

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成24年7月19日 (2012.7.19)

【公表番号】特表2011-522561(P2011-522561A)

【公表日】平成23年8月4日 (2011.8.4)

【年通号数】公開・登録公報2011-031

【出願番号】特願2011-513436(P2011-513436)

【国際特許分類】

C 1 2 N 7/00 (2006.01)

C 0 7 K 7/06 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

A 6 1 P 31/16 (2006.01)

A 6 1 K 35/76 (2006.01)

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/12 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 7/00 Z N A

C 0 7 K 7/06

C 1 2 N 15/00 A

A 6 1 P 31/16

A 6 1 K 35/76

A 6 1 K 37/02

A 6 1 K 39/12

【手続補正書】

【提出日】平成24年6月1日 (2012.6.1)

【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】

トリインフルエンザウイルス (A I V) に結合し、ウイルスの増殖を阻害する融合ペプチドを保有する、単離され、精製された組換えファージ。

【請求項 2】

融合ペプチドが アミノ酸配列 N D F R S K T (配列番号 2) 又はそれと少なくとも 6 0 % のホモロジーを有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の組換えファージ。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載した融合ペプチドに由来するアミノ酸配列を含む合成ペプチド。

【請求項 4】

ウイルスに結合することによって A I V の増殖を阻害する、請求項 3 に記載の合成ペプチド。

【請求項 5】

前記ペプチドが配列 C N D F R S K T C (配列番号 1) を有する、請求項 3 に記載の合成ペプチド。

【請求項 6】

前記ペプチドが 1 0 0 μ M 未満の $I C_{50}$ 値を有する、請求項 3 に記載の合成ペプチド。

【請求項 7】

請求項 1 及び 2 のいずれか一項に記載の組換えファージを含む薬剤組成物。

【請求項 8】

請求項 3 から 6 までのいずれか一項に記載の合成ペプチドを含む薬剤組成物。

【請求項 9】

請求項 1 及び 2 のいずれか一項に記載の組換えファージを含む診断用試薬。

【請求項 10】

請求項 3 から 6 までのいずれか一項に記載の合成ペプチドを含む診断用試薬。

【請求項 11】

請求項 1 及び 2 のいずれか一項に記載の組換えファージを含むワクチン。

【請求項 12】

請求項 3 から 6 までのいずれか一項に記載の合成ペプチドを含むワクチン。

【請求項 13】

トリインフルエンザウイルス H 9 N 2 表面糖タンパク質 H A 及び N A に結合する、請求項 3 から 6 までのいずれか一項に記載の合成ペプチド。

【請求項 14】

トリインフルエンザの治療又は診断の方法における使用のための、請求項 1 または 2 に記載の組換えファージあるいは請求項 3 から 6 までのいずれか一項に記載の合成ペプチド

。

【請求項 15】

トリインフルエンザの治療用薬剤の製造における、請求項 1 または 2 に記載の組換えファージあるいは請求項 3 から 6 までのいずれか一項に記載の合成ペプチドの使用。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0001

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0001】

本発明は、トリインフルエンザウイルス (A I V) サブタイプ H 9 N 2 に対して作用する、新規な抗ウイルスペプチド及び融合ファージに関する。より詳しくは、融合ファージは、A I V H 9 N 2 に結合するその表面タンパク質 P 3 上に配列 C N D F R S K T C (配列番号 1) をディスプレイし、 IC_{50} 値は $10^{1.3}$ p f u / 100 μ l 未満である。直鎖状又は環状の立体配座のいずれかにおけるアミノ酸配列 C N D F R S K T C (配列番号 1) を有する合成ペプチドは、約 100 μ M 未満の IC_{50} 値で A I V H 9 N 2 の増殖を阻害した。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0010】

新規な抗ウイルス分子を同定するために、ジスルフィド拘束ランダムヘプタペプチド配列をディスプレイする組換えファージの集団を、ウイルスに対してスクリーニングした。次いで、融合ファージの表面上にディスプレイされたペプチドを、化学的に合成した。この単離されたペプチドは N D F R S K T (配列番号 2) の配列を有し、 IC_{50} 値は 100 μ M 未満である。インフルエンザウイルス A H 9 N 2 に対する組換えファージの特異性は、抗体 - ファージ競合アッセイによって証明され、このアッセイにおいてファージは、ウイルス表面タンパク質上の結合部位に対してポリクローナル抗体と競合することが可能であった。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0011】

本発明において、単離された配列の1つをベースにした合成ペプチドは、直鎖状又は環状の立体配置のいずれかにおいて「例えば合成ペプチドCNDFRSKTC（配列番号1）」など、NDVの増殖を阻害することができ、それによって疾患及び感染の伝播を防ぐ。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0023

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0023】

高親和性の結合ファージを選択するために、選択のストリンジェンシーを、(i)室温(28)でバイオパニングを行い、(ii)速度に対して速いリガンドを選択するために結合の時間を1時間に短縮し(K₀)、(iii)ウエルを徹底的に洗浄して(10回)低親和性の結合ファージを除去し、(iv)バイオパニングを4ラウンド繰り返して高親和性結合クローンを濃縮することによって増大させた。第4ラウンドのパニングから分析されたファージの47%は、融合ペプチド配列NDFRSKT（配列番号2）を保有しており、10.5%がQHSTKWF（配列番号3）モチーフを含んでおり、その後に各5%のLPYAAKH（配列番号4）及びILGDKVG（配列番号5）、並びに他の非関連の配列が続く（表1）。ストレプトアビジン標的を、クローン全てにおいてHPQ配列のコンセンサスモチーフを与える陽性対照として用いたが、これはDevlinら（1990年）によって報告されたものと良好に一致した。陰性対照として用いられたウシ血清アルブミン（BSA）では、認識できるコンセンサス配列は観察されなかった。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0024】

本明細書で用いられる「融合ペプチド」の語は、一般的にバクテリオファージによってコードされ、ファージのコートタンパク質に物理的に連結しているアミノ酸配列を意味する。特許請求の融合ペプチドは、アミノ酸配列NDFRSKT（配列番号2）：(i)特許請求のアミノ酸配列よりも短く、又は長いアミノ酸配列、(ii)アミノ酸配列における変形、とりわけ以下に記載するのと同じカテゴリー内のアミノ酸の置換、(iii)特許請求の融合ペプチドのアミノ酸配列と少なくとも60%のホモロジーを共有するアミノ酸配列、及び(iv)直鎖状又は限定立体配置のいずれかを含んでいるが、これらに限定されない。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0025

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0025】

AIVは2種の表面糖タンパク質HA及びNAを所有し、これらはウイルスの脂質二重層膜から突出している。これらの糖タンパク質はそれぞれ宿主細胞内及び宿主細胞外へのウイルスの侵入及びウイルスの放出に不可欠である。配列NDFRSKT（配列番号2）

を保有するファージは溶液中のビリオンに結合するので、これらの配列は、ある程度、完全なビリオンと相互作用する宿主細胞の受容体上の領域に類似することがある。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0026

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0026】

ファージは A I V 上の結合部位に対して抗体と競合する

表面糖タンパク質 H A 及び N A は、宿主における抗体の生成を誘発する 2 つの重要なタンパク質である。ファージ - 抗体競合アッセイにおいて、ファージはミモトープの 1 つに結合することができ、したがってビリオンに対して産生された抗体の結合を阻害することができた。図 1 は、バイオパニング実験から選択された、ペプチド N D F R S K T (配列番号 2) をディスプレイする組換えファージが、A I V 上の結合部位に対して抗体と競合できたことを示している。抗体の存在下、ウイルスでコーティングされたウエルに結合したファージの数は、ウイルス上の同じ結合部位に対するこれら 2 つの分子間の競合の結果として劇的に低下した。したがって、組換えファージ分子は、A I V 感染に対する潜在的な診断薬として働き得る。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0038

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0038】

【表 1】

表1

パニングのラウンド	ヘプタペプチド配列	配列番号	配列の頻度 (%)
第 2 ラウンド	非関連の配列	—	100
第 3 ラウンド	LPYAAKH / LPYGSKH	4/6	25
	ILGYKVG	7	17
	非関連の配列	—	58
第 4 ラウンド	NDFRSKT	2	47
	QHSTKWF	3	10.5
	LPYAAKH	4	5
	ILGDKVG	5	5
	非関連の配列	—	23
第 3 ラウンド	HPQFLSL	8	55
ストレプトアビジン	GLYNHPQ	9	27
	非関連の配列	—	18

【表 2】

表 2

ペプチド濃度 (mM; 50 μ l) ／ファージ粒子	RBCの凝集 (+ AIV 32 HAU; 50 μ l)	RBCの凝集 (- AIV 32 HAU; 50 μ l)
環状 1.0	なし	なし
環状 0.1	なし	なし
環状 0.01	あり	なし
環状 0	あり	なし
直鎖状 1.0	なし	なし
直鎖状 0.1	なし	なし
直鎖状 0.01	あり	なし
直鎖状 0	あり	なし
ファージ (10^{13} pfu / 100 μ l)	なし	なし
ファージ (10^{12} pfu / 100 μ l)	あり	なし