

(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2015-513535

(P2015-513535A)

(43) 公表日 平成27年5月14日 (2015.5.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C O 8 4
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	4 C O 8 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C O 8 6
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-558090 (P2014-558090)	(71) 出願人	591100596
(86) (22) 出願日	平成25年2月20日 (2013.2.20)		アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ
(85) 翻訳文提出日	平成26年10月16日 (2014.10.16)		サンテ エ ドゥ ラ ルシエルシュ メ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/053391		ディカル
(87) 国際公開番号	W02013/124327		フランス国、エフー75013 パリ、リ
(87) 国際公開日	平成25年8月29日 (2013.8.29)		ュ・ドゥ・トルビアック 101
(31) 優先権主張番号	12305193.0	(71) 出願人	595040744
(32) 優先日	平成24年2月21日 (2012.2.21)		サントル・ナショナル・ドゥ・ラ・ルシエ
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		ルシュ・シャンティフィク
(31) 優先権主張番号	12306281.2		CENTRE NATIONAL DE
(32) 優先日	平成24年10月17日 (2012.10.17)		LA RECHERCHE SCIENT
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		IFIQUE
			フランス国、75016 パリ、リュ・ミ
			シェル・アンジュ 3
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウイルス侵入補助因子としてのTIMレセプター

(57) 【要約】

本発明は、ウイルス侵入補助因子、特にフラビウイルス感染などのホスファチジルセリン保有ウイルス感染を予防または治療するためのホスファチジルセリンとTIMレセプターとの間の相互作用の阻害剤の使用に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ウイルス感染を予防または治療するための使用のための、ホスファチジルセリンと T I M レセプターとの間の相互作用の阻害剤であって、

(i) T I M レセプター阻害剤、および / または

(i i i) ホスファチジルセリン結合タンパク質

である阻害剤。

【請求項 2】

T I M レセプターが、T I M - 1、T I M - 3 または T I M - 4 である、請求項 1 (i) 記載の使用のための阻害剤。

10

【請求項 3】

T I M レセプター阻害剤が、抗 T I M レセプター抗体、アンチセンス核酸、模倣体または変異型 T I M レセプターである、請求項 1 または 2 記載の使用のための阻害剤。

【請求項 4】

ホスファチジルセリン結合タンパク質が、抗ホスファチジルセリン抗体またはアネキシン 5 である、請求項 1 または 2 記載の使用のための阻害剤。

【請求項 5】

T I M レセプター阻害剤が、配列番号 1、2、3、または 4 の配列の s i R N A である、請求項 3 記載の使用のための阻害剤。

【請求項 6】

20

ウイルスがホスファチジルセリン保有ウイルスである、請求項 1 記載の使用のための阻害剤。

【請求項 7】

ホスファチジルセリン保有ウイルスが、アルファウイルスまたはフラビウイルスである、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項記載の使用のための阻害剤。

【請求項 8】

アルファウイルスがチクングニヤウイルスである、請求項 7 記載の使用のための阻害剤。

【請求項 9】

フラビウイルスが、ウエストナイルウイルス、黄熱ウイルスまたはデング熱ウイルスである、請求項 7 記載の使用のための阻害剤。

30

【請求項 10】

前記阻害剤が、少なくとも 1 種の他の抗ウイルス化合物と組み合わせて連続的または同時のいずれかで投与するための、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項記載の使用のための阻害剤。

【請求項 11】

他の抗ウイルス化合物が、ホスファチジルセリンと T A M レセプターとの相互作用の阻害剤である、請求項 10 記載の使用のための阻害剤。

【請求項 12】

40

ホスファチジルセリンと T A M レセプターとの相互作用の阻害剤が、

(i) T A M レセプター阻害剤、および / または

(i i) G a s 6 阻害剤

である、請求項 11 記載の使用のための阻害剤。

【請求項 13】

前記阻害剤が、薬学的に許容されうる組成物に製剤化される、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項記載の使用のための阻害剤。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項記載の阻害剤および追加的に少なくとも 1 種の他の抗ウイルス化合物を含む薬学的組成物。

【請求項 15】

50

少なくとも１種の他の抗ウイルス化合物が、ホスファチジルセリンとＴＡＭレセプターとの相互作用の阻害剤である、請求項１４記載の薬学的組成物。

【請求項１６】

ホスファチジルセリンとＴＡＭレセプターとの相互作用の阻害剤が、

(i) ＴＡＭレセプター阻害剤、および／または

(i i) Ｇａｓ ６ 阻害剤

である、請求項１５記載の薬学的組成物。

【請求項１７】

細胞内へのホスファチジルセリン保有ウイルス、特にフラビウイルスの侵入を阻害する *in vitro* 方法における、請求項１～９のいずれか一項記載の阻害剤の使用。

10

【請求項１８】

ウイルス感染、特にフラビウイルス感染などの *P t d S e r* 保有ウイルス感染を予防または治療するための方法であって、それを必要とする個体に、ホスファチジルセリンとＴＩＭレセプターとの間の相互作用の阻害剤の治療有効量を投与することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

発明の分野

本発明は、ウイルス感染を予防または治療するための、ホスファチジルセリンとＴＩＭレセプターとの間の相互作用の阻害剤の使用に関する。

20

【０００２】

発明の背景

ウイルス感染は、公衆衛生にとっての大きな脅威である。ウイルスによって引き起こされる生死に関わる疾患（例えば出血熱および脳炎）の出現および拡大は、まだ対処されていない従来の予防アプローチ（例えばワクチン）と共に、これらの致命的な病原体をターゲティングする新しい戦略を探究する必要性を浮き彫りにしている。

【０００３】

例えばフラビウイルス属は、単一のプラス鎖ＲＮＡゲノムを収容している７０種を超える小型エンベロープウイルスを包含している。デングウイルス（ＤＶ）、黄熱ウイルス（ＹＦＶ）、およびウエストナイルウイルス（ＷＮＶ）などのこの属のいくつかのメンバーは、出血熱および脳炎を含めた多様な医学的に関連するヒト疾患を引き起こす蚊媒介ヒト病原体である（Gould and Solomon, 2008, Lancet, 371:200-509; Gubler et al., 2007, Fields Virology, 5th Edition, 1153-1252）。抗原的に関係する４つの血清型（ＤＶ１～ＤＶ４）によって引き起こされるデング病は、この数十年間の世界的な健康問題として出現し、最も医学的に関連するアルボウイルス疾患の一つである。年間５０００万～１億のデング症例が発生し、２５億人を超える人々が感染のリスクに曝されていると推定されている。４つの血清型のどれによる感染も、軽い発熱から生死に関わるデング出血熱（ＤＨＦ）およびデングショック症候群（ＤＳＳ）にわたる疾患を引き起こす。ヒト病原体としてのＤＶの重要性および増え続ける発生率にかかわらず、現在のところＤＶに対して利用できる認可されたワクチンはなく、抗ウイルス薬の欠如が治療法の選択肢をひどく制限している。

30

40

【０００４】

デング病と闘うための今後の取り組みは、ＤＶの生活環をよりよく理解することを必要とする。ターゲット細胞内へのＤＶの侵入は、ホストの範囲、細胞親和性およびウイルスの病原性の主な決定因子であるので、予防的抗ウイルス戦略と同様に治療的抗ウイルス戦略のための有望なターゲットである。ＤＶは、一次感染時に、ウイルス糖タンパク質（Ｅタンパク質）と細胞レセプターとの間の相互作用によって駆動される過程であるクラスリン媒介性エンドサイトーシスによってホスト細胞に侵入する。エンドソーム内で酸性環境がＥタンパク質の不可逆的三量体化をトリガーし、それがウイルス膜と細胞膜との融合を招き、サイトゾル内にウイルスキャプシドおよびゲノムＲＮＡを放出させる。現在までに

50

ウイルス侵入に至る D V - ホスト相互作用の分子的基盤はあまり理解されておらず、D V 細胞レセプター（一つまたは複数）の同一性に関してほとんど分かっていない。D V は広範囲の細胞型に感染することが分かっている。したがって、D V はターゲット細胞に応じて異なるレセプターを活用するか、または広く発現されている侵入分子を利用する可能性がある。初期の研究から、D V ビリオンが細胞膜上のヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合することによってホストと最初の接触を行うことが示された。これらの分子は、E タンパク質表面の正荷電した残基を認識する。そして、これらの分子は、ターゲット細胞の表面にウイルスを集め、その後ウイルスが侵入因子と相互作用すると考えられている。熱ショックタンパク質 70 (HSP70)、HSP90、GRP78/Bip、リポ多糖レセプター CD14 または 37/67 kDa 高親和性ラミニンなどの数多くの細胞タンパク質が推定上の D V 侵入レセプターとして提唱されている。しかし、ウイルス侵入に果たすそれらの機能はあまり特徴づけられていないままであり、生理学的関連性が不明である。現在までに唯一ははっきりと特徴づけられた、D V 侵入プログラムに能動的に関与する因子は、樹状細胞上に発現される DC-SIGN、肝臓類洞内皮細胞上に発現される L-SIGN およびマクロファージ上に発現されるマンノースレセプター (MR) である。これらの分子は C 型レクチンレセプターファミリーに属し、D V の E タンパク質上に発現した富マンノース N 結合型グリカンと結合する。しかし、D V が DC-SIGN、MR または L-SIGN を発現しない細胞型に感染することは、他の関連侵入レセプター（一つまたは複数）が存在し、依然として特定されていないことを示している。

10

20

【0005】

現在、D V は世界的な問題になり、110ヶ国よりも多い国で地方病である。したがって、D V 感染の予防的処置または治療的処置の開発が必要とされる。

【0006】

そのうえ、D V のインターナリゼーションメカニズムを明らかにすることも、他のウイルス感染の処置を開発する道を開く可能性がある。

【0007】

発明の説明

本発明者らは、D V 感染が D V ウイルスエンベロープ表面に存在するホスファチジルセリン (PtdSer) とホスト細胞表面に存在する TIM レセプターとの間の相互作用によって媒介されること、および当該相互作用を遮断することによってホスト細胞内への D V の侵入を阻害して D V 感染を予防することができることを見いだした。

30

【0008】

さらに本発明者らは、ホスファチジルセリン (PtdSer) と TIM レセプターとの間のこの相互作用が、黄熱ウイルス (YFN) およびウエストナイルウイルス (WNV) などの他のフラビウイルスだけでなく、例えばチクングニヤウイルスによっても利用されることを見いだした。これは、この相互作用が膜内にホスファチジルセリン (PtdSer) を組み入れているウイルスによって活用される一般メカニズムを表しうることを示している。

【0009】

したがって本発明は、ウイルス感染、特にフラビウイルス感染などのホスファチジルセリン (PtdSer) 保有ウイルス感染を予防または治療するための使用のための、ホスファチジルセリンと TIM レセプターとの間の相互作用の阻害剤に関し、ここで該阻害剤は、好ましくは (i) TIM レセプター阻害剤、および / または (ii) ホスファチジルセリン結合タンパク質である。好ましくは、該相互作用は直接相互作用である。

40

【0010】

「ホスファチジルセリン保有ウイルス感染」は、特に「フラビウイルス感染」を意味する。「フラビウイルス感染」は、デングウイルス (DV)、ウエストナイルウイルス、ダニ媒介脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルスまたは黄熱ウイルス感染を意味する。好ましくは、該 TIM レセプターは、TIM-1、TIM-3 または TIM-4 である。好ましくは、該 TIM レセプター阻害剤は、抗 TIM レセプター抗体、

50

アンチセンス核酸、模倣体または変異型 T I M レセプターであり、好ましくは、該 T I M レセプター阻害剤は s i R N A である。好ましくは、該ホスファチジルセリン結合タンパク質は抗ホスファチジルセリン抗体またはアネキシン 5 である。

【 0 0 1 1 】

ホスファチジルセリンと T I M レセプターとの間の相互作用の阻害剤および追加的に少なくとも 1 種の他の抗ウイルス化合物を含む薬学的組成物も提供される。好ましくは、該少なくとも 1 種の他の抗ウイルス化合物は、ホスファチジルセリンと T A M レセプターとの間の相互作用の阻害剤である。

【 0 0 1 2 】

さらに、細胞へのウイルス、特にフラビウイルスなどの P t d S e r 保有ウイルスの侵入を阻害する方法におけるホスファチジルセリンと T I M レセプターとの間の相互作用の阻害剤の使用が提供される。

10

【 0 0 1 3 】

ウイルス感染、特にフラビウイルス感染などの P t d S e r 保有ウイルス感染を予防または治療するための方法であって、それを必要とする個体にホスファチジルセリンと T I M レセプターとの間の相互作用の阻害剤の治療有効量を投与することを含む方法も提供される。

【 0 0 1 4 】

ウイルス感染、特に P t d S e r 保有ウイルス感染、特にフラビウイルス感染を予防または治療するための医薬を製造するための、ホスファチジルセリンと T I M レセプターとの間の相互作用の阻害剤の使用も提供される。

20

【 0 0 1 5 】

定義

「ホスファチジルセリン保有ウイルス感染」は、その膜に P t d S e r を発現または組み込んでいるエンベロープウイルスの感染を意味する。感染前に、ウイルス膜上の P t d S e r が宿主細胞のレセプターに曝される。P t d S e r を保有するエンベロープウイルスの例には、非限定的にフラビウイルス（デングウイルス、ウエストナイルウイルス、黄熱ウイルスなど）、アルファウイルス（例えばチクングニヤウイルス）、フィロウイルス（例えばエボラウイルス）、ポックスウイルス（Poxivirus）（例えば牛痘ウイルス）およびアレナウイルス（例えばラッサウイルス）が含まれる。

30

【 0 0 1 6 】

「ホスファチジルセリン保有ウイルス感染」には、例えば「フラビウイルス感染」が含まれる。「フラビウイルス感染」は、デングウイルス（D V）、ウエストナイルウイルス、ダニ媒介脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルスまたは黄熱ウイルスの感染を意味する（Sabin et al., 1952, A.B. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1:30-50; Hammon et al., 1960, Trans. Assoc. Am. Physicians 73:140-155; Smithburn, 1940, Am. J. Trop. Med., 20:471-492; Monath and Heinz, 1996, Flaviviruses, Fields Virology, 3rd edition, p.961-1034; Gould and Solomon, 2008, Lancet, 371:500-509）。デングウイルスは、任意の血清型、すなわち血清型 1、2、3 または 4 でありうる。

【 0 0 1 7 】

40

「ホスファチジルセリンと T I M レセプターとの間の相互作用」は、P t d S e r 保有ウイルスの表面に存在するホスファチジルセリンと、宿主細胞の表面に存在する T I M レセプターとの間の直接相互作用を意味する。実際に、本発明者らは、ホスファチジルセリンと T I M レセプターとの間の直接相互作用が、宿主細胞への P t d S e r 保有ウイルスの感染または侵入を許すことを見いだした。

【 0 0 1 8 】

「阻害剤」は、ホスファチジルセリンと T I M レセプターとの間の相互作用を減少または消失させることができる物質を意味する。該阻害剤は、また、T I M レセプターの発現を減少または消失させることができる。本発明によると、該阻害剤は、(i) T I M レセプター阻害剤および / または (i i i) ホスファチジルセリン結合タンパク質である。

50

【 0 0 1 9 】

好ましくは、該阻害剤は、ホスファチジルセリンとTIMレセプターとの間の相互作用を、少なくとも10、20、30、40%、より好ましくは少なくとも50、60、70%、最も好ましくは少なくとも75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%減少または消失させることができる。

【 0 0 2 0 】

本明細書において参照されるポリペプチドおよび核酸は、本明細書において開示されるアミノ酸配列および核酸配列ならびに前記配列の変異型の双方を含む。

【 0 0 2 1 】

変異型タンパク質は、スプライス変異体、アレルおよびアイソフォームなどの天然変異体の場合があり、またはそれらはリコンビナント手段によって産生されうる。アミノ酸配列内の変異は、タンパク質のアミノ酸配列に変化を招く、タンパク質をコードする核酸配列への一つまたは複数のコドンの置換、欠失または挿入によって導入することができる。場合により、変異は、タンパク質中の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個またはそれよりも多いアミノ酸を任意の他のアミノ酸で置換することによる。追加的にまたは代替的に、変異は、タンパク質内に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個またはそれよりも多いアミノ酸を追加または欠失させることによる場合がある。

10

【 0 0 2 2 】

変異型核酸配列には、中または高ストリンジェンシー条件で配列番号1~4、6~8、11、14、15、17、19、22、23、25、29~31、32~35の配列に特異的にハイブリダイゼーションする能力がある配列が含まれる。ストリンジェントな条件または高ストリンジェンシー条件は：(1)洗浄に低イオン強度および高温、例えば50の0.015M塩化ナトリウム/0.0015Mクエン酸ナトリウム/0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを採用する；(2)ハイブリダイゼーションの際にホルムアミドなどの変性剤、例えば0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%ポリビニルピロリドン/50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)を750mM塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムと共に有する42の50%(v/v)ホルムアミドを採用する；または(3)42の50%ホルムアミド、5×SSC(0.75M NaCl、0.075Mクエン酸ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5×デンハート液、超音波処理サケ精子DNA(50μg/ml)、0.1%SDS、および10%硫酸デキストランを採用し、42の0.2×SSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)中および55の50%ホルムアミド中で洗浄し、続いて55のEDTA含有0.1×SSCから成る高ストリンジェンシー洗浄を行う条件によって特定することができる。中ストリンジェント条件は、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989によって記載されたように特定することができ、その条件は上記の条件よりもストリンジェントではない洗浄溶液およびハイブリダイゼーション条件(例えば温度、イオン強度および%SDS)の使用を含んでいる。中ストリンジェント条件の一例は、20%ホルムアミド、5×SSC(150mM NaCl、15mMクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハート液、10%硫酸デキストラン、および20mg/ml変性剪断サケ精子DNAを含む37の溶液中での一晚インキュベーションに続き、約37~50の1×SSC中でフィルターを洗浄することである。

20

30

40

【 0 0 2 3 】

本明細書において開示されたタンパク質および変異型タンパク質のフラグメントもまた、本発明によって包含される。そのようなフラグメントは、例えば全長タンパク質に比べて、N末端もしくはC末端で切断されている場合があり、または内部残基を欠如している場合がある。ある種のフラグメントは、酵素活性に可欠のアミノ酸残基を欠如している。好ましくは、該フラグメントは、少なくとも約10、20、30、40、50、60、7

50

0、80、90、100、110、120、150、250、300、350、400、450、500またはそれよりも多いアミノ酸長である。

【0024】

本明細書において開示された核酸配列および変異体のフラグメントもまた、本発明によって包含される。そのようなフラグメントは、例えば全長核酸配列に比べて、3'もしくは5'末端で切断されている場合があり、または内部塩基を欠如している場合がある。好ましくは、該フラグメントは、少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、150、250、300、350、400、450、500またはそれよりも多い塩基長である。

【0025】

変異型タンパク質には、本明細書において開示されたポリペプチド配列と少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質が含まれる。好ましくは、変異型タンパク質は、本明細書において開示されたような全長ポリペプチド配列またはポリペプチド配列のフラグメントと少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%のアミノ酸配列同一性を有する。アミノ酸配列同一性は、いかなる保存的置換も配列同一性の一部として考慮せずに、最大の配列同一率(%)を達成するために配列をアライメントし、必要に応じてギャップを導入した後の、参照配列中のアミノ酸残基と同一な変異型配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。配列同一性は、変異型配列の全長、参照配列の全長、またはその両方にわたり決定することができる。

【0026】

変異型核酸配列には、本明細書において開示された核酸配列と少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する核酸配列が含まれる。好ましくは、変異型核酸配列は、本明細書において開示された全長核酸配列または核酸配列のフラグメントと少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%のアミノ酸配列同一性を有する。核酸配列同一性は、いかなる保存的置換も配列同一性の一部として考慮せずに最大の配列同一率(%)を達成するために配列をアライメントし必要に応じてギャップを導入した後の、参照配列中の核酸残基と同一な変異型配列中の核酸のパーセンテージとして定義される。配列同一性は、変異型配列の全長、参照配列の全長、またはその両方にわたり決定することができる。

【0027】

本発明の問い合わせアミノ酸配列と少なくとも例えば95%「同一な」アミノ酸配列を有するポリペプチドは、対象ポリペプチドのアミノ酸配列が問い合わせ配列と同一であるが、但し、対象ポリペプチド配列が問い合わせアミノ酸配列のアミノ酸100個あたり最大5個のアミノ酸変化を含みうることを意味する。言い換えると、問い合わせアミノ酸配列と少なくとも95%同一なアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るために、対象配列中のアミノ酸残基の最大5%(100個中5個)は挿入されている、欠失している、または別のアミノ酸によって置換されている場合がある。

【0028】

本出願に関連して、同一パーセンテージはグローバルアライメント(すなわち2個の配列をそれらの全長にわたり比較する)を用いて計算される。2個以上の配列の同一性を比較するための方法は、当技術分野において周知である。2個の配列の全長を考慮する場合、それらの最適なアライメント(ギャップを含む)を見いだすために、例えばNeedleman-Wunschグローバルアライメントアルゴリズムを使用している「needle」プログラム(Needleman and Wunsch, 1970 J. Mol. Biol. 48:443-453)を使用することができる。needleプログラムは、例えばウェブサイトebi.ac.ukから入手することができる。本発明による

10

20

30

40

50

同一パーセンテージは、好ましくはEMBOSS::needle (グローバル) プログラムを使用して、「ギャップオープン」パラメーター = 10.0、「ギャップ伸長」パラメーター = 0.5、およびBlosom62マトリックスで計算される。

【0029】

参照配列に「少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一な」アミノ酸配列から成るタンパク質は、参照配列に比べて欠失、挿入および/または置換などの突然変異を含みうる。置換の場合、参照配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一なアミノ酸配列から成るタンパク質は、参照配列と別の種から得られた相同配列に該当しうる。

【0030】

アミノ酸置換は、保存的または非保存的でありうる。好ましくは、置換は保存的置換であり、保存的置換では、アミノ酸1個を類似の構造的および/または化学的性質を有する別のアミノ酸に置換する。置換は、好ましくは下表に示されるような保存的置換に該当する。

【0031】

【表1】

保存的置換	アミノ酸の種類
Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Phe, Trp	脂肪族疎水性側鎖をもつアミノ酸
Ser, Tyr, Asn, Gln, Cys	非荷電であるが極性の側鎖をもつアミノ酸
Asp, Glu	酸性側鎖をもつアミノ酸
Lys, Arg, His	塩基性側鎖をもつアミノ酸
Gly	中性側鎖

【0032】

用語「抗体」は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的活性部分、すなわち抗原と免疫特異的に結合する抗原結合部位を含む分子を表す。このように、抗体という用語は、抗体分子全体だけでなく抗体フラグメントおよびヒト化抗体などの誘導体を含めた抗体変異体も包含する。天然抗体では、2本の重鎖がジスルフィド結合によって相互に結合し、各重鎖がジスルフィド結合によって軽鎖に結合している。軽鎖にはラムダ()およびカッパ()の2種類がある。抗体分子の機能的活性を決定する5種の主要重鎖クラス(またはアイソタイプ): IgM、IgD、IgG、IgAおよびIgEがある。各鎖は、別個の配列ドメインを含有する。軽鎖は、2個のドメイン、すなわち可変ドメイン(VL)および定常ドメイン(CL)を含む。重鎖は、4個のドメイン、すなわち可変ドメイン(VH)および3個の定常ドメイン(CH1、CH2およびCH3、まとめてCHと呼ばれる)を含む。軽鎖(VL)および重鎖(VH)の両方の可変領域は、抗原への結合認識および特異性を決定する。軽鎖(CL)および重鎖(CH)の定常領域ドメインは、抗体鎖の会合、分泌、経胎盤移動性、補体結合、およびFcレセプター(FcR)との結合などの重要な生物学的性質を付与する。Fvフラグメントは、免疫グロブリンのFabフラグメントのN末端部分であり、1本の軽鎖および1本の重鎖の可変部分から成る。抗体の特異性は、抗体結合部位と抗原決定基との間の構造相補性にある。抗体結合部位は、主に超可変領域または相補性決定領域(CDR)由来の残基から構成される。時に、非超可変領域またはフレームワーク領域(FR)由来の残基は、全体的なドメイン構造に、それ故に結合部位に影響する。相補性決定領域(CDR)は、一緒になってネイティブな免疫グロブリン結合部位の天然Fv領域の結合親和性および特異性を定義するアミノ酸配列を表す。免疫グロブリンの軽鎖および重鎖は、それぞれが各々L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3およびH-CDR1、H-CDR2、H-CDR3と称される3個のCDRを有する。したがって、抗原結合部位は、重鎖V領域および軽鎖V領域のそれぞれ由来のCDRセットを含む6個のCDRを含む。

【0033】

Kabatら (Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991) によって定義されたように、フレームワーク領域 (F R) は、C D R の間に介在するアミノ酸配列を表し、すなわち単一種において異なる免疫グロブリンの間で相対的に保存されている、免疫グロブリン軽鎖および重鎖の可変領域の部分を表す。本明細書に使用される「ヒトフレームワーク領域」は、天然ヒト抗体のフレームワーク領域に実質的に (約 85% 以上、特に 90%、95%、または 100%) 同一なフレームワーク領域である。

【0034】

本明細書に使用される用語「モノクローナル抗体」または「mAb」は、特異的抗原に対する単一アミノ酸組成の抗体分子であって、単クローンの B 細胞またはハイブリドーマによって産生されうる抗体分子を表す。モノクローナル抗体は、また、リコンビナントの場合があり、すなわちタンパク質工学によって産生される場合がある。

10

【0035】

用語「キメラ抗体」は、非ヒト動物から得られた抗体の V H ドメインおよび V L ドメインが、別の抗体、特にヒト抗体の C H ドメインおよび C L ドメインと結合したものを含む加工抗体を表す。非ヒト動物として、マウス、ラット、ハムスター、ウサギなどの任意の動物を使用することができる。キメラ抗体は、また、少なくとも 2 種の異なる抗原に対して特異性を有する多重特異性抗体を意味しうる。

【0036】

用語「ヒト化抗体」は、フレームワーク領域または「相補性決定領域」(C D R) が改変されて、親免疫グロブリンの C D R と異なる特異性のドナー免疫グロブリン由来 C D R を含むようになった抗体を表す。好ましい一態様では、「ヒト化抗体」を調製するために、マウス C D R がヒト抗体のフレームワーク領域に接ぎ合わされる。

20

【0037】

「抗体フラグメント」は、インタクトな抗体の部分、好ましくはインタクトな抗体の抗原結合領域または可変領域を含む。抗体フラグメントの例には、F v、F a b、F (a b')₂、F a b'、d s F v、s c F v、s c (F v)₂、二重特異性抗体および抗体フラグメントから形成された多重特異性抗体が含まれる。

【0038】

用語「F a b」は、分子量約 50,000 および抗原結合活性を有する抗体フラグメントであって、I g G をプロテアーゼであるババインで処理することによって得られたフラグメントのうち H 鎖の N 末端側の約半分および L 鎖全体がジスルフィド結合を介して一緒に結合している抗体フラグメントを意味する。

30

【0039】

用語「F (a b')₂」は、分子量約 100,000 および抗原結合活性を有する抗体フラグメントであって、I g G をプロテアーゼであるペプシンで処理することによって得られたフラグメントのうち、F a b よりもわずかに大きな抗体フラグメントがヒンジ領域のジスルフィド結合を経由して結合している抗体フラグメントを表す。

【0040】

用語「F a b'」は、F (a b')₂ のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断することによって得られる、分子量約 50,000 および抗原結合活性を有する抗体フラグメントを表す。

40

【0041】

単鎖 F v (「s c F v」) ポリペプチドは、通常、ペプチドをコードするリンカーによって結合された V H コード遺伝子および V L コード遺伝子を含む遺伝子融合体から発現された共有結合型 V H : : V L ヘテロ二量体である。本発明のヒト s c F v フラグメントには、好ましくは遺伝子組換え技法を用いることによって適切なコンフォメーションに保持された C D R が含まれる。「d s F v」はジスルフィド結合によって安定化された V H : : V L ヘテロ二量体である。2 価および多価抗体フラグメントは、1 価 s c F v の会合によって自然に形成させることができ、または 2 価 s c (F v)₂ のようにペプチドリンカ

50

ーによって1価s c F vを結合させることによって発生させることができる。

【0042】

用語「二重特異性抗体」は、2個の抗原結合部位を有する小型抗体フラグメントであって、重鎖可変ドメイン(VH)が軽鎖可変ドメイン(VL)に結合して同じポリペプチド鎖になったものを含む抗体フラグメント(VH-VL)を表す。同じ鎖上の2個のドメインの間で対形成させるには短すぎるリンカーを使用することによって、これらのドメインは別の鎖の相補的ドメインと対形成するよう強制され、2個の抗原結合部位を創出する。

【0043】

「アンチセンス核酸」は、RNA-RNAまたはRNA-DNAまたはRNA-PNA(タンパク質核酸; Egholm et al., 1993, Nature, 365: 566)相互作用によりターゲットRNAに結合し、ターゲットRNAの活性を変化させる非酵素的核酸分子を意味する(総説についてはStein and Cheng, 1993, Science, 261, 1004およびWoolfら、米国特許第5, 849, 902号を参照されたい)。典型的には、アンチセンス分子は、アンチセンス分子の単一連続配列に沿ってターゲット配列と相補的である。しかし、ある態様では、アンチセンス分子は、基質分子がループもしくはヘアピンを形成するように基質に結合することができ、かつ/またはアンチセンス分子がループもしくはヘアピンを形成するように結合することができる。したがって、アンチセンス分子は、2、3、4、5、6、7、8、9、10もしくはそれよりも多い非連続基質配列に相補的な場合があり、またはアンチセンス分子の2、3、4、5、6、7、8、9、10もしくはそれよりも多い非連続配列部分がターゲット配列に相補的な場合があり、またはその両方である(例えばCrooke, 2000, Methods Enzymol., 313: 3-45参照)。加えて、アンチセンスDNAはDNA-RNA相互作用によりRNAをターゲティングすることによってRNase H(二本鎖のターゲットRNAを消化する)を活性化するために使用することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ターゲットRNAのRNase H切断を活性化する能力がある1個または複数のRNase H活性化領域を含みうる。

【0044】

アンチセンス核酸は、導入されると、通常RNA干渉(RNAi)経路と呼ばれる細胞経路に入る。用語「RNA干渉」または「RNAi」は、遺伝子サイレンシングとも呼ばれるRNAの選択的細胞内分解を表す。RNAiには、低分子干渉RNA(siRNA)による翻訳抑制も含まれる。RNAiは、長二本鎖RNA(dsRNA)もしくはsiRNAの導入、または例えばプラスミドもしくは導入遺伝子からのsiRNAの細胞内産生により開始して、1種または複数のターゲット遺伝子の発現をサイレンシングすることができる。または、RNAiは細胞内で自然に生じ、外来RNA、例えばウイルスRNAを除去する。自然RNAiは、dicerが前駆dsRNAのフラグメント化を指揮し、分解メカニズムを他の同族RNA配列に向けることを介して進行する。

【0045】

いくつかの態様では、アンチセンス核酸は、長二本鎖RNA(dsRNA)、マイクロRNA(miRNA)および/または低分子干渉RNA(siRNA)でありうる。

【0046】

本明細書に使用される「長二本鎖RNA」または「dsRNA」は、ゲノムもしくは合成起源の、またはベクターの発現から得られた、改変または非改変のオリゴリボヌクレオチドまたはポリリボヌクレオチド、およびそのフラグメントまたは部分であって、部分二本鎖または完全二本鎖の場合があり、かつ平滑末端であるか、または5'および/もしくは3'オーバーハングを含む場合があり、また、二つ折りになって二本鎖領域が得られる一本鎖オリゴリボヌクレオチドを含むヘアピン形態でもありうるものを表す。いくつかの態様では、dsRNAは、150bpから3000bpに及ぶ、好ましくは250bpから2000bpに及ぶ、いっそうより好ましくは300bpから1000bpに及ぶ大きさを有する。いくつかの態様では、該dsRNAは、少なくとも150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、400、450、500、5

10

20

30

40

50

50、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1500bpの大きさを有する。いくつかの態様では、該dsRNAは、最大で3000、2500、2000、1500、1000、950、900、850、800、750、700、650、600、550、500、450、400、350、300bpの大きさを有する。

【0047】

「低分子干渉RNA」または「siRNA」は、関心がもたれる遺伝子にターゲティングされたRNA二本鎖のヌクレオチドである。RNA二本鎖は、RNA分子の2領域の間の相補的対形成によって形成される構造を表す。siRNAは、その二本鎖部分のヌクレオチド配列が、ターゲティングされた遺伝子のヌクレオチド配列と相補的であるような遺伝子にターゲティングされる。いくつかの態様では、siRNAの二本鎖長は、ヌクレオチド15個からヌクレオチド50個に及び、好ましくはヌクレオチド20個からヌクレオチド35個に及び、いっそうより好ましくはヌクレオチド21個からヌクレオチド29個に及び。いくつかの態様では、二本鎖は、少なくとも15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、40、45、50ヌクレオチド長でありうる。いくつかの態様では、二本鎖は、最大で45、40、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15ヌクレオチド長でありうる。siRNAのRNA二本鎖部分は、ヘアピン構造の部分でありうる。二本鎖部分に加えて、ヘアピン構造は、二本鎖を形成する二つの配列の間に位置するループ部分を含有しうる。ループは、様々な長さでありうる。いくつかの態様では、ループは5、6、7、8、9、10、11、12、または13ヌクレオチド長である。ヘアピン構造は、また、3または5オーバーハング部分を含有しうる。いくつかの態様では、オーバーハングは0、1、2、3、4、または5ヌクレオチド長の3'または5'オーバーハングである。

10

20

【0048】

細胞および生物へのアンチセンス核酸の注入およびトランスフェクションが、主な送達方法である。しかし、一過性および安定トランスフェクションされた哺乳動物細胞においてアンチセンス核酸を連続的に発現させるために、発現ベクターも使用することができる。(例えば、Brummelkamp et al., 2002, Science, 296:550-553; Paddison et al., 2002, Genes & Dev, 16:948-958参照)。

30

【0049】

アンチセンス核酸は、化学合成することができ、または例えばCaruthers et al., 1992, Methods in Enzymology, 211:3-19; 国際PCT公報である国際公開公報第99/54459号; Brennan et al., 1998, Biotechnol Bioeng. 61:33-45、および米国特許第6,001,311号に記載されている当技術分野において公知のプロトコルを用いて、一本鎖DNA発現ベクターもしくはその同等物の使用により発現させることができる。非限定的な一例では、394 Applied Biosystems, Inc.合成装置で小規模合成を行う。または本発明のアンチセンス核酸分子を別々に合成し、合成後に、例えばライゲーションによって一緒につなぎ合わせることができる(国際PCT公報である国際公開公報第93/23569号; Bellon et al., 1997, Bioconjugate Chem, 8:204)。

40

【0050】

本発明のアンチセンス核酸は、ターゲティングされた遺伝子、例えばTIMレセプターの発現を、少なくとも10、20、30、40%、より好ましくは少なくとも50、60、70%、最も好ましくは少なくとも75、80、85、90、95、96、97、98、99、100%低下させることができる。

【0051】

「変異型TIMレセプター」または「変異型TAMレセプター」または「変異型Gas6タンパク質」は、それぞれTIMレセプターまたはTAMレセプターまたはGas6タンパク質と1個または数個のアミノ酸が異なるレセプターを意味する。例えば、該変異型

50

T I Mレセプターは、もはやホスファチジルセリンと結合できない点で、またはもはやそのキナーゼ活性を有することができない点で、T I Mレセプターと異なりうる。例えば、該変異型T A Mレセプターは、例えば突然変異E 6 3 R、E 6 6 RもしくはT 8 4 7 Rを保有する配列番号2 0もしくは2 1の配列のA X Lレセプターのように、もはやG a s 6タンパク質と結合できない点で、または例えば突然変異K 5 5 8 Mを保有する配列番号2 0の配列のA X Lレセプターもしくは突然変異K 5 6 7 Mを保有する配列番号2 1の配列のA X Lレセプターのように、もはやそのキナーゼ活性を有することができない点で、T A Mレセプターと異なりうる。例えば、該変異型G a s 6タンパク質は、もはやホスファチジルセリンおよび/またはT A Mレセプターと結合できない点で、G a s 6タンパク質と異なりうる。例えば、該変異型G a s 6タンパク質は、配列番号3 6の配列のG a s 6 g l a (r m G a s 6 g l aとも呼ばれる)でありうる。

10

【0052】

用語「対象」、「個体」または「ホスト」は、互換的に使用され、例えばヒトまたは非ヒト哺乳動物でありうる。例えば対象は、コウモリ；フェレット；ウサギ；ネコ科動物（ネコ）；イヌ科動物（イヌ）；霊長類（サル）、ウマ科動物（ウマ）；男性、女性、子供を含めたヒトである。

【0053】

ホスファチジルセリンとT I Mレセプターとの間の相互作用の阻害剤

ホスファチジルセリンは、リン酸基がセリンアミノ酸と結合しているリン脂質であって、C A S 番号8 0 0 2 - 4 3 - 5で参照されるリン脂質である。

20

【0054】

「T I Mレセプター」は、T細胞免疫グロブリンムチン（T I M）ファミリーのチロシンキナーゼレセプターを意味する。好ましい態様では、該T I Mレセプターは、T I M - 1、T I M - 3またはT I M - 4である。

【0055】

いくつかの態様では、T I M - 1レセプターは、

- a) 配列番号5の配列（G e n B a n k 番号A A H 1 3 3 2 5 . 1、2 0 0 3年1 0月4日更新）、
- b) 配列番号6の核酸（N C B I 参照配列N M _ 0 1 2 2 0 6 . 2、2 0 1 1年1 1月2 6日更新）によってコードされる配列、
- c) 配列番号7の核酸（N C B I 参照配列N M _ 0 0 1 0 9 9 4 1 4 . 1、2 0 1 1年1 1月2 6日更新）によってコードされる配列、
- d) 配列番号8の核酸（N C B I 参照配列N M _ 0 0 1 1 7 3 3 9 3 . 1、2 0 1 1年1 2月4日更新）によってコードされる配列、
- e) a) ~ d) の配列と少なくとも8 0、8 5、9 0、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9 %同一な配列

30

を含むまたはそれから成る。

【0056】

いくつかの態様では、T I M - 3レセプターは、

- a) 配列番号9の配列（G e n B a n k 番号A A H 2 0 8 4 3 . 1、2 0 0 3年9月1 6日更新）、
- b) 配列番号1 0の配列（G e n B a n k 番号A A H 6 3 4 3 1 . 1、2 0 0 6年7月1 5日更新）、
- c) 配列番号1 1の核酸（N C B I 参照配列N M _ 0 3 2 7 8 2 . 4、2 0 1 1年1 2月2 5日更新）によってコードされる配列、
- d) a) ~ c) の配列と少なくとも8 0、8 5、9 0、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9 %同一な配列

40

を含むまたはそれから成る。

【0057】

いくつかの態様では、T I M - 4レセプターは、

50

a) 配列番号 12 の配列 (NCBI 参照配列 NP_612388.2、2011 年 12 月 24 日更新)、

b) 配列番号 13 の配列 (NCBI 参照配列 NP_001140198.1、2011 年 12 月 25 日更新)、

c) 配列番号 14 の核酸 (NCBI 参照配列 NM_138379.2、2011 年 12 月 24 日更新) によってコードされる配列、

d) 配列番号 15 の核酸 (NCBI 参照配列 NM_001146726.1、2011 年 12 月 25 日更新) によってコードされる配列、

e) a) ~ d) の配列と少なくとも 80、85、90、95、96、97、98、99 % 同一な配列

を含むまたはそれから成る。

【0058】

いくつかの態様では、TIM レセプター阻害剤は、抗 TIM レセプター抗体、アンチセンス核酸、模倣体または変異型 TIM レセプターである。

【0059】

好ましくは、該 TIM レセプター阻害剤はアンチセンス核酸であり、より好ましくは、該 TIM レセプター阻害剤は siRNA である。該アンチセンス核酸は、配列番号 5、9、10、12、もしくは 13 の配列の TIM レセプターまたは配列番号 6、7、8、11、14 もしくは 15 の核酸によってコードされる配列の TIM レセプターの発現を阻害または減少させることができる配列を含むまたはそれから成りうる。該アンチセンス核酸は、TIM レセプターをコードする核酸、例えば配列番号 6、7、8、11、14 または 15 の配列の核酸に相補的な配列を含むまたはそれから成りうる。一態様では、該 siRNA は、配列番号 1、2、3、または 4 の配列の少なくとも 1 種の siRNA を含むまたはそれから成る。一態様では、該 siRNA は、配列番号 1、2、3、および 4 から成る群より選択される少なくとも 2、3、または 4 種の siRNA を含むまたはそれから成る。一態様では、該 siRNA は、配列番号 1、2、3、および 4 から成る群より選択される最大で 4、3、または 2 種の siRNA を含むまたはそれから成る。一態様では、該 siRNA は、配列番号 1、2、3、および 4 の配列の 4 種の siRNA を含むまたはそれから成る。

【0060】

好ましくは、該抗 TIM レセプター抗体は、Kondratowicz et al., 2011, PNAS, 108:8426-8431 に記載された抗 TIM 1 レセプター抗体 ARD5 または Sonar et al., 2010, The Journal of Clinical investigation, 120: 2767-2781 に記載された抗 TIM 1 抗体 A6G2 である。

【0061】

好ましくは、該模倣体は、TIM レセプターの細胞外ドメインを含むまたはそれから成る。例えば、該模倣体は、配列番号 5 の TIM - 1 についての残基 21 ~ 295 番のアミノ酸配列を含むもしくはそれから成りうるか、該模倣体は、配列番号 47 の TIM - 1 についての残基 21 ~ 290 番のアミノ酸配列を含むもしくはそれから成りうるか、また該模倣体は、配列番号 12 の TIM - 4 についての残基 25 ~ 314 番のアミノ酸配列を含むもしくはそれから成りうる。

【0062】

好ましくは、該抗 TIM レセプター抗体は、ホスファチジルセリンへの TIM レセプターの結合部位に対する抗体である。好ましくは、該ホスファチジルセリンへの TIM レセプターの結合部位に対する抗体は、TIM レセプターの金属イオン依存性リガンド結合部位 (MILIB) に対するものである。いっそうより好ましくは、該抗 TIM レセプターは、配列番号 5 の配列のアミノ酸 111 ~ 115 番または配列番号 12 もしくは配列番号 13 の配列のアミノ酸 119 ~ 122 番に対するものである。

【0063】

いくつかの態様では、ホスファチジルセリン結合タンパク質は、抗ホスファチジルセリ

10

20

30

40

50

ン抗体、またはホスファチジルセリンに結合することができることにより、ホスファチジルセリンとTIMレセプターとの間の相互作用を遮断するタンパク質でありうる。例えば、該抗体は、抗ホスファチジルセリン抗体クローン1H6（Upstate（登録商標））でありうる。

【0064】

好ましくは、該抗ホスファチジルセリン抗体は、TIMレセプターへのホスファチジルセリンの結合部位に対する抗体である。

【0065】

好ましくは、該ホスファチジルセリン結合タンパク質はアネキシンVである。好ましくは、該アネキシンVタンパク質は、

a) 配列番号16の配列（NCBI参照配列NP__001145.1、2012年2月1日更新）、

b) 配列番号17の配列の核酸（NCBI参照配列NM__001154.3、2011年12月18日更新）によってコードされる配列、

c) a) または b) の配列と少なくとも80、85、90、95、96、97、98、99%同一な配列を含むまたはそれから成る。

【0066】

抗ウイルス化合物

好ましい一態様では、本発明による阻害剤は、少なくとも1種の他の抗ウイルス化合物と組み合わせて連続的または同時のいずれかで投与するためのものである。

【0067】

連続的投与は、異なる（それでもなお重複しうる）時間または時点で成分が投与されることを示す。同時投与は、成分が同時に投与されることを示す。

【0068】

抗ウイルス化合物には、非限定的にノイラミニダーゼ阻害剤、ウイルス融合阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、DNAポリメラーゼ阻害剤、シグナル伝達阻害剤、逆転写酵素阻害剤、インターフェロン、ヌクレオシドアナログ、インテグラーゼ阻害剤、チミジンキナーゼ阻害剤、ウイルス糖または糖タンパク質合成阻害剤、ウイルス構造タンパク質合成阻害剤、ウイルス付着および吸着阻害剤、ウイルス侵入阻害剤およびそれらの機能的アナログが含まれうる。

【0069】

ノイラミニダーゼ阻害剤には、オセルタミビル、ザナミビルおよびペラミビルが含まれうる。ウイルス融合阻害剤には、シクロスポリン、マラビロク、エンフビルチド（enfuvirtide）およびドコサノールが含まれうる。

【0070】

プロテアーゼ阻害剤には、サキナビル、インジナビル、アンブレナビル、ネルフィナビル、リトナビル、チプラナビル、アタザナビル、ダルナビル、ザナミビルおよびオセルタミビルが含まれうる。

【0071】

DNAポリメラーゼ阻害剤には、イドクスウリジン、ビダラビン、ホスホノ酢酸、トリフルリジン、アシクロビル、ホスカルネット（foscarnet）、ガンシクロビル、ペンシクロビル、シドクロビル（cidoclovir）、ファムシクロビル、バラシクロビルおよびバルガンシクロビルが含まれうる。

【0072】

シグナル伝達阻害剤には、レスベラトロールおよびリバビリンが含まれる。ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤（NRTI）には、ジドブジン（ZDV、AZT）、ラミブジン（3TC）、スタブジン（d4T）、ザルシタビン（ddC）、ジダノシン（2', 3'-ジデオキシイノシン、ddI）、アバカビル（ABC）、エミリビン（emirivine）（FTC）、テノホビル（TDF）、デラビルジン（delaviradine）（DLV）、フゼオン（T

10

20

30

40

50

- 20)、インジナビル (IDV)、ロピナビル (LPV)、アタザナビル、コンビビル (ZDV/3TC)、カレトラ (RTV/LPV)、アデホビルジビボキシルおよびトリジビル (ZDV/3TC/ABC) が含まれる。非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (NNRTI) には、ネビラピン、デラビルジン、UC-781 (チオカルボキサニリド)、ピリジノン、TIBO、カラノリドA、カブラピリンおよびエファビレンツが含まれる。

【0073】

ウイルス侵入阻害剤には、フゼオン (T-20)、NB-2、NB-64、T-649、T-1249、SCH-C、SCH-D、PRO140、TAK779、TAK-220、RANTES アナログ、AK602、UK-427、857、関連レセプターに対するモノクローナル抗体、シアノピリン-N、シクロデキストリン、カラゲナン (carregeenan)、硫酸化またはスルホン化ポリマー、マンデル酸縮合ポリマー、AMD-3100、およびその機能的アナログが含まれる。

10

【0074】

好ましくは、該少なくとも1種の他の抗ウイルス化合物は、ホスファチジルセリンとTAMレセプターとの間の相互作用の阻害剤である。

【0075】

いくつかの態様では、該ホスファチジルセリンとTAMレセプターとの相互作用の阻害剤は、TAMレセプター阻害剤および/またはGas6阻害剤である。

20

【0076】

「TAMレセプター」は、TYRO-3、AXLまたはMERレセプターを意味する。

【0077】

好ましくは、TYRO-3レセプターは、

a) 配列番号18の配列 (NCBI 参照配列 NP_006284.2、2011年11月14日更新)、

b) 配列番号19の配列の核酸 (NCBI 参照配列 NM_006293.3、2012年1月14日更新) によってコードされる配列、

c) a) または b) の配列と少なくとも80、85、90、95、96、97、98、99% 同一な配列

を含むまたはそれから成る。

30

【0078】

好ましくは、AXLレセプターは、

a) 配列番号20の配列 (NCBI 参照配列 NP_001690.2、2011年11月26日更新)、

b) 配列番号21の配列 (NCBI 参照配列 NP_068713.2、2011年11月26日更新)、

c) 配列番号22の配列の核酸 (NCBI 参照配列 NM_021913.3、2012年1月15日更新) によってコードされる配列、

d) 配列番号23の配列の核酸 (NCBI 参照配列 NM_001699.4、2012年1月15日更新) によってコードされる配列、

e) a) ~ d) の配列と少なくとも80、85、90、95、96、97、98、99% 同一な配列

を含むまたはそれから成る。

40

【0079】

好ましくは、MERレセプターは、

a) 配列番号24の配列 (NCBI 参照配列 NP_006334.2、2011年12月24日更新)、

b) 配列番号25の配列の核酸 (NCBI 参照配列 NM_006343.2、2011年12月24日更新) によってコードされる配列、

c) a) または b) の配列と少なくとも80、85、90、95、96、97、98、

50

99%同一な配列

を含むまたはそれから成る。

【0080】

G a s 6タンパク質は、ホスファチジルセリンとT A Mレセプターとの間の相互作用を媒介する架橋分子である。

【0081】

好ましくは、G a s 6タンパク質は、

a) 配列番号26の配列(N C B I 参照配列 N P __ 0 0 0 8 1 1 . 1、2011年12月24日更新)、

b) 配列番号27の配列(N C B I 参照配列 N P __ 0 0 1 1 3 7 4 1 7 . 1、2011年12月24日更新)、

c) 配列番号28の配列(N C B I 参照配列 N P __ 0 0 1 1 3 7 4 1 8 . 1、2011年12月24日更新)、

d) 配列番号29の配列の核酸(N C B I 参照配列 N M __ 0 0 0 8 2 0 . 2、2012年1月15日更新)によってコードされる配列、

e) 配列番号30の配列の核酸(N C B I 参照配列 N M __ 0 0 1 1 4 3 9 4 5 . 1、2012年1月15日更新)によってコードされる配列、

f) 配列番号31の配列の核酸(N C B I 参照配列 N M __ 0 0 1 1 4 3 9 4 6 . 1、2012年1月15日更新)によってコードされる配列、

g) a) ~ f) の配列と少なくとも80、85、90、95、96、97、98、99%同一な配列

を含むまたはそれから成る。

【0082】

いくつかの態様では、T A Mレセプター阻害剤は、抗T A Mレセプター抗体、アンチセンス核酸、模倣体または変異型T A Mレセプターである。

【0083】

好ましくは、該T A Mレセプター阻害剤はアンチセンス核酸であり、より好ましくは該T A Mレセプター阻害剤はs i R N Aである。該アンチセンス核酸は、配列番号18、20、21、もしくは24の配列のT A Mレセプターまたは配列番号19、22、23、もしくは25の核酸によってコードされる配列のT A Mレセプターの発現を阻害または減少させることができる配列を含むまたはそれから成りうる。該アンチセンス核酸は、T A Mレセプターをコードする核酸、例えば配列番号19、22、23、または25の配列の核酸に相補的な配列を含むまたはそれから成りうる。一態様では、該s i R N Aは、配列番号32、33、34または35の配列の少なくとも1種のs i R N Aを含むまたはそれから成る。一態様では、該s i R N Aは、配列番号32、33、34、および35から成る群より選択される少なくとも2、3、または4種のs i R N Aを含むまたはそれから成る。一態様では、該s i R N Aは、配列番号32、33、34、および35から成る群から選択される群より選択される最大で4、3、2、または1種のs i R N Aを含むまたはそれから成る。一態様では、該s i R N Aは、配列番号32、33、34、および35の配列の4種のs i R N Aを含むまたはそれから成る。

【0084】

好ましくは、該模倣体は、T A Mレセプターの細胞外ドメインを含むまたはそれから成る。例えば該模倣体は、配列番号20または配列番号21のアミノ酸26 ~ 451番を含むまたはそれから成りうる。

【0085】

いっそうより好ましくは、該模倣体は、可溶性形態のT A Mレセプター細胞外ドメインを含むまたはそれから成る。例えば、該模倣体は、配列番号18のアミノ酸41 ~ 428番の配列、または配列番号20もしくは配列番号21のアミノ酸33 ~ 440番の配列を含むまたはそれから成りうる。

【0086】

好ましくは、該抗 T A M レセプター抗体は、G a s 6 タンパク質への T A M レセプターの結合部位に対する抗体である。好ましくは、該抗 T A M レセプター抗体は、配列番号 20 または配列番号 21 の配列のアミノ酸 63 ~ 84 番に対するものである。

【0087】

いくつかの態様では、G a s 6 阻害剤は、抗 G a s 6 抗体、アンチセンス核酸、模倣体または変異型 G a s 6 タンパク質である。

【0088】

好ましくは、該 G a s 6 阻害剤はアンチセンス核酸であり、より好ましくは該 G a s 6 阻害剤は s i R N A である。該アンチセンス核酸は、配列番号 26、27、もしくは 28 の配列の G a s 6 タンパク質または配列番号 29、30、もしくは 31 の核酸によってコードされる配列の G a s 6 タンパク質の発現を阻害または減少させることができる配列を含むまたはそれから成りうる。該アンチセンス核酸は、G a s 6 またはそのフラグメントをコードする核酸、例えば配列番号 29、30、または 31 の配列の核酸に相補的な配列を含むまたはそれから成りうる。

【0089】

好ましくは、該 G a s 6 阻害剤は、配列番号 36 の配列の変異型 G a s 6 タンパク質 G a s 6 G l a である。

【0090】

好ましくは、該 G a s - 6 模倣体は、配列番号 26 の残基 53 ~ 94 番のアミノ酸配列を含むもしくはそれから成りうるホスファチジルセリン認識部位を含むもしくはそれから成るか、または該模倣体は、配列番号 26 の残基 298 ~ 670 番のアミノ酸配列を含むもしくはそれから成りうるレセプター結合部位を含むもしくはそれから成る。

【0091】

好ましくは、該抗 G a s 6 抗体は、T A M レセプターへの G a s 6 タンパク質の結合部位に対する抗体である。好ましくは、該抗 G a s 6 抗体は、配列番号 26 の配列のアミノ酸 304 ~ 312 番、配列番号 27 の配列のアミノ酸 31 ~ 39 番、または配列番号 28 の配列のアミノ酸 5 ~ 13 番に対するものである。

【0092】

細胞へのホスファチジルセリン保有ウイルスの侵入を阻害するための方法

本発明による阻害剤は、細胞内への P t d S e r 保有ウイルスの侵入を阻害する方法に使用することができる。

【0093】

該方法は、in vitro もしくは ex vivo 方法、または本明細書記載の P t d S e r 保有ウイルス感染の予防もしくは治療方法でありうる。

【0094】

したがって、本発明は、細胞内への P t d S e r 保有ウイルスの侵入を阻害するための in vitro または in vivo 方法における、本明細書に定義される阻害剤の使用を提供する。細胞内への P t d S e r 保有ウイルスの侵入を阻害するための in vitro または in vivo 方法における使用のための本明細書に定義される阻害剤も提供される。

【0095】

いくつかの態様では、該阻害剤は、本明細書上述に定義される少なくとも 1 種の他の抗ウイルス化合物と組み合わせた使用である。

【0096】

該方法は、例えば該阻害剤に該細胞および / または該 P t d S e r 保有ウイルスを曝露することを含みうる。方法が in vivo 方法の場合、その方法は、該阻害剤を対象、好ましくはそれを必要とする患者に投与することを含みうる。

【0097】

いくつかの態様では、該細胞は、樹状細胞、内皮細胞、星状膠細胞、肝細胞、ニューロン、クッパー細胞、および / またはマクロファージでありうる。

【0098】

10

20

30

40

50

薬学的組成物

本発明による阻害剤は、単独で、または少なくとも１種の他の抗ウイルス化合物と組み合わせ、薬学的に許容されうる組成物に製剤化することができる。

【００９９】

したがって本発明は、本発明による阻害剤および追加的に少なくとも１種の他の抗ウイルス化合物を含む薬学的組成物を提供する。

【０１００】

該少なくとも１種の他の抗ウイルス化合物は、上記に定義される化合物でありうる。

【０１０１】

一態様では、該阻害剤は、配列番号１、２、３、および４の配列の *s i R N A* から成る群より選択される少なくとも１、２、３、もしくは４種、または最大で４、３、２、もしくは１種の *s i R N A*、ならびに／あるいは本明細書上述に定義されるアネキシン V を含むまたはそれから成り、少なくとも１種の他の抗ウイルス化合物は、配列番号 32、33、34、および 35 の配列の *s i R N A* から成る群から選択される少なくとも１、２、３、もしくは４種、または最大で４、３、２、もしくは１種の *s i R N A* ならびに／あるいは本明細書上述に定義される配列番号 36 の配列の変異型 *G a s 6* タンパク質 *G a s 6 g l a* を含むまたはそれから成る。一態様では、該阻害剤は、配列番号１、２、３、および４の配列の４種の *s i R N A* ならびに／または本明細書上述に定義されるアネキシン V を含むまたはそれから成り、少なくとも１種の他の抗ウイルス化合物は、配列番号 32、33、34、および 35 の配列の４種の *s i R N A* ならびに／または本明細書上述に定義される配列番号 36 の配列の変異型 *G a s 6* タンパク質 *G a s 6 g l a* を含むまたはそれから成る。

10

20

【０１０２】

本発明による薬学的組成物は、適切な薬学的単位投薬剤形の形態で経口投与することができる。本発明の薬学的組成物は、錠剤、硬または軟ゼラチンカプセル、液剤、懸濁剤、ならびにリポゾームおよび成形ポリマーゲル剤などの他の徐放製剤が含まれる多数の剤形に調製することができる。

【０１０３】

投与様式および投薬剤形は、所与の処置適用に望ましく有効な治療剤または組成物の性質に密接に関係する。適切な投薬剤形には、非限定的に、経口、静脈内、直腸、舌下、粘膜、経鼻、眼、皮下、筋肉内、経皮、脊髄、髄腔内、関節内、動脈内、クモ膜下、気管支、およびリンパ投与、ならびに活性成分の全身送達のための他の投薬剤形が含まれる。

30

【０１０４】

本発明の薬学的組成物は、非限定的に、経皮（パッチ、ゲル、クリーム、軟膏またはイオン泳動による受動的）；静脈内（ボラス、注入）；皮下（注入、デポー）；経粘膜（バツカルおよび舌下、例えば口腔内分散錠（*orodispersible tablet*）、ウエファース、フィルム、および発泡製剤；結膜（点眼剤）；直腸（坐剤、浣腸））；または皮内（ボラス、注入、デポー）を含めた当技術分野において公知の任意の方法により投与することができる。

【０１０５】

経口液体薬学的組成物は、例えば、水性もしくは油性懸濁剤、液剤、乳剤、シロップ剤もしくはエリキシル剤の形態の場合があり、または使用前に水もしくは他の適切なビヒクルで構成するための乾燥製品として提示される場合がある。そのような液体薬学的組成物は、懸濁化剤、乳化剤、非水性ビヒクル（食用油が含まれうる）、または保存料などの通常の添加剤を含有しうる。

40

【０１０６】

本発明の薬学的組成物は、また、非経口投与（例えば注射、例えばボラス注射または連続注入による）用に製剤化される場合があり、アンプル、プレフィルドシリンジ、少量注入容器中の単位投薬剤形で、または保存料を添加された多回容器に入れて提示される場合がある。薬学的組成物は、油性または水性ビヒクル中の懸濁剤、液剤、または乳剤など

50

の形態を取る場合があり、懸濁化剤、安定化剤および／または分散剤などの製剤化剤 (formulating agent) を含有しうる。または、本発明の薬学的組成物は、無菌固体の無菌的単離または溶液からの凍結乾燥によって得られた、使用前に適切なビヒクル、例えば無菌無発熱物質水で構成するための粉末形態でありうる。

【0107】

直腸投与に適した、担体が固体の薬学的組成物は、最も好ましくは単位用量坐剤として提示される。適切な担体には、カカオ脂および当技術分野において一般に使用されている他の物質が含まれ、坐剤は、薬学的組成物を軟化または融解した担体 (1種または複数) と混合し、続いて冷却し、型に入れて成形することによって好都合に形成することができる。

10

【0108】

吸入による投与のために、本発明による薬学的組成物は、吸入器、ネブライザーもしくは加圧バック、またはエアロゾルスプレーを送達する他の好都合な手段から好都合に送達される。加圧バックは、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、二酸化炭素または他の適切な気体などの適切な噴射剤を含みうる。加圧エアロゾルの場合、投薬単位は、定量を送達するためにバルブを提供することによって決定することができる。または、吸入または吹入による投与のために、本発明の薬学的組成物は、乾燥粉末組成物、例えば薬学的組成物と乳糖またはデンプンなどの適切な粉末基剤との粉末混合物の形態を取りうる。粉末組成物は、例えば、カプセルまたはカートリッジまたは例えば吸入器もしくは吹入器の助けを借りて粉末を投与することができるゼラチンもしくはプリスターバックに入れた単位投薬剤形で提示することができる。

20

【0109】

鼻腔内投与のために、本発明の薬学的組成物は、プラスチックボトルアトマイザーなどの液体スプレーを介して投与することができる。これらのうちMistomerg (イソプロテレノール吸入器、Wintrop) およびMedihaler (登録商標) (イソプロテレノール吸入器、Riker) が典型的である。

【0110】

アンチセンス核酸の投与のために、本発明の薬学的組成物は、リボゾーム、マイクロパーティクル、マイクロカプセル、脂質系担体システム内への被包が含まれる形態に調製することができる。本発明における使用に適する代替的な脂質系担体システムの非限定的な例には、ポリカチオンポリマー核酸複合体 (例えば米国特許出願公開第20050222064号参照)、シクロデキストリンポリマー核酸複合体 (例えば米国特許出願公開第20040087024号参照)、生分解性ポリ3アミノエステルポリマー核酸複合体 (例えば米国特許出願公開第20040071654号参照)、pH感受性リボゾーム (例えば米国特許出願公開第20020192274号参照)、アニオン系リボゾーム (例えば米国特許出願公開第20030026831号参照)、カチオン系リボゾーム (例えば米国特許出願公開第20030229040号参照)、可逆マスクリボプレックス (reversibly masked lipoplex) (例えば米国特許出願公開20030180950号参照)、細胞型特異的リボゾーム (例えば米国特許出願公開20030198664号参照)、ポリマーマトリックス含有マイクロパーティクル (例えば米国特許出願公開20040142475号参照)、pH感受性リボプレックス (例えば米国特許出願公開20020192275号参照)、遊離可能な親水性ポリマーで誘導体化された脂質を含有するリボゾーム (例えば米国特許出願公開第20030031704号参照)、脂質に封入された核酸 (例えばPCT特許公報である国際公開公報第03/057190号参照)、脂質に被包された核酸 (例えば米国特許出願公開第20030129221号参照)、ポリカチオン系ステロール誘導体核酸複合体 (例えば米国特許第6,756,054号参照)、他のリボゾーム組成物 (例えば米国特許出願公開第20030035829号参照)、他のマイクロパーティクル組成物 (例えば米国特許出願公開第20030157030号参照)、リボプレックス (例えばPCT特許公報である国際公開公報第03/066069号参照)、エマルション組成物 (例えば米国特許第6,747,014号参照)、縮合核酸複合体 (例えば

30

40

50

米国特許出願公開第20050123600号参照)、他のポリカチオン系核酸複合体(例えば米国特許出願公開第20030125281号参照)、ポリビニルエーテル核酸複合体(例えば米国特許出願公開第20040156909号参照)、多環状アミジニウム核酸複合体(例えば米国特許出願公開第20030220289号参照)、ナノカプセルおよびマイクロカプセル組成物(例えばPCT特許公報である国際公開公報第02/096551号参照)、リポゾームとエマルションとの安定化混合物(例えばEP1304160参照)、ポルフィリン核酸複合体(例えば米国特許第6,620,805号参照)、脂質核酸複合体(例えば米国特許出願公開第20030203865号参照)、核酸マイクロエマルション(例えば米国特許出願公開第20050037086号参照)、カチオン脂質系組成物(例えば米国特許出願公開第20050234232号参照)が含まれる。当業者は、本発明の改変 siRNA がネイキッドな siRNA 分子としても送達できることを認識している。

10

【0111】

本発明の薬学的組成物は、また、着香料、着色料、抗菌剤、または保存料などの他の佐剤を含有する場合がある。

【0112】

さらに、処置への使用に必要とされる薬学的組成物の量は、選択された治療剤だけでなく、投与経路、処置される状態の性質ならびに患者の年齢および状態に応じて変動し、最終的に主治医または臨床医の判断に任されることが、認識されている。

20

【0113】

投与および処置方法

本発明は、また、本発明による阻害剤の治療有効量を投与することを含む、それを必要とする個体における P t d S e r 保有ウイルス感染を予防または治療するための方法に関する。

【0114】

「治療」は治療的使用(すなわち所与の疾患を有する患者に対する)を意味し、「予防」は予防的使用(すなわち所与の疾患を発生しやすい個体に対する)を意味する。用語「治療」には、疾患の完全治癒に至る治療だけでなく、疾患の進行を減速する、および/または患者の生存期間を延長する治療も含まれる。

30

【0115】

「有効量」は、所望の治療的または予防的結果を達成するために必要な薬用量および時間で有効な量を表す。

【0116】

本発明の阻害剤の治療有効量は、病状、年齢、性別、および個体の体重、ならびにタンパク質が所望の治療的結果を誘起する能力などの要因に応じて変動しうる。治療有効量は、阻害剤の任意の毒性作用または有害作用に治療的有益効果が勝る量を包含する。治療有効量は、また、有益性、例えば臨床的有益性を付与するために十分な量を包含する。

【0117】

本発明に関連して、「ホスファチジルセリン保有ウイルス感染を予防する」は、P t d S e r 保有ウイルスの感染または宿主細胞内への侵入の予防を意味しうる。

40

【0118】

本発明に関連して、「ホスファチジルセリン保有ウイルス感染を治療する」は、ホスファチジルセリン保有ウイルスの感染または宿主細胞内への侵入を後退、軽減、または阻害することを意味しうる。

【0119】

本発明に関連して、ホスファチジルセリン保有ウイルス感染は、少なくとも30、35、40、45、50、55、60、65、70、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100%減少しうる。

【0120】

いくつかの態様では、本発明の方法は、上記に定義される少なくとも1種の他の抗ウイ

50

ルス化合物と組み合わせて上記に定義される阻害剤を連続的または同時のいずれかで投与することを含む。例えば、該少なくとも１種の他の抗ウイルス化合物は、本明細書上述に定義されるホスファチジルセリンとＴＡＭレセプターとの間の相互作用の阻害剤である。

【０１２１】

別の態様では、該方法は、本発明による薬学的組成物の投与を含む。

【０１２２】

投与方式は全身方式でありうる。投与様式および投薬剤形は、所与の処置適用に望ましく有効な治療剤または組成物の性質に密接に関係する。適切な投薬剤形および投与経路には、非限定的に、経口、静脈内、直腸、舌下、粘膜、経鼻、眼、皮下、筋肉内、経皮、脊髄、髄腔内、関節内、動脈内、クモ膜下、気管支、およびリンパ投与、ならびに／または

10

【０１２３】

投与方式は、例えば少なくとも５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００日間でありうる。

【０１２４】

用量範囲は、０．１mg/kg/日から１００mg/kg/日の間でありうる。より好ましくは、用量範囲は０．５mg/kg/日から１００mg/kg/日の間である。最も好ましくは、用量範囲は１mg/kg/日から８０mg/kg/日の間である。最も好ましくは、用量範囲は５mg/kg/日から５０mg/kg/日の間または１０mg/kg/日から４０mg/kg/日の間である。

20

【０１２５】

いくつかの態様では、用量は、少なくとも０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１、１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０mg/kg/日でありうる。いくつかの態様では、用量は最大で５０、４５、４０、３５、３０、２５、２０、２５、１５、１０、５、１、０．５、０．１mg/kg/日でありうる。

【０１２６】

用量範囲は、また、１０から１００００UI/kg/日の間でありうる。より好ましくは、用量範囲は５０から５０００UI/kg/日の間または１００から１０００UI/kg/日の間である。

30

【０１２７】

いくつかの態様では、用量は、少なくとも１０、２５、５０、７５、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１５００、２０００、２５００、３０００、３５００、４０００、４５００、５０００、５５００、６０００、６５００、７０００、７５００、８０００、８５００、９０００、９５００、１００００UI/kg/日でありうる。いくつかの態様では、用量は最大で１００００、９５００、９０００、８５００、８０００、７５００、７０００、６５００、６０００、５５００、５０００、４５００、４０００、３５００、３０００、２５００、２０００、１５００、１０００、９００、８００、６００、５００、４５０、４００、３５０、３００、２５０、２００、１５０、１００UI/kg/日でありうる。

40

【０１２８】

以下の図面および実施例を参照して、これから本発明をより詳細に説明する。本明細書に引用される全ての文献および特許文書は、本明細書によって参照により組み入れられる。

【０１２９】

配列リスト

配列番号１にTIM-1に対するsiRNAの配列5'-AAACUCAACUGUUC CUAACA-3'を示す。

配列番号２にTIM-1に対するsiRNAの配列5'-CGGAAGGACACACG CUAUA-3'を示す。

50

配列番号 3 に T I M - 1 に対する s i R N A の配列 5' - G C A G A A A C C C A C C C U A C G A - 3' を示す。

配列番号 4 に T I M - 1 に対する s i R N A の配列 5' - G G U C A C G A C U A C U C C A A U U - 3' を示す。

配列番号 5 に G e n B a n k 番号 A A H 1 3 3 2 5 . 1 で参照される T I M - 1 レセプターのアミノ酸配列を示す。

配列番号 6 に N C B I 参照配列 N M _ 0 1 2 2 0 6 . 2 で参照される T I M - 1 レセプターの核酸配列を示す。

配列番号 7 に N C B I 参照配列 N M _ 0 0 1 0 9 9 4 1 4 . 1 で参照される T I M - 1 レセプターの核酸配列を示す。

配列番号 8 に N C B I 参照配列 N M _ 0 0 1 1 7 3 3 9 3 . 1 で参照される T I M - 1 レセプターの核酸配列を示す。

配列番号 9 に G e n B a n k 番号 A A H 2 0 8 4 3 . 1 で参照される T I M - 3 レセプターのアミノ酸配列を示す。

配列番号 10 に G e n B a n k 番号 A A H 6 3 4 3 1 . 1 で参照される T I M - 3 レセプターのアミノ酸配列を示す。

配列番号 11 に N C B I 参照配列 N M _ 0 3 2 7 8 2 . 4 で参照される T I M - 3 レセプターの核酸配列を示す。

配列番号 12 に N C B I 参照配列 N P _ 6 1 2 3 8 8 . 2 で参照される T I M - 4 レセプターのアミノ酸配列を示す。

配列番号 13 に N C B I 参照配列 N P _ 0 0 1 1 4 0 1 9 8 . 1 で参照される T I M - 4 レセプターのアミノ酸配列を示す。

配列番号 14 に N C B I 参照配列 N M _ 1 3 8 3 7 9 . 2 で参照される T I M - 4 レセプターの核酸配列を示す。

配列番号 15 に N C B I 参照配列 N M _ 0 0 1 1 4 6 7 2 6 . 1 で参照される T I M - 4 レセプターの核酸配列を示す。

配列番号 16 に N C B I 参照配列 N P _ 0 0 1 1 4 5 . 1 で参照される アネキシン 5 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 17 に N C B I 参照配列 N M _ 0 0 1 1 5 4 . 3 で参照される アネキシン 5 の核酸配列を示す。

配列番号 18 に N C B I 参照配列 N P _ 0 0 6 2 8 4 . 2 で参照される T Y R O - 3 レセプターのアミノ酸配列を示す。

配列番号 19 に N C B I 参照配列 N M _ 0 0 6 2 9 3 . 3 で参照される T Y R O - 3 レセプターの核酸配列を示す。

配列番号 20 に N C B I 参照配列 N P _ 0 0 1 6 9 0 . 2 で参照される A X L レセプターのアミノ酸配列を示す。

配列番号 21 に N C B I 参照配列 N P _ 0 6 8 7 1 3 . 2 で参照される A X L レセプターのアミノ酸配列を示す。

配列番号 22 に N C B I 参照配列 N M _ 0 2 1 9 1 3 . 3 で参照される A X L レセプターの核酸配列を示す。

配列番号 23 に N C B I 参照配列 N M _ 0 0 1 6 9 9 . 4 で参照される A X L レセプターの核酸配列を示す。

配列番号 24 に N C B I 参照配列 N P _ 0 0 6 3 3 4 . 2 で参照される M E R レセプターのアミノ酸配列を示す。

配列番号 25 に N C B I 参照配列 N M _ 0 0 6 3 4 3 . 2 で参照される M E R レセプターの核酸配列を示す。

配列番号 26 に N C B I 参照配列 N P _ 0 0 0 8 1 1 . 1 で参照される G a s 6 タンパク質のアミノ酸配列を示す。

配列番号 27 に N C B I 参照配列 N P _ 0 0 1 1 3 7 4 1 7 . 1 で参照される G a s 6 タンパク質のアミノ酸配列を示す。

10

20

30

40

50

配列番号 28 に N C B I 参照配列 N P _ 0 0 1 1 3 7 4 1 8 . 1 で参照される G a s 6 タンパク質のアミノ酸配列を示す。

配列番号 29 に N C B I 参照配列 N M _ 0 0 0 8 2 0 . 2 で参照される G a s 6 タンパク質の核酸配列を示す。

配列番号 30 に N C B I 参照配列 N M _ 0 0 1 1 4 3 9 4 5 . 1 で参照される G a s 6 タンパク質の核酸配列を示す。

配列番号 31 に N C B I 参照配列 N M _ 0 0 1 1 4 3 9 4 6 . 1 で参照される G a s 6 タンパク質の核酸配列を示す。

配列番号 32 に A X L に対する s i R N A の配列 5' - A C A G C G A G A U U U A U G A C U A - 3' を示す。

配列番号 33 に A X L に対する s i R N A の配列 5' - G G U A C C G G C U G G C G U A U C A - 3' を示す。

配列番号 34 に A X L に対する s i R N A の配列 5' - G A C G A A A U C C U C U A U G U C A - 3' を示す。

配列番号 35 に A X L に対する s i R N A の配列 5' - G A A G G A G A C C C G U U A U G G A - 3' を示す。

配列番号 36 に変異型 G a s 6 G l a タンパク質の配列を示す。

配列番号 37 に T Y R O - 3 クローニング用の外部プライマーの配列を示す。

配列番号 38 に T Y R O - 3 クローニング用の内部プライマーの配列を示す。

配列番号 39 に T Y R O - 3 クローニング用の内部プライマーの配列を示す。

配列番号 40 に T Y R O - 3 クローニング用の外部プライマーの配列を示す。

配列番号 41 に A X L クローニング用のプライマーの配列を示す。

配列番号 42 に A X L クローニング用のプライマーの配列を示す。

配列番号 43 に T I M - 1 エクトドメイン増幅用のプライマーの配列を示す。

配列番号 44 に T I M - 1 エクトドメイン増幅用のプライマーの配列を示す。

配列番号 45 に T I M - 4 エクトドメイン増幅用のプライマーの配列を示す。

配列番号 46 に T I M - 4 エクトドメイン増幅用のプライマーの配列を示す。

配列番号 47 に U n i P r o t 番号 Q 9 6 D 4 2 で参照される T I M - 1 レセプターのアミノ酸配列を示す。

【図面の簡単な説明】

【0130】

【図1】T I M レセプターが D V 感染を媒介することを示す図である。293 T 細胞を表示の感染多重度 (M O I) の D V 2 - J A M で攻撃した。2 日後に、抗 N S 1 m A b を使用するフローサイトメトリーによって感染レベルを評価した。データは、少なくとも 3 回の独立した実験の平均 ± S D である。

【図2】T I M レセプターが D V 感染を媒介することを示す図である。T I M レセプターは 4 種の D V 血清型によって利用される。細胞に D V 1 - T V P、D V 3 - P A H 8 8 1 および D V 4 - 1 0 8 6 を感染させた。2 日後に、抗 P r M 2 H 2 m A b を使用するフローサイトメトリーによって感染を評価した。データは、少なくとも 3 回の独立した実験の平均 ± S D である。

【図3】T I M レセプターが D V 感染を媒介することを示す図である。T I M レセプターは、実験室適応 D V 2 New Guinea C (N G C) 株および 1 6 6 8 1 株による感染を強化する。データは、少なくとも 3 回の独立した実験の平均 ± S D である。

【図4】T I M - 1 分子および T I M - 4 分子が D V に結合することを示す図である。プロテイン A - アガロースビーズに結合している対照 F c、N K G 2 D - F c、T I M 1 - F c、または T I M - 4 - F c と共に予備インキュベーションした D V 2 - J A M のウエスタンブロット分析。プルダウンしたウイルスは 4 G 2 抗 D V E タンパク質 m A b を使用して検出した。データは、少なくとも 3 回の独立した実験の平均 ± S D である。* * p < 0.001、* * * p < 0.0001。

【図5】T I M - 1 分子および T I M - 4 分子が D V に結合することを示す図である。D

10

20

30

40

50

Vと可溶性TIM-1-Fcとの相互作用。対照Fc、NKGD2D-FcまたはTIM-1-Fcを96ウェルプレート内のプラスチック上に被覆し、DV2-JAM粒子と共に4で1時間インキュベーションした。結合しているウイルスは、ビオチン化4G2 mAbおよびHRPコンジュゲーション型抗マウスIgGを使用して検出した。データは、少なくとも3回の独立した実験の平均±SDである。 $^{**}p < 0.001$ 、 $^{***}p < 0.0001$ 。

【図6】TIM-1分子およびTIM-4分子がDVに結合することを示す図である。PtdSerはDVビリオンと結合する。DV2粒子をウェルプレート上に被覆し、抗PtdSer 11-16 mAbと共にインキュベーションした。データは、少なくとも3回の独立した実験の平均±SDである。 $^{**}p < 0.001$ 、 $^{***}p < 0.0001$ 。

【図7】TIM-1分子およびTIM-4分子がDVに結合することを示す図である。TIMが媒介するDV感染はPtdSer依存性である。アネキシンV (ANX5; 25 pg/ml) と共に予備インキュベーションしたDV2-JAM (MOI = 5) を使用して表示の細胞に感染させた。48時間後にフローサイトメトリーによって感染細胞のレベルを定量し、アネキシンV不在下の感染に対して標準化した。データは、少なくとも3回の独立した実験の平均±SDである。 $^{**}p < 0.001$ 、 $^{***}p < 0.0001$ 。

【図8】PtdSer結合ドメイン内で突然変異したTIM分子がDV感染を媒介しないことを示す図である。トランスフェクション後の細胞にDV2-JAMを感染させた。感染細胞のパーセンテージ(2日目)を示す。データは、少なくとも3回の独立した実験の平均±SDである。 $^{**}p < 0.001$ 、 $^{***}p < 0.0001$ 。

【図9】内因性TIM-1分子および内因性AXL分子がDV感染を媒介することを示す図である。抗TIM-1 IgG、抗AXL IgGまたは対照IgGの存在下でHu h7.5.1細胞に表示のDV株またはHSV-1を感染させた。24時間後に感染レベルをフローサイトメトリーによって定量し、対照IgGの存在下での感染に対して標準化した。データは、少なくとも3回の独立した実験の平均±SDである。 $^{**}p < 0.001$ 、 $^{***}p < 0.0001$ 。

【図10】内因性TIM-1分子および内因性AXL分子がDV感染を媒介することを示す図である。抗TIM-1 IgG、抗AXL IgGまたは対照IgGの存在下でA549細胞に表示のDV株またはHSV-1を感染させた。24時間後に感染レベルをフローサイトメトリーによって定量し、対照IgGの存在下での感染に対して標準化した。データは、少なくとも3回の独立した実験の平均±SDである。 $^{**}p < 0.001$ 、 $^{***}p < 0.0001$ 。

【図11】内因性TIM-1分子および内因性AXL分子がDV感染を媒介することを示す図である。表示のAbの存在下でDV2-JAMに感染したA549の代表的な免疫蛍光分析。緑色：抗PrM 2H2、青色：DAPI。スケールバー：100 μm。データは、少なくとも3回の独立した実験の平均±SDである。 $^{**}p < 0.001$ 、 $^{***}p < 0.0001$ 。

【図12】内因性TIM-1および内因性AXLがDV感染を媒介することを示す図である。A549細胞にDV3-PAH881 (MOI = 10) を感染させた。感染前に、抗TIM-1ポリクローナル抗体および抗AXLポリクローナル抗体の表示の組み合わせと共に細胞をインキュベーションした。24時間後に感染レベルをフローサイトメトリーによって定量し、対照IgGの存在下での感染レベルに対して標準化した。3回の独立した二つ組の実験の平均±SDを示す。

【図13】DV感染に及ぼすTIM-1およびAXLのサイレンシングの効果を示す図である。A549細胞に表示のsiRNAをトランスフェクションし、2日後の感染時にTIM-1およびAXLの発現をフローサイトメトリーによって評価した。細胞にDV2-JAM (MOI = 2) またはHSV-1 (MOI = 0.8) を感染させた。24時間後にフローサイトメトリーによって感染細胞のレベルを定量し、非ターゲティング (siNT) siRNAをトランスフェクションした細胞における感染に対して標準化した。データは、少なくとも3回の独立した実験の平均±SDである。 $^{**}p < 0.001$ 、 $^{***}p <$

10

20

30

40

50

0 . 0 0 0 1。

【図 1 4】異なる濃度の A N X 5 と共に予備インキュベーションした D V - 2 J A M または H S V - 1 を A 5 4 9 細胞に感染させた。2 4 時間後にフローサイトメトリーによって感染細胞のパーセンテージを定量した。データは、少なくとも 3 回の独立した実験の平均 ± S D である。* * p < 0 . 0 0 1、* * * p < 0 . 0 0 0 1。

【図 1 5】D V の直接ホスファチジルセリン - T I M レセプター結合の図式モデルを示す図である。ホスファチジルセリンは T I M レセプターと直接相互作用し、T I M レセプターは結果として自然免疫阻害を招くシグナル伝達カスケードまたはウイルスのインターナリゼーションを強化するエンドサイトーシスエフェクターの動員のいずれかをトリガーする。

【図 1 6】T I M レセプターがフラビウイルス感染を媒介することを示す図である。T I M レセプターは、D V 2 - J A M、ウエストナイルウイルスおよび黄熱ウイルスによって利用される。親 2 9 3 T 細胞および T I M レセプターを発現している 2 9 3 T 細胞に D V 2 - J A M、W N V (Israeli I S _ 9 8 - S T I 株)、黄熱ウイルスワクチン株 (Y F V - 1 7 D) および単純ヘルペスウイルス 1 型 (H S V - 1) を感染させた。2 日後に特異的 A b を使用するフローサイトメトリーによってウイルス感染を定量した。データは、少なくとも 3 回の独立した実験の平均 ± S E M である。

【図 1 7】T Y R O 3 および A X L は、D V および他のフラビウイルスによる感染を強化することを示す図である。親 2 9 3 T および T Y R O 3 発現 2 9 3 T および A X L 発現 2 9 3 T を D V 2 - J a m、W N V、Y F V - 1 7 D および H S V - 1 で攻撃した。2 4 時間後にフローサイトメトリーによって感染を評価した。二つ組の 3 回の独立した実験からの平均 ± S E M としてデータを表す。

【図 1 8】T I M - 1 および T I M - 4 の異所性発現がチクングニヤによる感染を強化することを示す図である。T I M - 1 発現 2 9 3 T 細胞、T I M - 4 発現 2 9 3 T 細胞および親 2 9 3 T 細胞にチクングニヤ (Chick) を感染させた。4 8 時間後に、E 2 エンベロープ糖タンパク質に対するマウスモノクローナル抗体 (3 E 4) を使用するフローサイトメトリーによって感染を定量した。

【図 1 9】T Y R O 3 および A X L の異所性発現がチクングニヤによる感染を強化することを示す図である。T Y R O 発現 2 9 3 T 細胞、A X L 発現 2 9 3 T 細胞および親 2 9 3 T 細胞にチクングニヤ (Chik) を感染させた。4 8 時間後に、E 2 エンベロープ糖タンパク質に対するマウスモノクローナル抗体 (3 E 4) を使用するフローサイトメトリーによって感染を定量した。

【 0 1 3 1 】

実施例

材料および方法

c D N A ライブラリースクリーニング

c D N A スクリーニングについて、アレイ化された全長 c D N A ライブラリー 3 3 からバイオインフォマティクスに基づいて推定上の細胞レセプターをコードする 1 7 2 8 種の遺伝子を選択した。第 1 ラウンドのスクリーニングで、リボフェクタミン L T X を使用して 8 種の c D N A のプール 2 1 6 種を 2 9 3 T 細胞にトランスフェクションした。次に、トランスフェクション後の 2 9 3 T 細胞を D V 2 - J A M 初代株 (M O I = 2) と共に 4 8 時間インキュベーションし、D V p r M タンパク質を認識する 2 H 2 m A b を使用する F A C S によって感染をスコア化した。2 9 3 T 細胞を p r M タンパク質の細胞内染色陽性にした c D N A のプールを、第 2 ラウンドのスクリーニングに入れ、第 2 ラウンドのスクリーニングでは各プールを構成している単一の c D N A を個別に検査した。

【 0 1 3 2 】

ウイルスおよび細胞

限られた細胞継代をされた後、蚊 (Aedes pseudoscutellaris) A P 6 1 細胞単層中で D V - 1 - T V P 株、D V 2 - J A M 株 (Jamaica)、D V 2 - New Guinea C 株、D V 2 - 1 6 8 8 1 株、D V 3 - P A H 8 8 1 株 (Thailand) および D V 4 - 1 0 8 6 株を増殖

10

20

30

40

50

させた。注目すべきは、哺乳動物細胞において産生されたDVは、昆虫細胞起源のウイルスと類似の結果を与えた。ウイルス力価を、C6/36細胞を用いたフローサイトメトリ分析(FACS)によって評価し、FACS感染単位(FIU)として表現した。HEK 293T、A549、VERO、およびHu h7 5.1細胞(贈与:C.Rice, New York, USA)を、10%FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシンを補充したDMEM中で維持した。ヒト初代星状膠細胞および上皮細胞をLONZAから購入し、製造された条件に応じて培養した。

【0133】

上記のように、蚊(*Aedes pseudoscutellaris*) AP61細胞単層中でDV2-JAM (Jamaica) およびWNV (Israeli IS-98-STI株を増殖させた。YFV (YFV D17株)を成長させ、Ver o細胞で力価決定した。HSV-1 (F)を増殖させ、他に記載されたようにVer o細胞で力価決定した(Taddeo et al. 2004)。チクングニヤ(CHIKV-21株)を昆虫細胞C6/36中で成長させた。

【0134】

タンパク質および抗体

N末端G1aドメイン(rmGas6 G1a)、リコンビナントヒトIgG1-Fc、TYRO3-Fc、AXL-Fc、DC-SIGN-Fc、TIM-3-FcおよびNKGD2-Fcを欠如するリコンビナントマウスGas6はR&D systems製であった。抗体は以下の通りであった: マウスモノクローナル(mAb)抗ヒトTIM-1(クローン219211)、抗ヒトTYRO3(クローン96201)、抗ヒトAXL(クローン108724)、IgG2bアイソタイプ(MAB004)、IgG1アイソタイプ(クローン11711)、抗ヒトDC-SIGN PEコンジュゲーション型(クローンクローン120507)、IgG2B PEコンジュゲーション型アイソタイプ(クローン133303)、ヤギポリクローナル(pAb)抗ヒトTIM-1(AF1750)、抗ヒトTIM-4(AF2929)、抗ヒトTyro3(AF859)、抗ヒトAXL(AF154)はR&D systems製であった。マウスモノクローナル抗ヒトホスファチジルセリン(1H6)は、Milliporeから購入した。ポリクローナルウサギ抗ヒトIgG-HRPはDakoCytomation製であり、ロバ抗ヤギIgG-HRPはSanta Cruz biotechnologies製であった。

【0135】

プラスミド構築物

Life TechnologiesおよびOrigeneから購入したcDNAから、それぞれTim-1遺伝子およびTim-4遺伝子のオープンリーディングフレーム(ORF)を増幅した。スクリーニングで特定されたcDNAクローンからTim-3のORFを増幅した。BamHIおよびXhoI制限部位を使用して全てのTIM ORFをpCDNA3.1およびpTRIPベクターにクローニングした。

【0136】

スクリーニングで特定されたcDNAクローンからTyro3遺伝子のORFおよびAx1遺伝子のORFを増幅し、pTRIPベクターにクローニングした。pTRIP-Tyro3を創出するために、ORFを増幅し、部位特異的サイレント突然変異誘発(T1155C)を用いて重複伸長法により内部BamHI部位を同時に除去した。外部プライマー5'CGGGATCCCGC ATG GCG CTG AGG CGG AGC ATGG(配列番号37、開始コドンは太字;制限エンドヌクレアーゼ部位に下線)および内部プライマー5'GTCCTTTTGGGGGTC C C C A G C C T G T C A A A T T G G C(配列番号38、突然変異ヌクレオチドに下線)を用いて第1フラグメントを増幅した。内部プライマー5'GCCAATT T G A C A G G C T G G G A C C C C C A A A A G G A C(配列番号39、突然変異ヌクレオチドに下線)および外部プライマー5'CCGCCTCGAGCGG CTA ACA GCT ACT GTG TGG CAG TAG CCC(配列番号40、終止コドンを太字;制限エンドヌクレアーゼ部位に下線)を用いて第2フラグメントを増幅した。精製後、両方のフラグメントを混合し、最終的

に2種の外部プライマーを用いて全長ORFを増幅した。この生成物をBamHIおよびXhoI消化フラグメントとして、同様に消化されたpTRIPプラスミド内にクローニングした。オリゴ5' CGGGATCCCGC ATG GCG TGG CCG TG C C C C (配列番号41)および5' CCGCCTCGAGCGG TCA GGC ACC ATC CTC CTG C C C (配列番号42)を用いてAxl ORFを増幅した。このフラグメントをBamHI/XhoIフラグメントとして、同様に消化されたpTRIPプラスミド内にクローニングした。Tim-1、Tim-4およびAxlのアラニン置換突然変異体は、Quick Change部位特異的突然変異誘発キット(Agilent)を使用して発生させた。

【0137】

TIM-1、TIM-4、TYRO3およびAXLを過剰発現している安定細胞系の樹立
従来のリン酸カルシウムトランスフェクションプロトコールにより、HIV gag-polをコードするプラスミドを有するpTRIP構築物および水疱性口内炎ウイルスエンベロープG(VSVg)タンパク質をコードするプラスミドを有するpTRIP構築物を293T細胞に同時トランスフェクションすることによってシュードウイルスを発生させた。2日後に上清を回収し、低速遠心分離により透明にし、超遠沈によりシュードパーティクルを濃縮した。ペレットをTNE緩衝液(トリス50mM、NaCl 100mMおよびEDTA 0.5mM)中に再懸濁し、小分けし、-80で保存した。293T細胞(1.5×10^5 個)に所望のORFを保持するシュードウイルスをトランスダクションした。TIM-1、TIM-4、TYRO3およびAXLの高い細胞表面発現を有する細胞集団を、FACSDiva 6.1.2ソフトウェア(Becton Dickinson)を備えるBD FACSAria II(Becton Dickinson)でソーティングした。

【0138】

TIM-FcおよびrGas6の産生

ヒトIgG1 FcとTIM-1との融合タンパク質およびTIM-4との融合タンパク質を以下のように発生させた。TIM-1エクストドメイン(残基21~290番)を、5' ATCGGAG AGATATCT GTA AAG GTT GGT GGA GAG GCA GGT CC (配列番号43)プライマーおよび3' TCTGGAG AGATCT TCC TTT AGT GGT ATT GGC CGT CAG (配列番号44)プライマーを用いて増幅した。TIM-4エクストドメイン(残基25~314番)を5' ATCGGAG AGATATCA GAG ACT GTT GTG ACG GAG GTT TTG GG (配列番号45)プライマーおよび3' TCTGGAG AGATCT TTG GGA GAT GGG CAT TTC ATT CTT C (配列番号46)プライマーを用いて増幅した。EcoRVおよびBglII制限部位(最初および最後のTIMコドンは太字;制限エンドヌクレアーゼ部位に下線)を使用して両方のPCR産物をpFUSE-hIgG1-Fc2(Invivogen)にクローニングした。TIM-1-FcおよびTIM-4-Fc融合体発現ベクターを、10%FBSを補充したイソコフ改変ダルベッコ培地中の293T細胞にトランスフェクションし、トランスフェクション後はOPTIPRO-SFM(Life Technologies)中で培養した。両方の培地にP/SおよびL-グルタミンを補充した。トランスフェクションの4日後に、上清を回収し、遠心分離によって透明にし、Amicon 50K MWCO(Millipore)により濃縮した。TIM-FcをプロテインAカラムで精製し、30K MWCO PESフィルターユニット(Pierce)を通過させて濃縮/脱塩した。リン酸緩衝塩類溶液(PBS)(0.02%NaN₃を補充)中にタンパク質を保存し、続いて-80で小分けした。280nmの吸光度を利用してタンパク質を定量し、SDS-PAGE条件で泳動した試料をクマシーブルー染色(R250)して還元条件でそれらの純度を評価した。

【0139】

哺乳動物発現ベクターを、全長マウスGas6に続いてC末端にTEVで切断可能なHis₆タグをコードするように操作した。この構築物を293T細胞にトランスフェクションし、10%FBS、0.25mg/mL G418、および100μg/mLヒグロマイシンを

10

20

30

40

50

補充したダルベッコ改変イーグル培地中で、構築物を安定的に発現している細胞を選択した。発現研究のために、 $10 \mu\text{M}$ ビタミン K₂ を補充した無血清培地中で細胞を成長させ、72 時間後に馴化培地を回収した。Ni-NTA ビーズを用いたアフィニティークロマトグラフィーに続く Hi Trap Q Fast Flow イオン交換カラムを用いた追加的な精製を利用して、分泌された Gas6 を単離した。 $0 \sim 1 \text{ M}$ の NaCl 勾配をかけて 20 mM トリス (pH 8) 中にタンパク質を溶出し、続いて小分けし、液体 N₂ 中で急速冷凍した。

【0140】

ELISA 結合

TIM-Fc と DV との間の直接相互作用を検出するために、最初に、 10 mM CaCl₂ を補充したトリス緩衝塩類溶液 (TBS) 中の Fc 融合タンパク質を、96 ウェルMaxisorp NUNC-IMMUNO プレート (NUNC) 上に 4 で一晚被覆した (二つ組、 400 ng /ウェル)。ウェルを TBS (10 mM CaCl₂ を補充) で洗浄し、37 の TBS (10 mM CaCl₂ および 2% BSA を補充) で 2 時間飽和させた。TBS (10 mM CaCl₂ および 0.05% Tween を補充) で徹底的に洗浄した後、DV 粒子 (5×10^6 FACS 感染単位 (FIU) /ウェル) を添加し、4 で 2 時間インキュベーションした。結合した粒子は、ビオチン化 4G2 抗体 ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) およびホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) コンジュゲーション型ストレプトアビジン (R&D systems) を用いて検出した。

【0141】

Gas6 架橋実験のために、二つ組で DV 粒子 (10^7 FIU) を 4 で一晚被覆した。37 の PBS (CaCl₂ / MgCl₂ を補充) に入れた 2% BSA で 1 時間ブロッキング後、TBS (10 mM CaCl₂ および 0.05% Tween を補充) に入れた rGas6 タンパク質 ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) および Fc-キメラタンパク質 ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) と共にウェルを 37 で 1 時間インキュベーションした。ウェルを徹底的に洗浄し、結合している Fc-キメラを HRP コンジュゲーション型ウサギ抗ヒト IgG 抗体で検出した。Gas6 結合実験のために、二つ組で DV 粒子 (10^7 FIU) または PtdSer (ウシ脳由来 3-sn-ホスファチジル-L-セリン) を一晚被覆した。rGas6 タンパク質 ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) と共にウェルをインキュベーションし、徹底的に洗浄した。結合している Gas6 タンパク質をヤギ抗 Gas6 ポリクローナル抗体でラベルし、HRP コンジュゲーション型ロバ抗ヤギ IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) で検出した。

【0142】

PBS (BSA 2% を補充) に入れた抗 PtdSer 1H6 mAb ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) および HRP コンジュゲーション型ウサギ抗マウス IgG 抗体を使用して、被覆された DV 粒子 (10^7 FIU) 上の PtdSer を検出した。

【0143】

ウイルスのブルダウン

TBS (10 mM CaCl₂ を補充) に入れた Fc-キメラタンパク質 $2 \mu\text{g}$ と共に DV 粒子 (10^7 FIU) を 4 で一晚インキュベーションした。BSA 飽和プロテイン G セファロースビーズ (GE Healthcare) を添加し、4 で 4 時間インキュベーションした。ビーズを TBS (10 mM CaCl₂ および 0.05% Tween を補充) で 4 回洗浄し、結合している物質を非還元条件の $1 \times$ Laemmli 緩衝液中で分離した。ニトロセルロース結合型 E エンベロップ糖タンパク質を、4G2 mAb および HRP コンジュゲーション型ウサギ抗マウス IgG 抗体 (Sigma-Aldrich) を用いて検出した。

【0144】

細胞結合アッセイ

TIM-1、TIM-4、TYRO3、AXL または DC-SIGN を発現している 293T 細胞 (4×10^5 個) を、 2% BSA または 5% FBS のいずれかを含有する結合緩衝液 (DMEM、 0.05% NaN₃) 中で表示の MOI の DV と共に 4 で 90 分間インキュベーションした。細胞をヘパリン 100 U と共に室温で 30 分間インキュベーションし、その後ウイルスと共にインキュベーションした。細胞を冷結合緩衝液で 2 回、無

血清冷DMEMで1回洗浄し、4のPBS-PFA 2%中で20分間固定した。細胞表面に吸収されたDV粒子を抗汎フラビウイルスエンベロップ4G2抗体(5 µg/ml)で染色し、フローサイトメトリーにより分析した。架橋アッセイのために、細胞をウイルスおよびrGas6(10 µg/ml)と共に同時にインキュベーションした。

【0145】

フローサイトメトリー分析

冷PBS中の0.02%NaN₃および5%FBSの存在下で、以下の従来プロトコールによってフローサイトメトリー分析を行った。感染アッセイのために、感染細胞を2%(v/v)パラホルムアルデヒド(PFA)加PBSで固定し、0.5%(w/v)サポニンで透過処理し、続いてDV prMを検出するマウス2H2 mAb(2 µg/ml)または非構造タンパク質-1を検出するマウスNS1 mAb(1 µg/ml)を用いて染色した。抗ICP4マウスmAb(クローン10F1、0.3 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology)を用いてHSV-1感染を検出した。WNV、YFVおよびチクングニヤ感染は、抗タンパク質E抗体(4G2)およびE2エンベロップ糖タンパク質に対するマウスモノクローナル抗体(3E4)で検出した。45分後に、一次抗体をポリクローナルヤギ抗マウス免疫グロブリン/RPE(DakoCytomation)でラベルした。最後に、感染細胞のパーセンテージを、CellQuestソフトウェアを備えるLSR(Becton Dickinson)を用いるフローサイトメトリーによって評価した。FlowJoソフトウェア(Tree Star)を使用することによってデータを解析した。

10

【0146】

免疫蛍光アッセイ

Lab-Tek II-CC²チャンバースライド(Nunc, Roskilde, Denmark)上で細胞を培養し、表示量のDV2-JAMと共に24または48時間インキュベーションした。インキュベーション後に、PBS-PFA 4%(v/v)で細胞を固定し、PBS中の0.05%(w/v)サポニンで透過処理し、PBS(0.1Mグリシンを補充)中で10分間インキュベーションし、続いてブロッキング緩衝液と共にインキュベーションしてから、DV prMタンパク質(2H2、5 µg/ml)の免疫染色を行った。核染色のために4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)を含有するMoviol(Life Technologies)でスライドをマウントした。

20

【0147】

感染阻害アッセイ

阻害実験のために、24ウェルプレート上に成長した細胞を、表示量の抗TIM抗体および/または抗TAM抗体を含有する培地と共に30分間インキュベーションしてから、感染させた。同一濃度の正常ヤギIgGをそれぞれの疑似対照として使用した。阻害剤の存在下でDVまたはHSVと共に3時間インキュベーション後に、培地を交換し、細胞を培地と共にインキュベーションした。感染を上記のようにFACSによって定量した。

30

【0148】

RNA干渉

リポフェクタミンRNAiMaxプロトコール(Life Technologies)を使用してA549細胞および初代星状膠細胞に終濃度10nMのsiRNAを一過性トランスフェクションした。48時間後、細胞を表示のMOIで感染させ、感染の24時間後にフローサイトメトリーによって感染細胞のパーセンテージを定量した。本研究に使用したsiRNAのプール(ON-TARGETplus SMARTpool)はDharmacon製であった: TIM-1(L019856-00)、AXL(L-003104-00)。非ターゲティング陰性対照(NT)を対照として使用した。

40

【0149】

統計解析

グラフ表示および統計解析はPrism5ソフトウェア(GraphPad Software)を使用して行った。特に述べない限り、結果は3回の独立した実験の平均±標準偏差(SD)として示す。対応のある両側t検定を用いて差の統計的有意性について検定した。

50

【 0 1 5 0 】

結果および考察

新しいDV侵入因子を特定するために、初代蚊由来DV2-JAM株に低感受性の293T細胞を感受性にする能力について1728種の細胞膜タンパク質をスクリーニングした。この選別からL-SIGNが特定され、このアプローチの妥当性が確認されたが、新規な潜在的DVレセプターとして、T細胞免疫グロブリンドメイン・ムチンドメイン(TIM)-3、TYRO3およびAXLも特定された。これらは、アポトーシス細胞の貪食を促進する「私を食べて」シグナルであるホスファチジルセリン(PtdSer)と直接(TIM)または間接(TAM)的に結合する二つの別個のファミリーの膜貫通レセプターに属する。次に、DV感染時のこれらのレセプターおよびPtdSerの役割を特徴づけた。

10

【 0 1 5 1 】

TIM-1およびTIM-4に加えてTIM-3は、おそらく死細胞の浄化により免疫寛容をモデレーションする。そのうえ、A型肝炎ウイルスおよびフィロウイルスはレセプターとしてTIM-1を利用する。TIMレセプターがDV感染を強化するかどうかを検討するために、TIM-1、TIM-4またはTIM-3を安定発現している293T細胞を発生させ、DV2-JAMで攻撃した。TIM分子を発現していない親細胞は、ウイルスに最低限に感染した(図1)。TIM-3の発現は、感染細胞のパーセンテージの中程度の増加を招いた(図1)。著しくは、TIM-1またはTIM-4の発現は感染を最大500倍に増強した(図1)。注目すべきは、感染が、新たに合成されたNS1タンパク質を測定することによって評価されたことであり、これは、TIMが増殖性DV感染を媒介することを示している。別のPtdSerレセプターであるBAL1を発現している細胞ではDV感染の強化が起こらなかった。TIM-1またはTIM-4は、また、3種の他のDV血清型による効率的な感染を媒介した(図2)。実験室適応DV2-New Guinea C株(NGC)および16681株は親293T細胞に感染したが、これは、一部の単離株が他のレセプター(1種または複数)を利用しうること示唆している(図3)。しかし、DV2-NGCまたは16681の感染もTIM-1またはTIM-4によって強く強化された(図3)。まとめると、これらのデータは、PtdSerレセプターであるTIM-1およびTIM-4、ならびにより低い程度にTIM-3が、DV感染を促進する新しい細胞因子であることを示している。

20

30

【 0 1 5 2 】

DVビリオンがTIMタンパク質に結合するかどうかを、可溶性TIM-Fc(免疫グロブリンFcと融合したTIM細胞外領域)を用いたプルダウンアッセイを行うことによって検討した。DV-2粒子をTIM-1-FcもしくはTIM-4-Fcと共に、または陽性対照としてのDC-SIGN-Fcと共にインキュベーションした。沈殿したウイルスをウェスタンブロットにより分析した。DVは、NKGD-FcまたはIgG1-Fc陰性対照構築物ではなくTIM-1、TIM-4およびDC-SIGN構築物に結合した(図4)。これは、TIM-1-Fc被覆ウェルを使用するELISAによって確認された(図5)。そのうえDVは、対照細胞ではなく、293T-TIM-1細胞および293T-TIM-4細胞に効率的に付着した。まとめると、これらの結果は、TIM-1およびTIM-4がDVと結合し、ターゲット細胞へのウイルス付着を媒介することを示している。

40

【 0 1 5 3 】

TIM-1およびTIM-4は、アポトーシス細胞体上のPtdSerを認識する。さらに、TIMが媒介するDV感染がPtdSerに依存するかどうかを検討した。抗PtdSerモノクローナルAb(mAb)は、DV被覆ELISAプレートに用量依存的に結合したが、そのアイソタイプ対照は結合せず(図6)、これは、PtdSerがDV粒子と結合することを示している。次に、文書により十分に立証されたPtdSer結合タンパク質であるアネキシンV(ANX5)と共にDV-2を予備インキュベーションした。ANX5は293T-TIM-1細胞および293T-TIM-4細胞の感染を阻害し

50

たが、293T-DCSIGN細胞の感染は阻害しなかった(図7)。TIMの構造研究から、Pt d Serが金属イオン依存性リガンド結合部位(MILIBS)と呼ばれる空洞と結合することが示された。この空洞の突然変異体(TIM-1 N114AまたはD115A、TIM-4 N121A)を設計したが、これらの突然変異体は、たとえ細胞表面に正しく発現されても、もはやDV-2感染を媒介しなかった(図8)。したがって、Pt d Ser分子はDVビリオンと結合し、TIM媒介DV感染に必要とされる。TYRO3およびAXLは、アポトーシス細胞の浄化に不可欠な3種のレセプター型タンパク質チロシンキナーゼの1群であるTAMファミリーに属する。TAMリガンドであるGas6およびProSは、この過程に主要な役割を果たす。それらのN末端Gladメインを介して、それらはアポトーシス細胞上に発現されているPt d Serを認識し、これらの細胞を食細胞表面のTAMレセプターに架橋する。TAMレセプターはエボラウイルスおよびラッサウイルスによる感染を促進することが示されており、Gas6は、AXLにウイルス膜Pt d Serを架橋することによりレンチウイルスベクターまたはワクシニアウイルスによる感染を強化することが見いだされた。

【0154】

次に、TIMおよびTAMを自然に発現している細胞における、これらのレセプターそれぞれの役割を研究した。DV感受性細胞系のパネルから、4種の分子(TIM-1、TIM-3、TYRO3、AXL)の少なくとも1種を検出した。Hu h 7 5.1細胞系はTIM-1のみを発現する。抗TIM-1 Abは、DV2感染を阻害したが、単純ヘルペスウイルス(HSV-1)感染は阻害しなかった(図9)。A549細胞系はTIM-1およびAXLの両方を発現する。DV2感染は、単独で投与された抗TIM-1 Abまたは抗AXL Abで部分的に減少した一方、2種のAbの組み合わせは、DV2感染(図10および11)およびDV3感染(図12)を完全に阻害したが、HSV-1感染を阻害しなかった。TIM-1およびAXLを発現するVer o細胞で類似の結果が得られた。次に、A549細胞におけるRNA干渉によってTIM-1またはAXLをサイレンシングした(図13)。DV感染は、AXLサイレンシング細胞で減少し、TIM-1サイレンシング細胞ではほぼ完全に阻害された。特に、TIMをトランスフェクションされた293T細胞およびTAMをトランスフェクションされた293T細胞と同様に、ANX5はA549細胞のDV感染を遮断した(図14)。全体的に見て、これらの結果は、TIMレセプターおよびTAMレセプターが自然に協同してDV感染を促進すること、およびPt d Serがレセプターを内因性発現している細胞において感染を媒介していることを示している。

【0155】

上皮細胞および星状膠細胞は、DVのin vivoターゲットである。初代腎臓上皮細胞および星状膠細胞はAXLを発現するが、TYRO3、TIM-1またはTIM-4を発現しない。両方の細胞型においてDV感染は抗AXL Abによって顕著に減少した。星状膠細胞でのAXLをサイレンシングしても、DV2-JAM感染は顕著に低下した。したがって、AXLについて実証されたように、本発明者らのスクリーニングにおいて特定されたPt d Serレセプターは、ヒト初代細胞の感染に関与しており、これは、DVの病理発生に関連する知見のはずである。

【0156】

本報告は、ターゲット細胞へのDV結合およびDV感染を媒介する新規な細胞因子として、Pt d SerのTIMレセプターおよびTAMレセプターを特定している(図15)。Pt d Serは、食細胞によるアポトーシス細胞の認識および浄化のための「私を食べて」シグナルである。したがってDVは、細胞に感染するために「アポトーシス擬態」戦略を利用する。DVは、少なくとも4種の異なるPt d Serレセプターを単独または組み合わせで利用することによって、複数の細胞型に接近する可能性があるが、これは、DV感染患者に観察される広いウイルス親和性に一致している。

【0157】

DV膜は、内腔側にPt d Serを含有するER内に出芽することによって得られ、こ

10

20

30

40

50

れは、P t d S e r がビリオンに組み入れられるようになる明らかなメカニズムを示唆している。しかし、構造研究から、成熟粒子において膜は簡単には露出しておらず、E タンパク質によって形成される保護性 20 面体シェルの下に隠れているであろうと示されている。A b 複合体を用いた研究によって最近示唆されたように、T I M 分子および T A M 分子または他のレセプターは E タンパク質と弱い相互作用を示す可能性があり、その相互作用が 20 面体シェルの開口をトリガーし、ウイルス膜の露出につながるというのが妥当と思われる。また、最近の報告は、この糖タンパク質シェルに重要な度合いの不均一性があり、未熟表面と成熟表面の混じり合いを呈することを示している。未熟様領域が膜パッチを露出することにより、P t d S e r が到達可能になり、T I M レセプターおよび T A M レセプターと相互作用する可能性がある。

10

【 0 1 5 8 】

T I M レセプターおよび T A M レセプターが他のウイルス種による感染を媒介するかどうかを判定するために、T I M - 1 発現細胞および T I M - 4 発現細胞を D V 2 - J a m、ウエストナイルウイルス (W N V)、黄熱ウイルスワクチン株 (Y F V - 1 7 D)、および単純ヘルペスウイルス 1 (H S V - 1) で攻撃した。ウイルス感染は特異的抗体を用いるフローサイトメトリーによって定量した (図 1 6)。データは、T I M - 1 および T I M - 4 が W N V 感染を大きく強化し、Y F V - 1 7 D への感受性をわずかにアップレギュレーションしたが、H S V - 1 には効果をもたなかったことを示している。T Y R O 3 発現細胞および A X L 発現細胞について類似の結果が得られた (図 1 7)。まとめると、これらのデータは、P t d S e r レセプター T I M および T A M が、両方ともフラビウイルス感染を促進する細胞因子であることを示している。

20

【 0 1 5 9 】

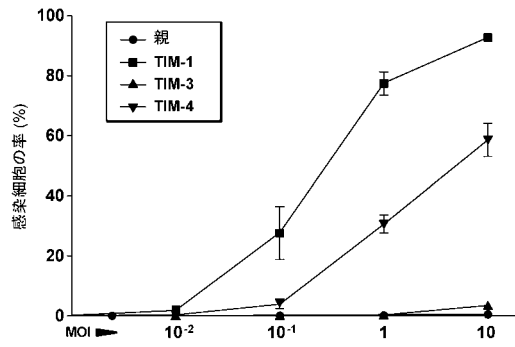
さらに、このメカニズムが、膜に P t d S e r を発現または組み込んでいるウイルスによって活用される一般メカニズムを表すかどうかに関心をもたれた。親 2 9 3 T 細胞、T I M - 1 発現 2 9 3 T 細胞および T I M - 4 発現 2 9 3 T 細胞にチクングニヤ (Chick) を感染させた。48 時間後に、E 2 エンベロープ糖タンパク質に対するマウスモノクローナル抗体 (3 E 4) を使用するフローサイトメトリーによって感染を定量した。結果 (図 1 8) は、T I M - 1 および T I M - 4 がチクングニヤ感染を大きく強化することを示している。T Y R O 3 発現細胞および A X L 発現細胞について類似の結果が得られた。それらの異所性発現は同様にチクングニヤ感染を強化する (図 1 9)。

30

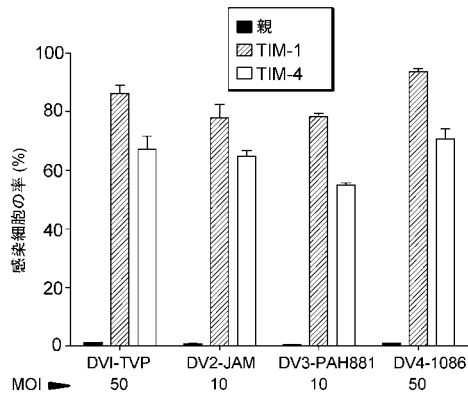
【 0 1 6 0 】

これらのデータは、T I M および T A M のウイルス感染促進が、最適な感染のために膜に P t d S e r を発現または組み込んでいるウイルスによって活用される一般メカニズムを表すことを示している。

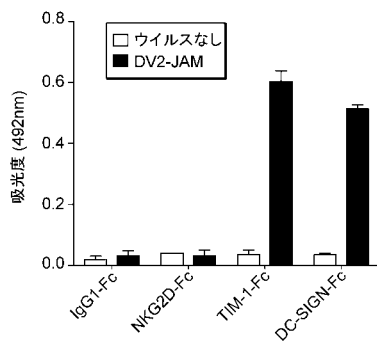
【図 1】



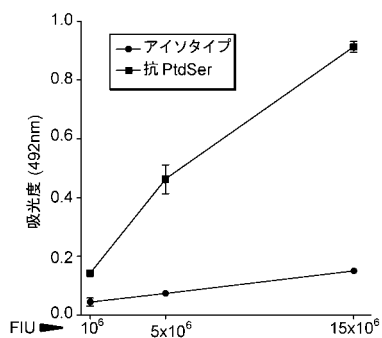
【図 2】



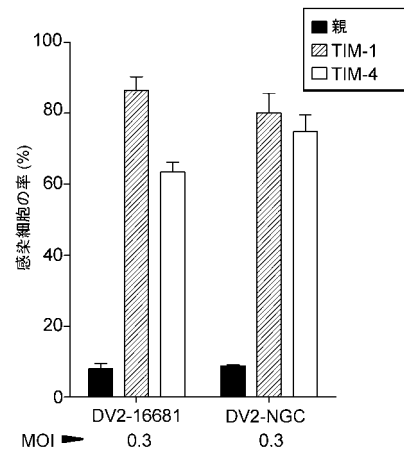
【図 5】



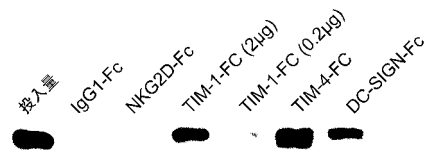
【図 6】



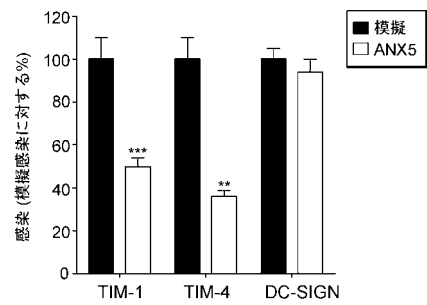
【図 3】



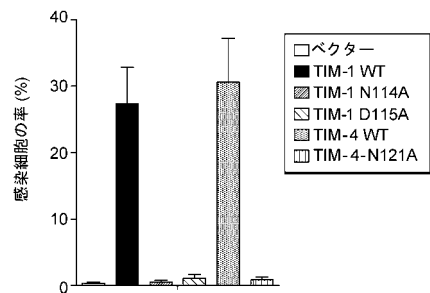
【図 4】



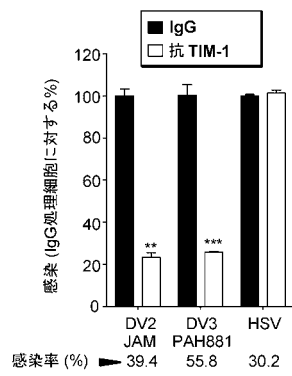
【図 7】



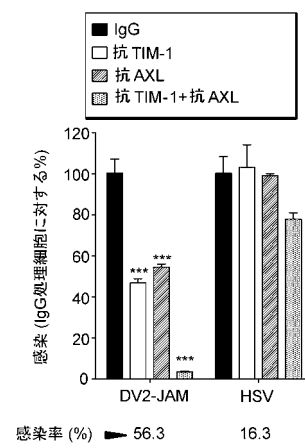
【図 8】



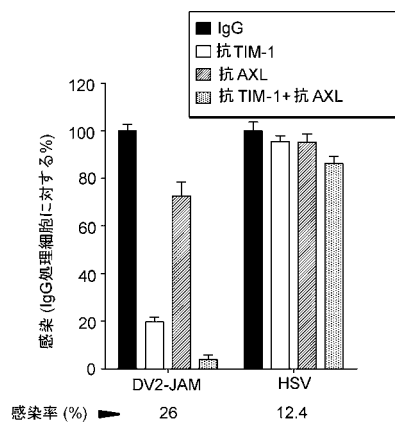
【図 9】



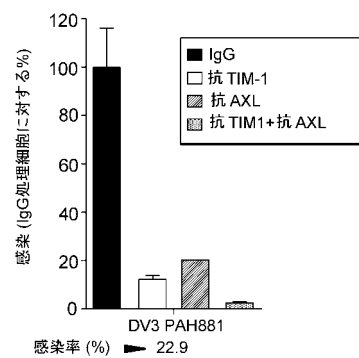
【図 10】



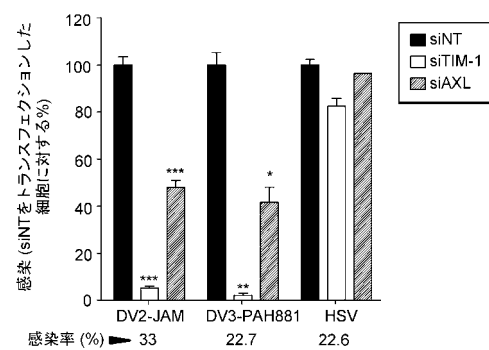
【図 11】



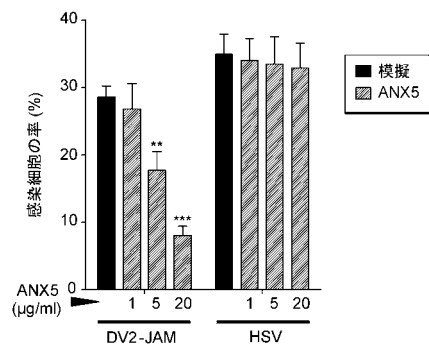
【図 12】



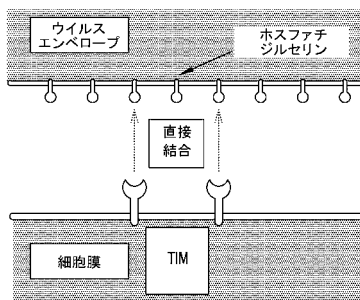
【図 13】



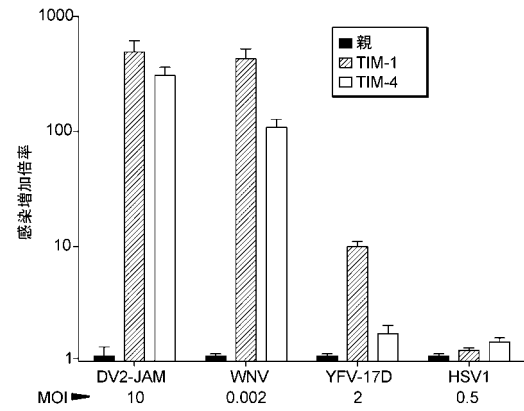
【図 14】



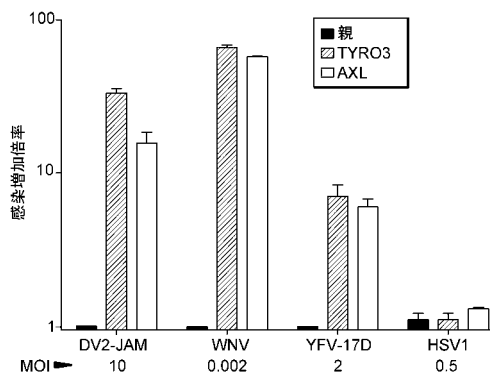
【図 15】



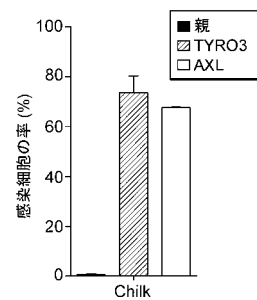
【図 16】



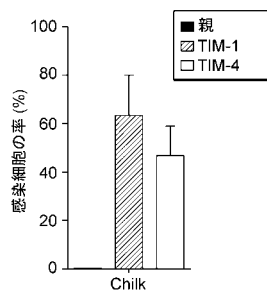
【図 17】



【図 19】



【図 18】



【配列表】

2015513535000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP2013/053391
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)	
<p>1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:</p> <p style="margin-left: 20px;">a. (means)</p> <div style="margin-left: 40px;"><input type="checkbox"/> on paper <input checked="" type="checkbox"/> in electronic form</div> <p style="margin-left: 20px;">b. (time)</p> <div style="margin-left: 40px;"><input checked="" type="checkbox"/> in the international application as filed <input type="checkbox"/> together with the international application in electronic form <input type="checkbox"/> subsequently to this Authority for the purpose of search</div> <p>2. <input type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.</p> <p>3. Additional comments:</p>		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/053391

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C07K16/28 C12N15/113 ADD. A61P31/14		
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) C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/159877 A2 (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL [US]; KUCHROO VIJAY K [US]; ANDERSON ANA C []) 22 December 2011 (2011-12-22) page 18, paragraph 72 page 56, paragraph 211 page 57, paragraph 217 -----	1-3,7,9,13
X	SOARES M MELINA ET AL: "Targeting inside-out phosphatidylserine as a therapeutic strategy for viral diseases.", NATURE MEDICINE DEC 2008, vol. 14, no. 12, December 2008 (2008-12), pages 1357-1362, XP002694195, ISSN: 1546-170X the whole document ----- -/--	1,4,6,10,13,14,17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
20 March 2013		10/04/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Domingues, Helena

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/053391

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	MEERTENS LAURENT ET AL: "The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry.", CELL HOST & MICROBE 18 OCT 2012, vol. 12, no. 4, 18 October 2012 (2012-10-18), pages 544-557, XP002694196, ISSN: 1934-6069 the whole document -----	1-7,9-18
A	KONDRATOWICZ ANDREW S ET AL: "T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for Zaire Ebolavirus and Lake Victoria Marburgvirus", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 108, no. 20, May 2011 (2011-05), pages 8426-8431, XP002679332, ISSN: 0027-8424 the whole document -----	1-18
A	FREEMAN GORDON J ET AL: "TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity.", IMMUNOLOGICAL REVIEWS MAY 2010, vol. 235, no. 1, May 2010 (2010-05), pages 172-189, XP002694197, ISSN: 1600-065X the whole document -----	1-18
A	TASSANEETRITHEP BOONRAT ET AL: "DC - SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, US, vol. 197, no. 7, 7 April 2003 (2003-04-07), pages 823-829, XP002272514, ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1084/JEM.20021840 the whole document -----	1-18
A	CABRERA-HERNANDEZ A ET AL: "MAMMALIAN DENGUE VIRUS RECEPTORS", DENGUE BULLETIN, WHO REGIONAL OFFICE FOR SOUTH-EAST ASIA, NEW DELHI, IN, vol. 29, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 119-135, XP001536276, ISSN: 1020-895X pages 121-123 -----	1-18

Information on patient family members

PCT/EP2013/053391

WO 2011159877	A2	22-12-2011	CA	2802344	A1	22-12-2011
			WO	2011159877	A2	22-12-2011

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	A 6 1 K 31/713	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	G
	C 0 7 K 14/47	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,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,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,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,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,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(71)出願人 508266546
ユニベルシテ パリ ディドロ - パリ 7
UNIVERSITE PARIS DIDEROT - PARIS 7
フランス国 エフ - 7 5 2 0 5 パリ セデックス 13 リュ トマ マン 5
5 , rue Thomas Mann F - 7 5 2 0 5 Paris Cedex 13 F R
A N C E

(74)代理人 110001508
特許業務法人 津国

(74)代理人 100078662
弁理士 津国 肇

(74)代理人 100116528
弁理士 三宅 俊男

(74)代理人 100146031
弁理士 柴田 明夫

(74)代理人 100122736
弁理士 小國 泰弘

(74)代理人 100122747
弁理士 田中 洋子

(74)代理人 100132540
弁理士 生川 芳徳

(72)発明者 アマラ , アリ
フランス国、エフ - 7 5 0 1 0 パリ、アヴニュー・ヴェルフォー 1、オピタル・サン・ルイ、
ユ 9 4 4

(72)発明者 メルテン , ローラン
フランス国、エフ - 7 5 0 1 0 パリ、リュ・ドウ・ラ・グランジュ・オー・ベル 16、オピタル・
サン・ルイ、アンセルム・ユ 9 4 4 / セエヌエールエス 7 2 1 2

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA04 CA11 CA20 EA04 GA11 HA17
4C084 AA02 AA13 AA19 BA35 BA44 MA02 NA05 NA14 ZB331 ZB332
ZC411 ZC412
4C085 AA13 AA14 BA51 CC23 EE03
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 NA14 ZB33 ZC41 ZC75
4H045 AA30 BA10 CA40 EA20 FA74