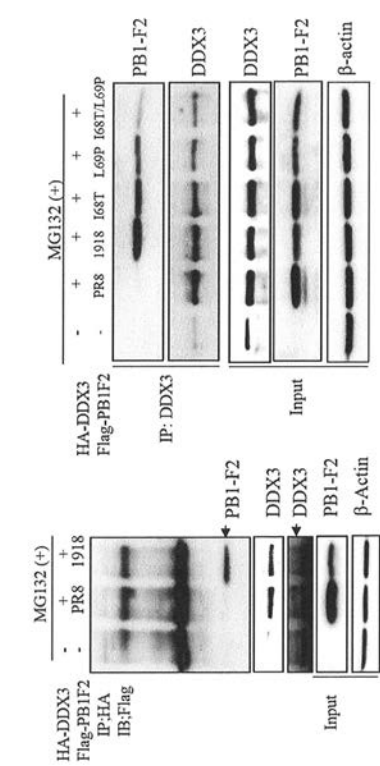
【図 7 d】



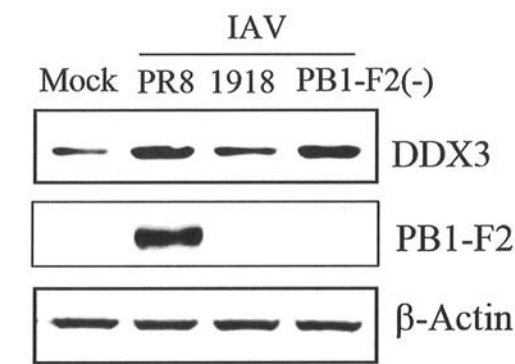
【図 8 a】



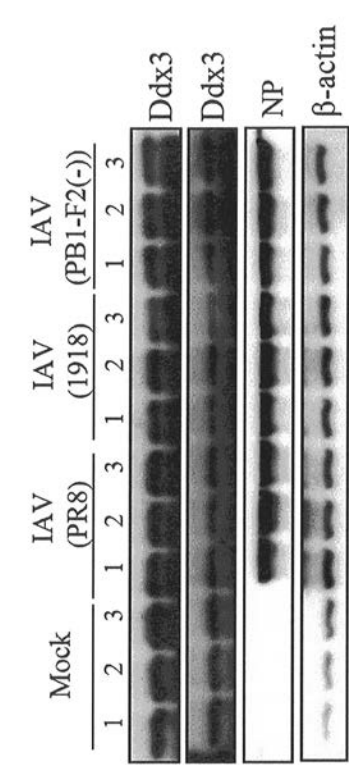
【 図 8 b 】



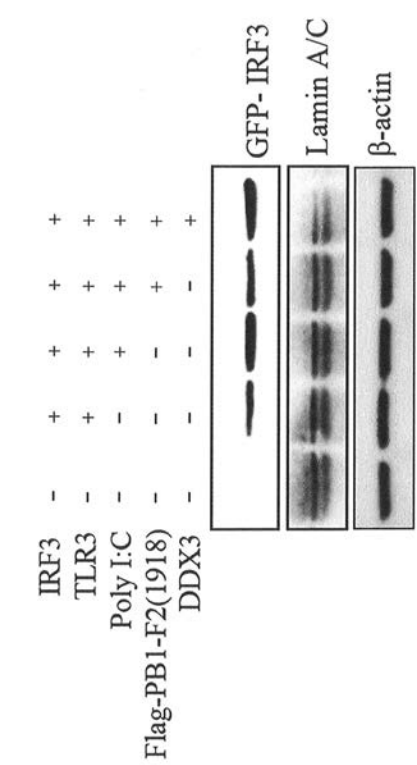
【 図 8 c 】



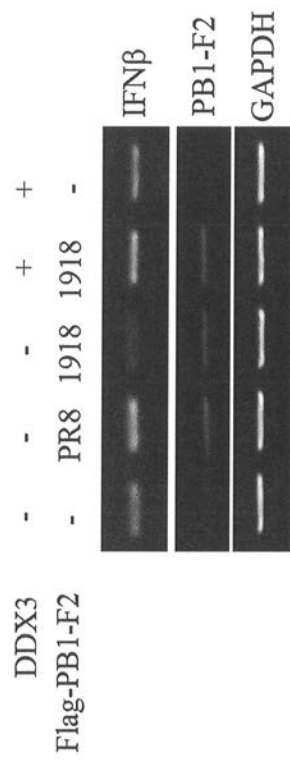
【 図 8 d 】



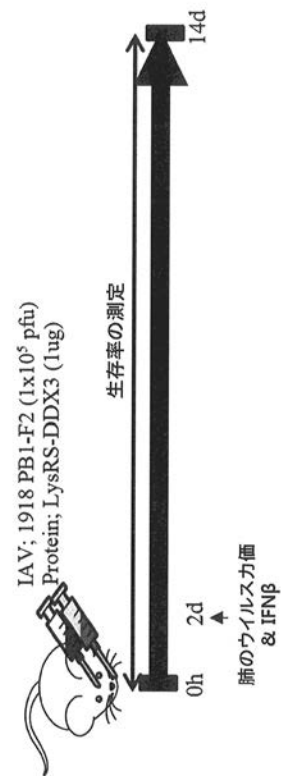
【 図 8 e 】



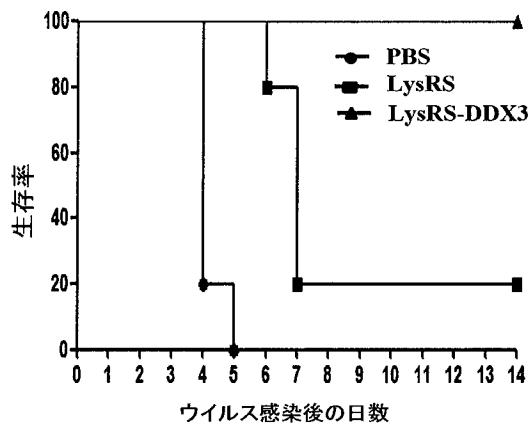
【図 8 f】



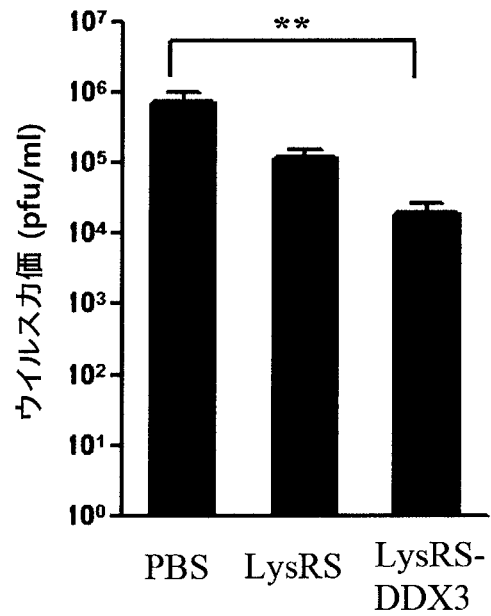
【図 9 a】



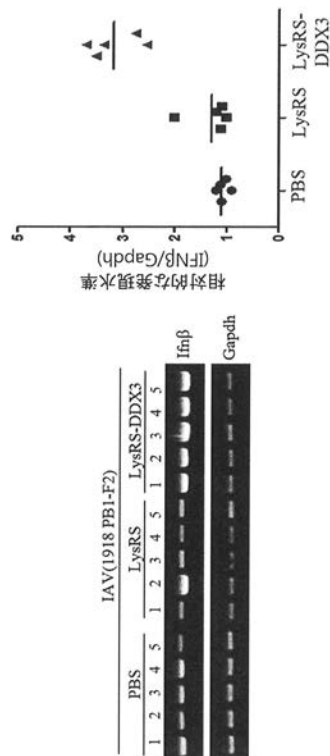
【図 9 b】



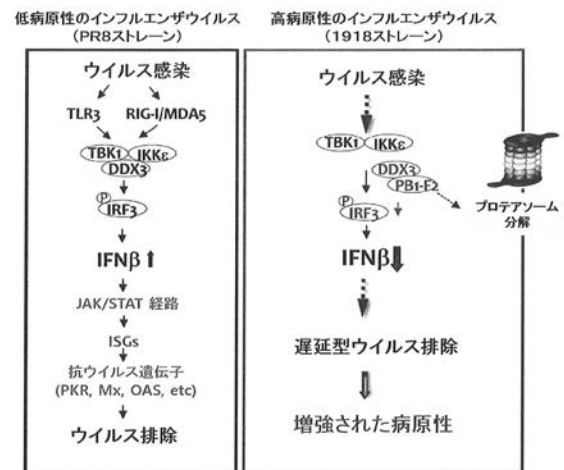
【図 9 c】



【図 9 d】



【図 10】



【配列表】

2020510682000001.app

【手続補正書】

【提出日】令和1年5月28日(2019.5.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1のアミノ酸配列からなるPB1-F2タンパク質の68番目および69番目のアミノ酸が置換されたタンパク質変異体を含む、高病原性ウイルス検出用マーカー組成物。

【請求項2】

前記タンパク質変異体は、68番目および69番目のアミノ酸がそれぞれスレオニン(Threonine)およびプロリン(proline)で置換されている、請求項1に記載のマーカー組成物。

【請求項3】

前記タンパク質変異体は、配列番号2のアミノ酸配列からなる、請求項2に記載のマーカー組成物。

【請求項4】

前記ウイルスは、インフルエンザウイルスである、請求項1～3のいずれか一項に記載のマーカー組成物。

【請求項5】

配列番号 1 のアミノ酸配列からなる P B 1 - F 2 タンパク質の 6 8 番目および 6 9 番目のアミノ酸が置換されたタンパク質変異体を測定する製剤を含む、高病原性ウイルス検出用組成物。

【請求項 6】

前記タンパク質変異体は、6 8 番目および 6 9 番目のアミノ酸がそれぞれスレオニン (Threonine) およびプロリン (proline) で置換されている、請求項 5 に記載の検出用組成物。

【請求項 7】

前記タンパク質変異体は、配列番号 2 のアミノ酸配列からなる、請求項 6 に記載の検出用組成物。

【請求項 8】

前記ウイルスは、インフルエンザウイルスである、請求項 5 ~ 7 のいずれか一項に記載の検出用組成物。

【請求項 9】

前記タンパク質変異体を測定するための製剤は、前記タンパク質に特異的に結合する抗体である、請求項 5 ~ 8 のいずれか一項に記載の検出用組成物。

【請求項 10】

請求項 5 ~ 9 のいずれか一項に記載の検出用組成物を含む、高病原性ウイルス検出キット。

【請求項 11】

配列番号 1 のアミノ酸配列からなる P B 1 - F 2 タンパク質の 6 8 番目および 6 9 番目のアミノ酸が置換されたタンパク質変異体を測定する段階を含む、高病原性ウイルス検出方法。

【請求項 12】

前記タンパク質変異体は、6 8 番目および 6 9 番目のアミノ酸がそれぞれスレオニン (Threonine) およびプロリン (proline) で置換されている、請求項 11 に記載の検出方法。

【請求項 13】

前記タンパク質変異体は、配列番号 2 のアミノ酸配列からなる、請求項 12 に記載の検出方法。

【請求項 14】

前記ウイルスは、インフルエンザウイルスである、請求項 11 ~ 13 のいずれか一項に記載の検出方法。

【請求項 15】

D D X 3 (D E A D box protein 3) と P B 1 - F 2 タンパク質の結合阻害剤を有効成分として含む、インフルエンザ A ウイルスに対する抗ウイルス用組成物であって、

前記 P B 1 - F 2 タンパク質は、配列番号 1 のアミノ酸配列で 6 8 番目および 6 9 番目のアミノ酸が置換されている、組成物。

【請求項 16】

前記 D D X 3 は、配列番号 3 のアミノ酸配列からなる、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記結合阻害剤は、核酸、化合物、微生物培養液または抽出物、天然物抽出物、ペプチド、基質類似体、アプタマー (aptamer)、および抗体からなる群より選択されるいずれか 1 つである、請求項 15 又は 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

前記 P B 1 - F 2 タンパク質は、6 8 番目および 6 9 番目のアミノ酸がそれぞれスレオニン (Threonine) およびプロリン (proline) で置換されている、請求項 15 ~ 17 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 19】

前記 P B 1 - F 2 タンパク質は、配列番号 2 のアミノ酸配列からなる、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記組成物は、細胞内インターフェロン β (I F N β) の生成を増加させる、請求項 15 ~ 19 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 21】

(a) インビトロ上で細胞に候補物質を処理する段階；

(b) 前記細胞で D D X 3 (D E A D b o x p r o t e i n 3) と P B 1 - F 2 タンパク質の結合を測定する段階；および

(c) 候補物質非処理群に比べて前記 D D X 3 と P B 1 - F 2 タンパク質の結合を減少させる物質をインフルエンザ A ウイルスに対する抗ウイルス物質として選定する段階を含む、インフルエンザ A ウイルスに対する抗ウイルス物質のスクリーニング方法であって、

前記 P B 1 - F 2 タンパク質は、配列番号 1 のアミノ酸配列で 68 番目および 69 番目のアミノ酸が置換されている、スクリーニング方法。

【請求項 22】

前記候補物質は、核酸、化合物、微生物培養液または抽出物、天然物抽出物、ペプチド、基質類似体、アプタマー (a p t a m e r) 、および抗体からなる群より選択される、請求項 21 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 23】

前記核酸は、s i R N A 、s h R N A 、m i c r o R N A 、アンチセンス R N A 、アプタマー (a p t a m e r) 、L N A (l o c k e d n u c l e i c a c i d) 、P N A (p e p t i d e n u c l e i c a c i d) 、およびモルフォリノ (m o r p h o l i n o) よりなる群から選択される、請求項 22 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 24】

前記 (b) 段階は、ウェスタンブロッティング (w e s t e r n b l o t t i n g) 、免疫沈降法 (i m m u n o p r e c i p i t a t i o n) 、免疫化学染色法 (i m m u n o h i s t o c h e m i s t r y) 、および免疫蛍光染色法 (i m m u n o f l u o r e s c e n c e) からなる群より選択される方法を利用して測定する、請求項 21 ~ 23 のいずれか一項に記載のスクリーニング方法。

【請求項 25】

前記 P B 1 - F 2 タンパク質は、68 番目および 69 番目のアミノ酸がそれぞれスレオニン (T h r e o n i n e) およびプロリン (p r o l i n e) で置換されている、請求項 21 ~ 24 のいずれか一項に記載のスクリーニング方法。

【請求項 26】

前記 P B 1 - F 2 タンパク質は、配列番号 2 のアミノ酸配列からなる、請求項 25 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 27】

D D X 3 (D E A D b o x p r o t e i n 3) と P B 1 - F 2 タンパク質の結合阻害剤を有効成分として含む抗ウイルス用組成物を個体 (但し、ヒトを除く) に投与する段階を含む、インフルエンザ A ウイルスの治療方法。

【請求項 28】

請求項 15 ~ 20 のいずれか一項に記載の抗ウイルス用組成物の、インフルエンザ A ウイルス感染治療用製剤の製造のための使用。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2017/013843
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
G01N 33/569(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i		
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) G01N 33/569; C07H 21/04; C12Q 1/70; G01N 33/68; G01N 33/50		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: influenza, PB1-F2, substitution, pathogenic, detection		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ALYMOVA, I. V. et al., 'A novel cytotoxic sequence contributes to influenza A viral protein PB1-F2 pathogenicity and predisposition to secondary bacterial infection' Journal of Virology, 2014, Vol. 88, No. 1, pp. 503-515 See abstract; and figure 1.	1-26,28
A	US 2012-0282593 A1 (MCCULLERS, J. A. et al.) 08 November 2012 See the whole document.	1-26,28
A	CONENELLO, G. M. et al., 'A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence' PLoS Pathogens, 2007, Vol. 3, Issue 10, Article no. e141, pp. 1414-1421 See the whole document.	1-26,28
A	CONENELLO, G. M. et al., 'A single N66S mutation in the PB1-F2 protein of influenza A virus increases virulence by inhibiting the early interferon response in vivo' Journal of Virology, 2011, Vol. 85, No. 2, pp. 652-662 See the whole document.	1-26,28
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 February 2018 (19.02.2018)		Date of mailing of the international search report 19 February 2018 (19.02.2018)
Name and mailing address of the ISA/KR  International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer KIM, Sun Hee  Telephone No. +82-42-481-5405

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/KR2017/013843

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RAMAN, S. N. T. et al., 'DDX3 interacts with influenza A virus NS1 and NP proteins and exerts antiviral function through regulation of stress granule formation' Journal of Virology, April 2016, Vol. 90, No. 7, pp. 3661-3675 See the whole document.	1-26, 28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2017/013843

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.: 27
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 27 pertains to a method for treatment of the human body by therapy, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv), to search.
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:

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 an 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.:

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/013843

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2012-0282593 A1	08/11/2012	None	

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 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 31/16 (2006.01)	A 6 1 P 31/16	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 N 15/44 (2006.01)	C 1 2 N 15/44	

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

- (72) 発明者 パク、ウン ソク
大韓民国 0 5 5 0 2 ソウル、ソンパ - グ、オリンピック - ロ、1 3 5、2 0 8 - 7 0 2
- (72) 発明者 パク、ヨン - ミン
大韓民国 0 3 3 5 6 ソウル、ウンペン - グ、トンキル - ロ、7 8 0、3 - 7 0 2
- (72) 発明者 ソン、ペク イン
大韓民国 0 2 8 7 8 ソウル、ソンプク - グ、テサカン - ロ、4 6
- (72) 発明者 ビョン、ヨン ホ
大韓民国 0 8 2 2 4 ソウル、クロ - グ、チョンカン - ロ 5 - ギル、2 4、1 - 8 0 3
- (72) 発明者 イ、ヒョ ミン
大韓民国 0 3 7 8 1 ソウル、ソテムン - グ、ヨンファイ - ロ、3 8 - 2 0、1 0 2 - 1 5 0 1

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA28 AA40 CB17 DA14 DA36 FB01 FB02 FB03 FB12
GC15 JA01
4B063 QA01 QA13 QA17 QA18 QA19 QQ08 QQ10 QQ13 QQ53 QQ61
QR08 QR32 QR48 QR62 QR80 QR81 QS05 QS10 QS14 QS25
QS33 QS38 QX01
4C084 AA17 NA14 ZB33 ZC02
4H045 AA10 AA30 BA21 CA01 EA53 FA74

【要約の続き】

ウイルスを有用に検出することができる。また、本発明で新しく解明した P B 1 - F 2 タンパク質変異体によるウイルスの先天免疫反応回避機序は、抗ウイルス製剤の開発のための新しい理解を提供するものであり、本発明による抗ウイルス用組成物は、抗ウイルス治療製剤の開発に有用に利用され得る。

【選択図】 図 1 0

专利名称(译)	用于检测高致病性流感病毒的标记及其用途		
公开(公告)号	JP2020510682A	公开(公告)日	2020-04-09
申请号	JP2019548846	申请日	2017-11-29
[标]发明人	キムキョンファン パクウンソク		
发明人	キム、キョン-ファン パク、ウン ソク パク、ヨン-ミン ソン、ペク イン ピョン、ヨン ホ イ、ヒョ ミン		
IPC分类号	C07K14/11 G01N33/569 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 C12Q1/02 A61K45/00 A61P31/16 A61P43/00 C12N15/44		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N33/574 G01N33/6893 G01N33/569 G01N33/5008 G01N2333/11 G01N2500/02 C07K14/005 C07K2319/00 C12N2760/16122 G01N33/505		
FI分类号	C07K14/11 G01N33/569.ZNA.L G01N33/53.D G01N33/50.Z G01N33/15.Z C12Q1/02 A61K45/00 A61P31/16 A61P43/00.111 C12N15/44		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA28 2G045/AA40 2G045/CB17 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GC15 2G045/JA01 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA17 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ10 4B063/QQ13 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR62 4B063/QR80 4B063/QR81 4B063/QS05 4B063/QS10 4B063/QS14 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS38 4B063/QX01 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB33 4C084/ZC02 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA21 4H045/CA01 4H045/EA53 4H045/FA74		
优先权	1020160159926 2016-11-29 KR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了一种用于检测高致病性流感病毒的标记物，其包括通过替代PB1-F2蛋白的氨基酸68和69制备的蛋白突变体，用于检测高致病性病毒的组合物，包括用于测量该蛋白突变体的试剂，以及 包括该试剂盒的检测试剂盒，用于检测高致病性病毒的方法（包括测量蛋白质突变体），针对甲型流感病毒的抗病毒组合物，其中包括在PB1-F2蛋白（其中68和69位氨基酸被取代）与DDX3之间的结合抑制剂，以及用于筛选针对甲型流感病毒的抗病毒物质的方法。

