(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2007-532666
(P2007-532666A)
(43)公表日　平成19年11月15日(2007.11.15)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 38/46	***(2006.01)***	A61K	37/54	ZNA	4B024
A61P 31/12	***(2006.01)***	A61P	31/12		4B050
A61P 31/20	***(2006.01)***	A61P	31/20		4C084
A61P 31/14	***(2006.01)***	A61P	31/14		4H045
C12N 9/16	*(2006.01)*	C12N	9/16	Z	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 105 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2007-508498 (P2007-508498)
(86)(22)出願日　平成17年4月14日 (2005.4.14)
(85)翻訳文提出日　平成18年11月14日 (2006.11.14)
(86)国際出願番号　PCT/US2005/012532
(87)国際公開番号　WO2005/115444
(87)国際公開日　平成17年12月8日 (2005.12.8)
(31)優先権主張番号　60/561,934
(32)優先日　平成16年4月14日 (2004.4.14)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　506340921
アヴィリッド　インコーポレーテッド
米国　フロリダ州　３２６４１　ゲインズヴィル　スイート１０１　エスイー　ホーソン・ロード　２１５３
(74)代理人　100082072
弁理士　清原　義博
(72)発明者　ルドルフ　アイ.　サルガニク
米国　ノースカロライナ州　２７５１１　キャリー　ブロガン・プレイス　１０７－イー
(72)発明者　ジェイコブ　ジー.　アペルバウム
米国　フロリダ州　３２６０５－３０３５　ゲインズヴィル　アパート２４９　２３　番ブルバード　エヌダブリュー　１８１０
最終頁に続く

(54)【発明の名称】ウイルス核酸を対象とした修飾ヌクレアーゼを用いた組成物及びウイルス性疾患の予防並びに治療方法

(57)【要約】
修飾ヌクレオチド若しくは元のヌクレアーゼ内で天然型アミノ酸に対して置換される非天然型のアミノ酸残基を少なくとも１つ備える複数の修飾ヌクレアーゼを有する抗ウイルス性組成物が提供される。また、この組成物の使用方法並びに本組成物を所定量投与するためのキットが提供される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
修飾ヌクレアーゼを備える抗ウイルス性組成物であって、
前記修飾ヌクレアーゼのアミノ酸配列中の少なくとも１つのアミノ酸が、非天然型アミノ酸残基であり、
該非天然型アミノ酸残基が、元のヌクレアーゼのアミノ酸配列中の天然型アミノ酸と置換され、
前記修飾ヌクレアーゼが、前記元のヌクレアーゼよりも大きな加水分解活性を備えることを特徴とする抗ウイルス性組成物。
【請求項２】
前記置換された非天然型アミノ酸が、ケトン側鎖基若しくはチオール側鎖基を備えることを特徴とする請求項１記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項３】
前記非天然型アミノ酸が、前記ヌクレアーゼのアミノ酸配列のＮ末端若しくはＣ末端に位置することを特徴とする請求項１記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項４】
ヌクレアーゼドメインを結合する核酸基質を備える配列の適切な位置に前記非天然型アミノ酸が位置することを特徴とする請求項１記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項５】
前記置換された非天然型アミノ酸残基が、多価側鎖基を備えることを特徴とする請求項４記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項６】
前記修飾ヌクレアーゼが、前記元のヌクレアーゼと比較して、前記核酸基質に対する高い親和性を備えることを特徴とする請求項５記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項７】
前記非天然型アミノ酸残基が、前記元のヌクレアーゼのアミノ酸配列の適切な位置に配され、
前記元のヌクレアーゼが、ヌクレアーゼ活性のモジュレータに対する結合ドメインを備えることを特徴とする請求項１記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項８】
前記モジュレータが、前記ヌクレアーゼ活性の阻害物質であることを特徴とする請求項７記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項９】
前記モジュレータが、プロテアーゼであることを特徴とする請求項７記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項１０】
前記置換された非天然型アミノ酸残基が、大きな中性の側鎖基若しくは電荷が付加された側鎖基であることを特徴とする請求項７記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項１１】
前記ケトン側鎖基若しくは前記チオール側鎖基が、中性の立体障害成分若しくは多価成分に共有結合することを特徴とする請求項２記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項１２】
前記中性の立体障害成分が、大きな有機成分若しくはポリマーであることを特徴とする請求項１１記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項１３】
前記多価成分が、デンドリマー、帯電した金のナノ粒子、多価側鎖を備える非天然型アミノ酸残基、一価側鎖を備える天然型及び非天然型アミノ酸残基のオリゴマー、マンノース－６－リン酸残基及びマンノース－６－リン酸残基のオリゴマーからなる群から選択されることを特徴とする請求項１１記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項１４】

前記修飾ヌクレアーゼが、前記元のヌクレアーゼと比較して、前記モジュレータの存在下における核酸基質に対する加水分解活性が大きいことを特徴とする請求項１０又は１１記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項１５】

前記元のヌクレアーゼが、生体起源のヌクレアーゼであることを特徴とする請求項１記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項１６】

前記元のヌクレアーゼが、哺乳類、両生類、細菌、昆虫及び植物の生体起源のヌクレアーゼからなる群から選択されることを特徴とする請求項１５記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項１７】

前記元のヌクレアーゼが、ヒトデオキシリボヌクレアーゼＩ（SWISS PROT P24855を参照）及びウシデオキシリボヌクレアーゼＩ（SWISS PROT P00639を参照）から選択されることを特徴とする請求項１６記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項１８】

ヒトデオキシリボヌクレアーゼＩ若しくはウシデオキシリボヌクレアーゼＩのＤＮＡ結合ドメイン内の非天然型アミノ酸のアミノ酸配列内の前記残基及び位置が、Arg(R)9又はGln(Q)9、Glu(E)13、Thr(T)14、Ser(S)43、His(H)44、Asn(N)74、Arg(R)111、Asn(N)170、Ser(S)206、Thr(T)207及びTyr(Y)211を備えることを特徴とする請求項１７記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項１９】

前記修飾デオキシリボヌクレアーゼＩが、元のヌクレアーゼよりも少なくとも約３倍大きな加水分解活性を備え、

前記基質が、二本鎖ウイルスＤＮＡであることを特徴とする請求項１８記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項２０】

前記モジュレータが、デオキシリボヌクレアーゼＩ活性の阻害物質であり、

前記モジュレータが、Ｇアクチンであることを特徴とする請求項８、１７乃至１９いずれかに記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項２１】

前記非天然型アミノ酸が、大きな中性の側鎖基或いは電荷が付加された側鎖基を備え、

前記非天然型アミノ酸が、ヒトデオキシリボヌクレアーゼＩ若しくはウシデオキシリボヌクレアーゼＩのＧアクチン結合ドメイン内の残基であるとともにヒトデオキシリボヌクレアーゼＩ若しくはウシデオキシリボヌクレアーゼＩのＧアクチン結合ドメイン内に位置し、

前記残基及び前記位置が、His(H)44、Leu(L)45、Val(V)48、Gly(G)49、Leu(L)52、Asp(D)53、Asn(N)56、His(H)64若しくはTyr(Y)65、Val(V)66、Val(V)67、Ser(S)68、Glu(E)69、Ser(S)94、Tyr(Y)96及びAla(A)114からなる群から選択される少なくとも１つであることを特徴とする請求項１０又は２０記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項２２】

前記修飾デオキシリボヌクレアーゼが、元のヌクレアーゼと比較して、生理学的濃度のＧアクチンの存在下において、少なくとも約１０倍高い二本鎖ＤＮＡに対する加水分解活性を備えることを特徴とする請求項１８、２０又は２１いずれかに記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項２３】

前記修飾デオキシリボヌクレアーゼＩが、前記元のヒトデオキシリボヌクレアーゼＩ（Q11RU/E13KU$^{(2+)}$/N74KU$^{(2+)}$/A114FU$^{(keto)}$）のアミノ酸配列内の位置での残基における置換により得られ

前記RUは、非天然型ホモアルギニンであり、

前記KU$^{(2+)}$は、２つの正電荷で帯電された側鎖アミノ基を備える非天然型リジンであり、

前記FU(keto)は、ケトン基を運搬する非天然型p－アセチル－Ｌ－フェニルアラニン残基であることを特徴とする請求項２２記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項２４】

前記元のヌクレアーゼが、リボヌクレアーゼのようなヌクレアーゼの群から選択され、

前記リボヌクレアーゼのようなヌクレアーゼの群が、ヒトリボヌクレアーゼＩ（SWISS PROT P07998参照）、ウシリボヌクレアーゼＡ（SWISS PROT P00656参照）、ヒトリボヌクレアーゼＩのリボヌクレアーゼＳ誘導体及びウシリボヌクレアーゼＡのリボヌクレアーゼＳ誘導体からなることを特徴とする請求項１６記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項２５】

前記元のヌクレアーゼがモジュレータに対する結合ドメインを備え、

前記モジュレータが、内因性リボヌクレアーゼ阻害物質（ＲＩ）であることを特徴とする請求項２４記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項２６】

前記修飾リボヌクレアーゼが、前記元のヌクレアーゼと比較して、生理学的濃度の前記内因性リボヌクレアーゼ阻害物質の存在下において、少なくとも３倍以上の大きさの一本鎖ＲＮＡに対する加水分解活性を備えることを特徴とする請求項２５記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項２７】

前記非天然型アミノ酸が、大きな中性の側鎖基或いは電荷が付加された側鎖基を備え、

前記非天然型アミノ酸が、リボヌクレアーゼの前記内因性リボヌクレアーゼ阻害物質の結合ドメイン内の残基及び位置であり、

該残基及び位置が、元のヌクレアーゼのLys(K)1, Lys(K)7, Gln(Q)11, Asn(N)71, Asp(E)111及びArg(R)85乃至Arg(N)94から選択される少なくとも１つからなることを特徴とする請求項２６記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項２８】

前記修飾ヒトリボヌクレアーゼＩが、元のヒトリボヌクレアーゼＩ（K1FU(keto)/Q11A/N71A/E111A）から選択される位置における置換物を備え、

前記FU(keto)が、ケトン基を運搬する非天然型p－アセチル－Ｌ－フェニルアラニン残基であることを特徴とする請求項２７記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項２９】

前記修飾ヒトリボヌクレアーゼＳが、置換物を備え、

該置換物が、元のヒトリボヌクレアーゼＩ（K1FU(keto)/Q11A）のアミノ酸配列内の位置１乃至１５を備えるペプチド断片の位置及びアミノ酸（N71A/G89FU(keto)/E111A内の位置２１乃至１２４を備える切り取られたＳプロテインの位置から選択され、

前記FU(keto)が、ケトン基を運搬する非天然型p－アセチル－Ｌ－フェニルアラニン残基であることを特徴とする請求項２７記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項３０】

前記元のヌクレアーゼが、人工ヌクレアーゼであることを特徴とする請求項１記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項３１】

前記人工ヌクレアーゼが、分子スカホールドであり、

該分子スカホールドが、核酸基質に対する少なくとも１つの認識ドメインと、核酸基質のリン酸ジエステル結合の加水分解に対する少なくとも１つの触媒ドメインを備えることを特徴とする請求項３０記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項３２】

前記分子スカホールドが、合成ペプチド、ペプチドオリゴマー或いはペプチドデンドリマーであることを特徴とする請求項３１記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項３３】

前記合成ペプチドが、加水分解オリゴペプチドであり、

該加水分解オリゴペプチドが、加水分解的に作用するアミノ酸（Arg, Asp, Cys, His,

Lys, Ser, Tyr及びTrp）を備え、
前記加水分解オリゴペプチドが更に、アミノ酸（Ala, Gly, Leu, Phe）を備えることを特徴とする請求項３２記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項３４】
前記加水分解オリゴペプチドが、ジペプチド若しくはトリペプチドであり、
該ジペプチド若しくはトリペプチドが、Ser-His, His-Asp, Cys-His, Ser-His-Asp, Ser-His-Gly, Ser-His-His及びHis-Phe-Aspからなる群から選択されることを特徴とする請求項３３記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項３５】
前記加水分解オリゴペプチドがヘクサペプチドであり、
該ヘクサペプチドが、アミノ酸配列を備え、
該アミノ酸配列が、Gly-Phe-Ser-Leu-His-Ala (Seq. ID NO:10)、Phe-Ser-Phe-Leu-His-Ala（Seq. ID NO:11）及びSer-Ser-Phe-Leu-His-Ala （Seq. ID NO:12）から選択されることを特徴とする請求項３４記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項３６】
前記加水分解オリゴペプチドが、ウンデカペプチドであり、
該ウンデカペプチドが、Ser-Gly-Gly-His-Gly-Gly-Arg-Gly-Gly-His-Phe (Seq. ID NO:14), Ser-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-His-Phe (Seq. ID NO:15), Ser-Gly-Gly-Arg-Gly-Gly-His-Gly-Gly-His-Phe (SEQ ID NO:16)からなる群から選択されることを特徴とする請求項３５記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項３７】
前記分子スカホールドが、ポリペプチドであり、
前記核酸認識ドメイン及び前記触媒ドメインが、前記ポリペプチドの構造単位に埋設されることを特徴とする請求項３２記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項３８】
前記触媒ドメインが、特に、加水分解性金属と結合し、
該加水分解性金属が、ランタニドであることを特徴とする請求項３７記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項３９】
前記ポリペプチドが、加水分解ポリペプチドであり、
該加水分解ポリペプチドが、TERRRQQLDKDGDGTIDEREIKIHFQNKRAKIK (SEQ ID NO:4), TERRRFDKDQNGYIGAADLRHVKIWFQNKRAKIK (SEQ ID NO:5), TERRRFRVFDKDGNGYISAAEKIWFQNKRAKIK (SEQ ID NO:6), TRRRRFSLFDKDGDGTITTKEEVWFQNRRMKWK (SEQ ID NO:7)及びDEKRPRTAFSGEQLARLKREFNENRYLTERRRLRVFDKDGNGFISAAEKIWFQNKRAKIKKST (SEQ ID NO:8)からなる群から選択されることを特徴とする請求項３８記載の抗ウイルス組成物。
【請求項４０】
前記分子スカホールドが、多数の付着部位を備える高分子担体であり、
該高分子担体が、核酸認識ドメインと触媒ドメインを備え、
これら核酸認識ドメインと触媒ドメインが、高分子担体の別の部位に固定されることを特徴とする請求項３２記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項４１】
前記核酸認識ドメインが、配列特異的オリゴヌクレオチド、ジンクフィンガー及びヘアピンポリアミドからなる群から選択されることを特徴とする請求項４０記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項４２】
前記触媒ドメインが、金属結合ペプチド又は合成金属複合体であることを特徴とする請求項４０記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項４３】
前記金属結合ペプチドが、Zn(II)結合ペプチド（Asp-Pro-Asp-Glu-Leu-Glu-His-Ala-Ala-Lys-His-Glu-Ala-Ala-Ala-Lys-$CONH_2$ (Seq. ID NO:9)）であることを特徴とする請求項

４２記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項４４】
前記合成金属複合体が、ジセリウム複合体（Ce_2(HXTA=5-メチル-2-ヒドロキシ-1.3-キシレン-a,a-ジアミン-N,N,N',N'-四酢酸)）、ポリアルコールと大環状リガンドのランタニド複合体、ポリアミンリガンドのCo(III)複合体、Fe(II)ブレオマイシン複合体、カナマイシンとネアミンのCu(II)複合体からなる群から選択されることを特徴とする請求項４３記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項４５】
化学式Nuc-$(T^b)_r$で表される抗ウイルス性組成物であって、
前記Nucは、少なくとも１つの標的リガンド$(T^b)_r$と共有結合するヌクレアーゼを備え、
前記bは、前記リガンドの種類に関連する１乃至８の整数であり、
前記rは、各種のリガンドの量に関係する１乃至４の整数であることを特徴とする抗ウイルス性組成物。
【請求項４６】
化学式Nuc-Hで表される抗ウイルス性組成物であって、
前記Nucは、非極性成分Hと共有結合するヌクレアーゼを備え、
前記Hは、アルキル鎖からなる炭化水素、アリル鎖からなる炭化水素、置換されたアルキル鎖からなる炭化水素及び置換されたアリル鎖からなる炭化水素からなる群から選択されることを特徴とする抗ウイルス性組成物。
【請求項４７】
化学式Nuc-H-$(T^b)_r$で表される抗ウイルス性組成物であって、
該抗ウイルス性組成物は、請求項４６記載の組成物を備え、
該請求項４６記載の組成物は更に、少なくとも１つの標的リガンド$(T^b)_r$と共有結合し、
前記bは、前記リガンドの種類に関連する１乃至８の整数であり、
前記rは、各種のリガンドの量に関係する１乃至４の整数であることを特徴とする抗ウイルス性組成物。
【請求項４８】
化学式$(Nuc^a)_q$-P_n-Hで表される抗ウイルス性組成物であって、
該抗ウイルス性組成物は、少なくとも１つのヌクレアーゼ成分$(Nuc^a)_q$を備え、
前記aは、ヌクレアーゼの種類に関連する１乃至３の整数であり、
前記qは、各ヌクレアーゼの量に関連する１乃至５０の整数であり、
前記Nucは、nユニットのモノマPのポリマーP_nに共有結合し、
前記nは１乃至２０００の整数であり、
前記P_nは、非極性成分Hに共有結合することを特徴とする抗ウイルス性組成物。
【請求項４９】
化学式$(T^b)_r$-P_m-Hで表される抗ウイルス性組成物であって、
該抗ウイルス性組成物は、請求項４５記載の少なくとも１つの標的リガンド$(T^b)_r$を備え、
前記リガンドは、mユニットのモノマPのポリマーP_mに共有結合し、
前記mは、１乃至２０００の整数であり、
前記P_mは、非極性成分Hに共有結合することを特徴とする抗ウイルス性組成物。
【請求項５０】
化学式$(Nuc^a)_q$ - P_n-H- P_m -$(T^b)_r$で表される抗ウイルス性組成物であって、
該抗ウイルス性組成物は、請求項４８に記載の組成物を備え、
該請求項４８に記載の組成物が、請求項４９記載の組成物に共有結合してなることを特徴とする抗ウイルス性組成物。
【請求項５１】
化学式$[(Nuc^a)_q$ - P_n-$H]_i$-D-[H- P_m -$(T^b)_r]_k$で表される抗ウイルス性組成物であって、

該抗ウイルス性組成物は、請求項４８又は請求項４９に記載のいずれかの組成物を備え、
前記i及びkは、前記組成物の種類それぞれの量に関係する１乃至８の整数であり、
各組成物は、更に、非極性成分Hを介して疎水性コア基盤Dに非共有結合し、
前記Dは、修飾されたデンドリマーであり、長く形成された疎水性コアを備えることを特徴とする抗ウイルス性組成物。

【請求項５２】
化学式$(Nuc^a)_q$-P_n-H-$L^a{}_{(+)}$で表される抗ウイルス性組成物であって、
該抗ウイルス性組成物は、修飾オリゴヌクレオチド$L^a{}_{(+)}$に共有結合し、
該修飾オリゴヌクレオチド$L^a{}_{(+)}$は、塩基対合の能力を備え、
前記$L^a{}_{(+)}$は、それぞれ相補的なヌクレオチド配列を備えるオリゴヌクレオチド$L^a{}_{(-)}$と混成することを特徴とする請求項４８記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項５３】
化学式$(T^b)_r$-P_m-H-$L^b{}_{(+)}$で表される抗ウイルス性組成物であって、
該抗ウイルス性組成物は、塩基対合の能力を備える特異なヌクレオチド配列を備える修飾オリゴヌクレオチド$L^b{}_{(+)}$に共有結合され、
前記$L^b{}_{(+)}$は、それぞれ相補的なヌクレオチド配列を備えるオリゴヌクレオチド$L^b{}_{(-)}$と混成することを特徴とする請求項４９記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項５４】
化学式$[(Nuc^a)_q$-P_n-H-$L^a{}_{(+)}]_k$-$[(L^a{}_{(-)})_k$-D_c-$(L^b{}_{(-)})_i]$-$[L^b{}_{(+)}$-H-P_m-$(T^b)_r]_i$で表される抗ウイルス性組成物であって、
前記i及びkは、前記組成物の種類それぞれの量に関係する１乃至８の整数であり、
前記$L^a{}_{(+)}$及び$L^b{}_{(+)}$は、それぞれ相補的なヌクレオチド配列を備えるオリゴヌクレオチド$L^a{}_{(-)}$又は$L^b{}_{(-)}$と混成し、
該オリゴヌクレオチド$L^a{}_{(-)}$又は$L^b{}_{(-)}$は、多価分子スカホールドD_cに共有結合し、
該多価分子スカホールドD_cは、有限数の付着部位を備え、
前記cは、付着部位の数であるとともに４乃至６４の整数であることを特徴とする請求項５２又は５３記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項５５】
化学式$[(Nuc^a)_q$ - P_n-$H]_k$-D_s- $L^a{}_{(+)}$で表される抗ウイルス性組成物であって、
該抗ウイルス性組成物は、請求項４８記載の組成物を複数備え、
該複数の組成物は多価分子スカホールドD_sに共有結合し、
該多価分子スカホールドD_sは、有限数の付着部位を備え、
前記sは、付着部位の数であるとともに４乃至６４の整数であり、
前記D_sは、更に、塩基対合の能力を備える特異なヌクレオチド配列を有する修飾オリゴヌクレオチド$L^a{}_{(+)}$に共有結合することを特徴とする抗ウイルス性組成物。

【請求項５６】
化学式$[(T^b)_r$-P_m-$H]_i$-D_s- $L^b{}_{(+)}$で表される抗ウイルス性組成物であって、
該抗ウイルス性組成物は、請求項４９に記載の組成物を複数備え、
該複数の組成物は多価分子スカホールドD_sに共有結合し、
前記sは、付着部位の数であるとともに４乃至６４の整数であり、
前記D_sは、更に、塩基対合の能力を備える特異なヌクレオチド配列を有する修飾オリゴヌクレオチド$L^a{}_{(+)}$に共有結合することを特徴とする抗ウイルス性組成物。

【請求項５７】
化学式$\{[(Nuc^a)_q$ - P_n-$H]_k$-D_s- $L^a{}_{(+)}\}_j$-$[L^a{}_{(-)}]_j$-D_c-$[L^b{}_{(-)}]_f$-$\{[$ $L^b{}_{(+)}$-D_s - $[H$- P_n -$(T^b)_q]\}_f$で表される抗ウイルス性組成物であって、
前記j及び前記fは、各成分の量に関連するとともに１乃至８の整数であり、
各組成物は、修飾オリゴヌクレオチド$L^a{}_{(-)}$又は$L^b{}_{(-)}$に接続し、
これら修飾オリゴヌクレオチド$L^a{}_{(-)}$又は$L^b{}_{(-)}$は、塩基対合並びにこれらに相補的に対応するオリゴヌクレオチド$L^a{}_{(+)}$又は$L^b{}_{(+)}$に混成することの能力を備える特異なヌクレオ

チド配列を備え、
前記$L^{a}_{(-)}$及び$L^{b}_{(-)}$は、更に、有限数の付着部位を備える多価分子スカホールドD_cに共有結合し、
前記cは、D_cの付着部位の数であるとともに４乃至６４の整数であることを特徴とする請求項５５又は５６記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項５８】
前記ヌクレアーゼNucが、野生型の未変性ヌクレアーゼ、遺伝的に修飾されたヌクレアーゼ、化学的且つ遺伝的に修飾された生体起源のヌクレアーゼ及び人工ヌクレアーゼからなる群から選択されることを特徴とする請求項４５又は４６記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項５９】
前記ポリマーが、PEG[ポリ(エチレン・グリコール)]、PEG-PLA(ポリ乳酸)、PEG-PLGA(ポリ乳酸グリコール酸)及びPEG-PLLA(ポリＬ乳酸)、HPMA[N-(2-ヒドロキシプロピル)メタアクリルアミド]コポリマー及びPEI[ポリ(エチレンイミン)]からなる群から選択されることを特徴とする請求項４８記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項６０】
前記ポリマーが、直線状、分岐状、叉状或いは星型形状の構造を備えることを特徴とする請求項５９記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項６１】
少なくとも１つの加水分解可能な架橋剤を備えることを特徴とする請求項４８又は４９記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項６２】
前記多価分子スカホールドD_c又はD_sがデンドリマーであることを特徴とする請求項５５乃至５７いずれかに記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項６３】
前記デンドリマーが、ポリ（アミドアミン）(PAMAM)、PAMAM(エチレンジアミン-EDA)及びポリ（リジン）デンドリマーからなる群から選択されることを特徴とする請求項６２記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項６４】
前記相補的なオリゴヌクレオチド$L^{a,b}_{(+)}$及び$L^{a,b}_{(-)}$それぞれが、Locked Nucleic Acids (LNA)（登録商標）、架橋化核酸（BNA）、ペプチド核酸(PNA)、ビスペプチド核酸（bis-PNA）、ヒドロキシプロリン・ペプチド核酸（hypNA）、セリン・ペプチド核酸（SerNA）、ヘアピンポリアミド、モルホリノ・オリゴ、ホスホロチオエート（PS）オリゴ及びピロリジン－アミド・オリゴヌクレオチドミミック(POM)からなる群から選択されることを特徴とする請求項５２又は５３記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項６５】
各オリゴヌクレオチド$L^{a}_{(-)}$及び$L^{b}_{(-)}$が特異なヌクレオチド配列若しくはそれぞれに対応する相補的なオリゴヌクレオチド$L^{a}_{(+)}$又は$L^{b}_{(+)}$を備え、
各オリゴヌクレオチド$L^{a}_{(-)}$及び$L^{b}_{(-)}$が更に、二官能性（bi-functional）化学試薬に結合し、
該化学試薬は、混成されたオリゴヌクレオチドの間に、共有結合を形成することを特徴とする請求項６４記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項６６】
前記二官能性化学試薬が、不活性な化学基を備え、該化学基が、前記混成されたオリゴヌクレオチドの間の共有結合に対して活性化することを特徴とする請求項６５記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項６７】
前記不活発な化学基が、芳香族のβ-クロロエチル・アルキル化した基を備え、
該芳香族のβ-クロロエチル・アルキル化した基が、隣接するホルミル残基により抑制されることを特徴とする請求項６６記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項６８】

水素化ホウ素ナトリウムを用いて前記ホルミル残基を低減している間に前記芳香族のβ-クロロエチル・アルキル化した基が化学的に活性化し、前記混成されたオリゴヌクレオチドの間の前記共有結合が形成されることを特徴とする請求項６７記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項６９】

前記不活発な化学基が、光能動的な架橋剤であり、

該架橋剤が、アジド、ソラレン又はポルフィリンからなる群から選択されることを特徴とする請求項６５記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項７０】

前記不活発なアジド架橋剤、ソラレン架橋剤又はポルフィリン架橋剤が更に、光活性化し、前記混成されたオリゴヌクレオチド間の共有結合を形成することを特徴とする請求項６９記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項７１】

前記標的リガンドT^bが、ウイルス性核酸に対するヌクレオチド配列特異的な結合親和力を有するオリゴマーの群から選択され、

該群が、ペプチド核酸（PNA）、ビスペプチド核酸（bis-PNA）、ヒドロキシプロリン・ペプチド核酸（hypNA）、セリン・ペプチド核酸（SerNA）、Locked Nucleic Acids (LNA)（登録商標）、架橋化核酸（BNA）、ヘアピンポリアミド、モルホリノ・オリゴ、ホスホロチオエート（PS）オリゴ及びピロリジン－アミド・オリゴヌクレオチドミミック(POM)及びジンクフィンガーの配列を備えるオリゴペプチドからなることを特徴とする請求項４６記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項７２】

前記標的リガンドT^bが、配列特異的な核酸結合タンパク質の群から形成され、該核酸結合タンパク質が、設計されたジンクフィンガータンパク質（ZFP）及び高アルギニンペプチドからなることを特徴とする請求項４６記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項７３】

前記標的リガンドT^bが、膜透過型のオリゴペプチド若しくはペプチドであることを特徴とする請求項４５記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項７４】

前記膜透過型のペプチドが、塩基性ポリ(Arg)及びポリ(Lys)ペプチド、アルギニン及びリジン残基の非天然型類似体を含有する塩基性ポリ(Arg)及びポリ(Lys) ペプチド、遺伝子由来の高Arg(R)/Lys(K)ペプチドからなる群から選択されることを特徴とする請求項７３記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項７５】

前記塩基性ポリ(Arg)ペプチドが、６乃至１０のArg残基を含有することを特徴とする請求項７４記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項７６】

前記高Arg(R)/Lys(K)ペプチドが、YGRKKRPQRRR(HIV TAT_{47-57}; SEQ ID NO: 17)、RQIKIWFQNRRMKWKK (ショウジョウバエ・アンテナペディア(ANTp16); SEQ ID NO 18)、RRWRRWWRRWWRRWRR(W/R; SEQ ID NO 19)、CWK_{18}(AlkCWK_{18}; SEQ ID NO:20)、K_{18}W$CCWK_{18}$(Di-CWK_{18}; SEQ ID NO:21)、WTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL(トランスポータン; SEQ ID NO 22)、GLFEALEELWEAK(DipaLytic; SEQ ID NO:23)、K_{16}GGCRGDMFGCAK_{16}RGD(K_{16}RGD; SEQ ID NO: 24)、K_{16}GGCMFGCGG(P1; SEQ ID NO:25)、K_{16}ICRRARGDNPDDRCT (P2; SEQ ID NO: 26)、KKWKMRRNQFWVKVQRbAK(B)bA (P3; SEQ ID NO 27)、VAYISRGGVSTYYSDTVKGRFTRQKYNKRA (P3a; SEQ ID NO: 28)、IGRIDPANGKTKYAPKFQDKATRSNYYGNSPS (P9.3; SEQ ID NO:29)、KETWWETWWTEWSQPKKKRKV(Pep-1; SEQ ID NO: 30)、PLAEIDGIELTY (Plae; SEQ ID NO:31)、K_{16}GGPLAEIDGIELGA (Kplae; SEQ ID NO:32)、K_{16}GGPLAEIDGIELCA (cKplae; SEQ ID NO: 33)、GALFLGFLGGAAGSTMGAWSQPKSKRKV (MGP; SEQ ID NO 34)、WEAK$(LAKA)_2$LAKH$(LAKA)_2$LKAC (HA2; SEQ ID NO: 35)、$(LARL)_6NHCH_3$ ($LARL4_6$; SEQ ID NO 36)、KLLKLLLKLWLLKLLL(Hel-11-7; SEQ ID NO 37)、$(KKKK)_2$GGC (KK; SEQ ID NO: 38)、$(KWKK)_2$GCC (KWK; SEQ ID NO: 39)、(RWRR)

$_2$GGC (RWR; SEQ ID NO: 40)、PKKKRKV (SV40 NLS7; SEQ ID NO 41)、PEVKKKRKPEYP (NLS12; SEQ ID NO:42)、TPPKKKRKVEDP (NLS12a; SEQ ID NO:43)、GGGGPKKKRKVGG (SV40 NLS13; SEQ ID NO 44)、GGGFSTSLRARKA (AV NLS13; SEQ ID NO: 45)、CKKKKKKSEDEYPYVPN (AV RME NLS 17; SEQ ID NO: 46)、CKKKKKKKSEDEYPYVPNFSTSLRARKA (AV FP NLS28; SEQ ID NO 47)、LVRKKRKTEEESPLKDKDAKKSKQE (SV40 N1 NLS24; SEQ ID NO:48)及び$K_9K_2K_4K_8GGK_5$(Loligmer; SEQ ID NO: 49)からなるペプチドの群から選択されることを特徴とする請求項７４記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項７７】

前記膜透過型のポリペプチドが、HSV-1テグメントタンパク質VP22、核外輸送シグナル(NES)と融合したHSV-1テグメントタンパク質VP22r、大腸菌エンテロトキシンのＢ－サブユニットEtxB (H57S)、非毒化されたエキソトキシンA (ETA)及びこれらの類似体からなることを特徴とする請求項７３記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項７８】

前記標的リガンドT^bが、ウイルス性宿主細胞（T-CSR）の宿主細胞(T-CSR)により発現された宿主細胞表面レセプター（CSR）のリガンドからなる群から選択されることを特徴とする請求項４５記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項７９】

前記T-CSRが、グルココルチコイド・デキサメタゾン及びその他物質を備えるステロイド誘導体の群から選択されることを特徴とする請求項７８記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項８０】

前記T-CSRが、ヘパラン硫酸レセプター結合ペプチドHPV31 L1 Gta: GYRARPKFKAGKR (SEQ ID NO:53)、HPV 45 L1 Ctb: RPAKRVRIRSKK (SEQ ID NO: 54)、hpv-16l1 Cta: SSTSTTAKRKKRKL (SEQ ID NO: 55)、HPV-16 L2 Ct: MLRKRRKRL (SEQ ID NO:56)、HPV-16 L2 Nt: MRHKRSAKRTKRA (SEQ ID NO:57)の群から選択されるウイルス性の核カプシドタンパク質から由来するペプチドであることを特徴とする請求項７８記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項８１】

前記T-CSRが、Tペプチド: ASTTTNYT (SEQ ID NO:1)及びD-Ala-T-ペプチド-アミド(DAPTA)からなるウイルス性の外膜タンパク質由来の合成ペプチドからなる群から選択されることを特徴とする請求項７８記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項８２】

前記T-CSRが、葉酸誘導体であることを特徴とする請求項７８記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項８３】

前記T-CSRが、更に、リガンド宿主レセプターを備え、

該リガンド宿主レセプターが、単糖類：Ｄ－マンノース、Ｄ－グルコース、Ｌ－ガラクトース、Ｌ－フコース（6-デオキシガラクトース）、Ｎ－アセチルグルコサミン、Ｎ－アセチルガラクトサミン、Ｎ－アセチルノイラミン酸（シアル酸）及びＮ－アセチルムラミン酸、Ｄ－マンノース－６－リン酸塩のような炭素６部位を占めるＬ－フコース及びＤ－マンノースの誘導体、Ｌ－フコシル－ラクトース、Ｄ－マンニトール、マンナン及びこれらの類似体の群から選択されることを特徴とする請求項７８記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項８４】

前記標的リガンドT^bが、CSR誘導体であり、

該CSR誘導体が、ウイルス感染した細胞のメンブレン上に発現したウイルス性の糖タンパク質に対する結合親和力を備えることを特徴とする請求項４５記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項８５】

前記CSR誘導体が、CD4又はCD8又は他のＴ細胞レセプターであることを特徴とする請求項８４記載の抗ウイルス性組成物。

【請求項８６】

前記CSR誘導体が、CXCR4又はCCR5又は他のケモカインレセプターであることを特徴とす

る請求項８４記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項８７】
前記標的リガンドT^bが、プレニル化標的システインの阻害物質であり、
前記プレニル化標的システインが、ウイルス性タンパク質のＣ末端近傍に$CX_1X_2X_3$を含むことを特徴とする請求項４５記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項８８】
前記プレニル化阻害物質が偽ペプチドを備えることを特徴とする請求項８７記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項８９】
薬剤として使用可能な緩衝剤を更に備えることを特徴とする請求項１乃至４５いずれかに記載の抗ウイルス性組成物。
【請求項９０】
野生型出芽ウイルス、自然に発生する突然変異ウイルス及び抗ウイルス療法の過程で発生する突然変異ウイルスからなる群から選択される少なくとも１つのウイルス性因子との感染により引き起こされる被験者内のウイルス性疾患を予防及び治療する方法であって、
該方法は、ヌクレアーゼを投与する段階を備え、
該ヌクレアーゼが野生型ウシ膵臓デオキシリボヌクレアーゼＩ若しくは野生型ウシ膵臓リボヌクレアーゼＡでないことを条件として、該ヌクレアーゼが、前記ウイルス性因子のビリオン内で発見されるようなウイルス性の核酸の遺伝子形態に対して優先的に作用する加水分解活性を備えるヌクレアーゼの群から選択されることを特徴とする方法。
【請求項９１】
野生型出芽ウイルス、自然に発生する突然変異ウイルス及び抗ウイルス療法の過程で発生する突然変異ウイルスからなる群から選択される少なくとも１つのウイルス性因子との感染により引き起こされる被験者内のウイルス性疾患を予防及び治療する方法であって、
該方法は、複数のヌクレアーゼ若しくはヌクレアーゼ由来の抗ウイルス性組成物を投与する段階を備え、
少なくとも２つのヌクレアーゼ若しくはヌクレアーゼ由来の抗ウイルス性組成物が、前記ウイルス性因子のビリオン内で発見されるようなウイルス性の核酸の遺伝子形態に対して優先的に作用する加水分解活性を備える酵素であることを特徴とする方法。
【請求項９２】
野生型出芽ウイルス、自然に発生する突然変異ウイルス及び抗ウイルス療法の過程で発生する突然変異ウイルスからなる群から選択される少なくとも１つのウイルス性因子との感染により引き起こされる被験者内のウイルス性疾患を予防及び治療する方法であって、
該方法は、少なくとも１つの抗ウイルス性ヌクレアーゼ若しくはヌクレアーゼ由来の抗ウイルス性組成物を投与する段階を備え、
ヌクレアーゼが、前記ウイルス性因子のライフサイクル内で発見されるようなウイルス性核酸の少なくとも１つの複製中間体の形態に対して優先的に作用する加水分解活性を備える酵素であることを特徴とする方法。
【請求項９３】
ウイルス性疾患を治療するために投与されるヌクレアーゼに対するウイルス耐性の増大を防止する方法であって、
該方法は、複数のヌクレアーゼ若しくはヌクレアーゼ由来の抗ウイルス性組成物を投与する段階を備え、
少なくとも１つのヌクレアーゼ若しくはヌクレアーゼ由来の抗ウイルス性組成物が、前記ウイルス性因子のビリオン内で発見されるようなウイルス性の核酸の遺伝子形態に対して優先的に作用する加水分解活性を備える酵素であり、
少なくとも１つのヌクレアーゼ若しくはヌクレアーゼ由来の抗ウイルス性組成物が、前記ウイルス性因子のライフサイクル内で発見されるようなウイルス性核酸の少なくとも１つの複製中間体の形態に対して優先的に作用する加水分解活性を備える酵素であることを特徴とする方法。

【請求項９４】
被験者のウイルス性疾患を治療するとともに治療のため投与されるヌクレアーゼ以外の抗ウイルス治療剤に対するウイルス耐性の増大を防止する方法であって、
該方法が、少なくとも１つのヌクレアーゼ又はヌクレアーゼ由来の組成物とともに抗ウイルス性薬剤を投与する段階を備えることを特徴とする方法。
【請求項９５】
ウイルス感染が要因となって生じた被験者の非ウイルス性疾患を予防並びに治療する方法であって、
該方法が、少なくとも１つの抗ウイルス性ヌクレアーゼ又は抗ウイルス性ヌクレアーゼ由来の組成物と組み合わせて非ウイルス性疾患に対抗する治療薬を投与する段階を備えることを特徴とする方法。
【請求項９６】
前記抗ウイルス性治療剤が、ウイルス侵入阻害剤、ウイルス集合阻害剤、ウイルス性ＤＮＡ及びＲＮＡポリメラーゼ阻害剤、ウイルス性逆転写酵素阻害剤、ウイルス性プロテアーゼ阻害剤、ウイルス性インテグラーゼ阻害剤及びウイルス排出の阻害剤からなる抗ウイルス性組成物の群から選択される少なくとも１つの組成物であることを特徴とする請求項９４記載の方法。
【請求項９７】
非ウイルス性の疾患が、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症（ＭＳ）及び加齢による認知症からなる群から選択される神経変性疾患であることを特徴とする請求項９５記載の方法。
【請求項９８】
前記疾患が、複数のウイルス性因子により引き起こされることを特徴とする請求項９０乃至９５いずれかに記載の方法。
【請求項９９】
前記抗ウイルス性ヌクレアーゼが、人、動物、バクテリア、植物及び人工由来の野生型ヌクレアーゼ、人、動物、バクテリア、植物及び人工由来の野生型ヌクレアーゼの遺伝子工学的に作り出された一般若しくは特殊変異体及び人、動物、バクテリア、植物及び人工由来の野生型ヌクレアーゼの化学的及び遺伝的に修飾された一般的若しくは特殊変異体からなる群から選択されることを特徴とする請求項９０乃至９５記載の方法。
【請求項１００】
前記ウイルス性因子が、グループＩ及びＩＩの二本鎖ＤＮＡウイルス若しくは一本鎖ＤＮＡウイルスそれぞれであり、
前記抗ウイルス性ヌクレアーゼが、グループＩの二本鎖ＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＩの一本鎖ＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＶの一本鎖ＲＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＶＩの非特異的ヌクレアーゼ及びグループＶＩＩの人工ヌクレアーゼからなる群から選択されることを特徴とする請求項９０乃至９５記載の方法。
【請求項１０１】
ウイルス性因子がそれぞれグループＩＩＩ、ＩＶ及びＶの二本鎖ＲＮＡ、一本鎖（＋）ＲＮＡ若しくは一本鎖（－）ＲＮＡウイルスであり、
前記ヌクレアーゼが、グループＩの二本鎖ＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＩの一本鎖ＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＩＩの二本鎖ＲＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＶの一本鎖ＲＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＶＩの非特異的ヌクレアーゼ及びグループＶＩＩの人工ヌクレアーゼからなる群から選択されることを特徴とする請求項９０乃至９５いずれかに記載の方法。
【請求項１０２】
前記ウイルス性因子が、グループＩＶの逆転写酵素（ＲＴ）を有するs/s(+)RNAウイルスであり、
前記ヌクレアーゼが、グループＩの二本鎖ＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＩの一本鎖ＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＶの一本鎖ＲＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グ

ループＶのハイブリッド特異的ヌクレアーゼ、グループＶＩの非特異的ヌクレアーゼ及びグループＶＩＩの人工ヌクレアーゼからなる群から選択されることを特徴とする請求項９０乃至９５いずれかに記載の方法。

【請求項１０３】

前記ウイルス性因子が、グループＶＩＩの逆転写酵素（ＲＴ）を有する二本鎖ＤＮＡウイルスであり、

前記ヌクレアーゼが、グループＩの二本鎖ＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＩの一本鎖ＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＶの二本鎖ＲＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＶの一本鎖ＲＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＶのハイブリッド特異的ヌクレアーゼ、グループＶＩの非特異的ヌクレアーゼ及びグループＶＩＩの人工ヌクレアーゼからなる群から選択されることを特徴とする請求項９０乃至９５いずれかに記載の方法。

【請求項１０４】

前記ウイルス性因子が、グループＩの二本鎖ＤＮＡウイルス、グループＩＩの一本鎖ＤＮＡウイルス、グループＶＩの逆転写酵素を有するss(+)RNAウイルス及びグループＶＩＩの逆転写酵素を有する二本鎖ＤＮＡウイルスからなる群から選択される複数のウイルスであり、

前記ヌクレアーゼが、グループＩの二本鎖ＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＩの一本鎖ＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＶの一本鎖ＲＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＶのハイブリッド特異的ヌクレアーゼ、グループＶＩの非特異的ヌクレアーゼ及びグループＶＩＩの人工ヌクレアーゼから選択されることを特徴とする請求項９０乃至９５いずれかに記載の方法。

【請求項１０５】

前記ウイルス性因子が、グループＩＩＩの二本鎖ＲＮＡ、グループＩＶのss(+)RNA、グループＶのss(-)RNAウイルス、グループＶＩの逆転写酵素を有するss(+)RNA及びグループＶＩＩの逆転写酵素を有する二本鎖ＤＮＡウイルスから選択され、

前記ヌクレアーゼが、グループＩの二本鎖ＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＩの一本鎖ＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＩＩの二本鎖ＲＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＶの一本鎖ＲＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＶのハイブリッド特異的ヌクレアーゼ、グループＶＩの非特異的ヌクレアーゼ及びグループＶＩＩの人工ヌクレアーゼからなる群から選択されることを特徴とする請求項９０乃至９５いずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は化学的及び遺伝的に修飾ヌクレアーゼを構成する新しい組成物に関する。この修飾ヌクレアーゼは、ウイルス複製周期中に存在するウイルス核酸を分裂させることを目的とするものである。さらに本発明は、ヌクレアーゼの加水分解特性の利用方法に関する。このヌクレアーゼの加水分解特性は人間、動物及び植物のウイルスに起因する病気の予防及び治療に用いられるものである。

【背景技術】

【０００２】

ウイルス性疾患を引き起こしかねない現存の及び新生の生命の予防並びに治療のための安全で有効な抗ウイルス薬に対する必要性が高まっている。デオキシリボヌクレアーゼＩはバクテリアウイルス、ヒトヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス及びアデノウイルスに感染した細胞内にある二本鎖ウイルスDNAの合成及び複製を阻害する。デオキシリボヌクレアーゼIは、ゲノム細胞DNAの合成と処理細胞の統合には影響を及ぼさない（Trukhachev and Salganik, Virology 33, 552, 1967; Salganik et al., Dokl. Akad. Nauk SSSR (Proc. USSR Acad. Sci.) 180: 1473-1476, 1968; Lapik, et al., Pharmac. Toxicol. 2: 210, 1970; Salganik., Current Trends in Life Sciences, 12: 115-119, 1984)。ウシ膵臓リボヌクレアーゼAは、ウイルスの複製を阻害することが証明されてきた。このウイルスの複製はインフルエンザ、ダニ媒介脳炎とポリオ及びウイルスに感染した細胞内

において行われる（LeClerc, Nature 177:578-579(1956); Salganik, Crrent Trends in Life Sciences, 12: 115-123, 1984）。抗ヒトヘルペス及び抗アデノウイルスの野生型ウシ膵臓デオキシリボヌクレアーゼI並びに抗ダニ媒介脳炎及び抗インフルエンザウイルスのウシ膵臓リボヌクレアーゼAの治療効果が臨床実験において実証された。（Salganik et al., Nature 214, 100, 1967; Gutarov et al., Zhurn. Nevropath. Psychiatry. 11, 75-78, 1976; Glukhov et al., Arch. Neurol. 33: 598-603, 1976）。二本鎖パルボウイルスに抗する性質を持つウシ膵臓デオキシリボヌクレアーゼは両方のウイルスに感染した犬の治療において効果的であることが示されてきた。この二本鎖DNAパルボウイルスは一本鎖リボ核酸パラ混合ウイルスに抗する性質を持つウシ膵臓リボヌクレアーゼと結合している。（米国特許第5,484,589号　権利者：Salganik）

【０００３】

ノーザンレオパードフロッグ（ヒョウガエル）の卵母細胞及び胚子から単離された細胞障害性オンコナーゼ（登録商標）などの特定のリボヌクレアーゼ並びにウシ種子のリボヌクレアーゼA（BSリボヌクレアーゼ）もまた細胞培養内のHIV－Iの複製を中程度に阻害していることが示されてきた。（Youle, et al., Proc.Natl. Acad. Sci. USA 91, No. 13: 6012-6016, 1994; Saxena, et al. J. Biol. Chem. 271: 20783-20788, 1996; Huang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:2678-2681, 1999）

【０００４】

野生型ウシ膵臓デオキシリボヌクレアーゼI及び野生型ウシ膵臓リボヌクレアーゼAの抗ウイルス特性に関するこれらの研究は野生型ヌクレアーゼの短所には焦点をあてていない。この短所とは例えば内因性のタンパク質分解に対する高い脆弱性、低い細胞取込み率、短い半減期などのことである。さらには、これらの研究は抗ウイルス治療法の主要な問題点には焦点をあてていない。この問題点とは、例えばヌクレアーゼによる治療中におけるウイルスへの抵抗力向上の可能性である。

【０００５】

【特許文献１】米国特許第５,４８４,５８９号

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００６】

抗ウイルス核酸デオキシリボヌクレアーゼI及び抗ウイルス核酸リボヌクレアーゼAの加水分解特性利用に対する初期の取り組みは、感染細胞内の二本鎖ウイルスゲノムDNAあるいは一本鎖ウイルスゲノムRNAを対象とすることに限定されていた。しかしながら対象とされたウイルスの複製周期の過程において出現する中間体のウイルス核酸の多様な形態は考慮されていなかった。この中間体のウイルス核酸の多様な形態とは、例えば直線状の、環状のあるいはスーパーコイル状の二本鎖DNA（ｄｓＤＮＡ）、一本鎖DNA（ｓｓＤＮＡ）、二本鎖RNA、一本鎖RNA、及びハイブリッドRNA-DNAなどのことである。

【課題を解決するための手段】

【０００７】

本明細書中で説明される実施形態のうち１つは、修飾ヌクレアーゼを備える抗ウイルス性組成物であって、前記修飾ヌクレアーゼのアミノ酸配列中の少なくとも１つのアミノ酸が、非天然型アミノ酸残基であり、該非天然型アミノ酸残基が、元のヌクレアーゼのアミノ酸配列中の天然型アミノ酸と置換され、前記修飾ヌクレアーゼが、前記元のヌクレアーゼよりも大きな加水分解活性を備えることを特徴とする抗ウイルス性組成物である。

置換される非天然型アミノ酸は、他の実施形態においては、ケトン若しくはチオール側鎖基である。

一般的に、非天然型のアミノ酸は、ヌクレアーゼのアミノ酸配列のＮ末端若しくはＣ末端に位置する。

【０００８】

他の実施形態において、ヌクレアーゼドメインを結合する核酸基質を備える配列の適切な位置に前記非天然型アミノ酸が位置する。一般的に、置換された非天然型アミノ酸残基

は、多価側鎖基を備える。修飾ヌクレアーゼは、元のヌクレアーゼと比較して、核酸基質に対する高い親和性を備える。

【０００９】

他の実施形態において、非天然型アミノ酸残基が、元のヌクレアーゼのアミノ酸配列の適切な位置に配され、元のヌクレアーゼが、ヌクレアーゼ活性のモジュレータに対する結合ドメインを備える。この実施形態に関連する実施形態において、モジュレータは、ヌクレアーゼ活性の阻害物質である。例えば、このモジュレータは、プロテアーゼである。置換された非天然型アミノ酸残基は、大きな中性の側鎖基若しくは電荷が付加された側鎖基である。ケトン側鎖基若しくはチオール側鎖基は、中性の立体障害成分（steric hindrance moiety）若しくは多価成分に共有結合する。中性の立体障害成分が、大きな有機成分若しくはポリマーであり、多価成分が、デンドリマー、帯電した金のナノ粒子、多価側鎖を備える非天然型アミノ酸残基、単価イオン化された側鎖を備える天然型及び非天然型アミノ酸残基のオリゴマー、マンノース－６－リン酸残基及びマンノース－６－リン酸残基のオリゴマーからなる群から選択される。

【００１０】

本発明の抗ウイルス性組成物は、元のヌクレアーゼと比較して、モジュレータの存在下における核酸基質に対して大きな加水分解活性を発揮する。ある実施形態において、元のヌクレアーゼは生体起源であり、例えば、この生体起源は、哺乳類、両生類、細菌、昆虫及び植物の生体起源のヌクレアーゼからなる群から選択される。

他の実施形態において、例示的に示される元のヌクレアーゼは、ヒトデオキシリボヌクレアーゼＩ（SWISS PROT P24855を参照）及びウシデオキシリボヌクレアーゼＩ（SWISS PROT P00639を参照）から選択される。ヒトデオキシリボヌクレアーゼＩ若しくはウシデオキシリボヌクレアーゼＩのＤＮＡ結合ドメイン内の非天然型アミノ酸のアミノ酸配列内の残基及び位置は、Arg(R)9又はGln(Q)9、Glu(E)13、Thr(T)14、Ser(S)43、His(H)44、Asn(N)74、Arg(R)111、Asn(N)170、Ser(S)206、Thr(T)207及びTyr(Y)211を備える。修飾デオキシリボヌクレアーゼＩは、元のヌクレアーゼよりも少なくとも約３倍大きな加水分解活性を備え、基質は、二本鎖ウイルスＤＮＡである。

【００１１】

ある実施形態において、モジュレータは、デオキシリボヌクレアーゼＩ活性の阻害物質であり、例えば、このモジュレータは、Ｇアクチンである。非天然型アミノ酸は、大きな中性の側鎖基或いは電荷が付加された側鎖基を備え、この非天然型アミノ酸は、ヒトデオキシリボヌクレアーゼＩ若しくはウシデオキシリボヌクレアーゼＩのＧアクチン結合ドメイン内の残基であるとともにヒトデオキシリボヌクレアーゼＩ若しくはウシデオキシリボヌクレアーゼＩのＧアクチン結合ドメイン内に位置し、残基及び位置は、His(H)44、Leu(L)45、Val(V)48、Gly(G)49、Leu(L)52、Asp(D)53、Asn(N)56、His(H)64若しくはTyr(Y)65、Val(V)66、Val(V)67、Ser(S)68、Glu(E)69、Ser(S)94、Tyr(Y)96及びAla(A)114からなる群から選択される少なくとも１つである。修飾デオキシリボヌクレアーゼは、元のヌクレアーゼと比較して、生理学的濃度のＧアクチンの存在下において、少なくとも約１０倍高い二本鎖ＤＮＡに対する加水分解活性を備える。

関連する実施形態において、修飾デオキシリボヌクレアーゼＩは、置換物を備え、この置換物は、元のヒトデオキシリボヌクレアーゼＩ（$Q11RU/E13KU^{(2+)}/N74KU^{(2+)}/A114FU^{(keto)}$）のアミノ酸配列内の位置での残基内に存する。ここで、RUは、非天然型ホモアルギニンであり、$KU^{(2+)}$は、２つの正電荷で帯電された側鎖アミノ基を備える非天然型リジンであり、$FU^{(keto)}$は、ケトン基を運搬する非天然型p－アセチル－Ｌ－フェニルアラニン残基である。

【００１２】

他の実施形態において、元のヌクレアーゼは、リボヌクレアーゼＡ様ヌクレアーゼの群から選択され、このリボヌクレアーゼＡ様ヌクレアーゼの群は、ヒトリボヌクレアーゼＩ（SWISS PROT P07998参照）、ウシリボヌクレアーゼＡ（SWISS PROT P00656参照）、ヒトリボヌクレアーゼＩのリボヌクレアーゼＳ誘導体及びウシリボヌクレアーゼＡのリボヌク

レアーゼＳ誘導体からなる。元のヌクレアーゼは、モジュレータに対する結合ドメインを備える。このモジュレータは、阻害物質であり、内因性リボヌクレアーゼ阻害物質（ＲＩ）である。修飾リボヌクレアーゼは、元のヌクレアーゼと比較して、生理学的濃度の内因性リボヌクレアーゼ阻害物質の存在下において、少なくとも３倍以上の大きさの一本鎖ＲＮＡに対する加水分解活性を備える。非天然型アミノ酸は、大きな中性の側鎖基或いは電荷が付加された側鎖基であり、非天然型アミノ酸が、リボヌクレアーゼの内因性リボヌクレアーゼ阻害物質の結合ドメイン内の残基及び位置であり、残基及び位置が、元のヌクレアーゼのLys(K)1, Lys(K)7, Gln(Q)11, Asn(N)71, Asp(E)111及びArg(R)85～Arg(N)94から選択される少なくとも１つからなる。

【００１３】

修飾ヒトリボヌクレアーゼＩは、元のヒトリボヌクレアーゼＩ（K1FU$^{(keto)}$/Q11A/N71A/E111A）から選択される位置における置換物を備える。ここで、FU$^{(keto)}$は、ケトン基を運搬する非天然型p－アセチル－Ｌ－フェニルアラニン残基である。

修飾ヒトリボヌクレアーゼＳが、置換物を備え、この置換物は、元のヒトリボヌクレアーゼＩ（K1FU$^{(keto)}$/Q11A）のアミノ酸配列内の位置１乃至１５を備えるペプチド断片の位置及びアミノ酸（N71A/G89FU$^{(keto)}$/E111A内の位置２１乃至１２４を備える切り取られたＳプロテインの位置から選択される。ここで、FU$^{(keto)}$は、ケトン基を運搬する非天然型p－アセチル－Ｌ－フェニルアラニン残基である。

【００１４】

他の実施形態において、元のヌクレアーゼは、人工的なヌクレアーゼである。人工的ヌクレアーゼは、分子スカホールドであり、この分子スカホールドが、核酸基質に対する少なくとも１つの認識ドメインと、核酸基質のリン酸ジエステル結合の加水分解に対する少なくとも１つの触媒ドメインを備える。

他の関連する実施形態において、分子スカホールドは、合成ペプチド、ペプチドオリゴマー或いはペプチドデンドリマーである。合成ペプチドは、加水分解オリゴペプチドであり、この加水分解オリゴペプチドが、加水分解的に作用するアミノ酸（Arg, Asp, Cys, His, Lys, Ser, Tyr及びTrp）を備える。更に、加水分解オリゴペプチドは、アミノ酸（Ala, Gly, Leu, Phe）を備える。この実施形態において、加水分解オリゴペプチドは、ジペプチド若しくはトリペプチドであり、このジペプチド若しくはトリペプチドは、Ser-His, His-Asp, Cys-His, Ser-His-Asp, Ser-His-Gly, Ser-His-His及びHis-Phe-Aspからなる群から選択される。一例において、加水分解オリゴペプチドをヘキサペプチドとすることができる。このヘキサペプチドは、アミノ酸配列を備え、このアミノ酸配列が、Gly-Phe-Ser-Leu-His-Ala (Seq. ID NO:10)、Phe-Ser-Phe-Leu-His-Ala（Seq. ID NO:11）及びSer-Ser-Phe-Leu-His-Ala （Seq. ID NO:12）から選択される。他の実施形態において、加水分解オリゴペプチドは、ウンデカペプチドであり、このウンデカペプチドは、Ser-Gly-Gly-His-Gly-Gly-Arg-Gly-Gly-His-Phe (Seq. ID NO:14), Ser-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-His-Phe (Seq. ID NO:15), Ser-Gly-Gly-Arg-Gly-Gly-His-Gly-Gly-His-Phe (SEQ ID NO:16)からなる群から選択される。

【００１５】

これらの実施形態において、分子スカホールドは、ポリペプチドであり、核酸認識ドメイン及び前記触媒ドメインが、ポリペプチドの構造単位に埋設される。更に、触媒ドメインが、特に、加水分解性金属と結合し、この加水分解性金属は、ランタニドである。

【００１６】

他の実施形態において、ポリペプチドは、加水分解ポリペプチドであり、この加水分解ポリペプチドが、TERRRQQLDKDGDGTIDEREIKIHFQNKRAKIK (SEQ ID NO:4), TERRRFDKDQNGYIGAADLRHVKIWFQNKRAKIK (SEQ ID NO:5), TERRRFRVFDKDGNGYISAAEKIWFQNKRAKIK (SEQ ID NO:6), TRRRRFSLFDKDGDGTITTKEEVWFQNRRMKWK (SEQ ID NO:7)及びDEKRPRTAFSGEQLARLKREFNENRYLTERRRLRVFDKDGNGFISAAEKIWFQNKRAKIKKST (SEQ ID NO:8)からなる群から選択される。

【００１７】

一般的に、分子スカホールドは、多数の付着部位を備える高分子担体であり、この高分

子担体は、核酸認識ドメインと触媒ドメインを備え、これら核酸認識ドメインと触媒ドメインが、高分子担体の別の部位に固定される。核酸認識ドメインは、配列特異的オリゴヌクレオチド、ジンクフィンガー及びヘアピン・ポリアミドからなる群から選択される。触媒ドメインは、金属結合ペプチド又は合成金属複合体である。

更に、金属結合ペプチドは、Zn(II)結合ペプチド（Asp-Pro-Asp-Glu-Leu-Glu-His-Ala-Ala-Lys-His-Glu-Ala-Ala-Ala-Lys-$CONH_2$ (Seq. ID NO:9)）である。合成金属複合体は、ジセリウム複合体（Ce_2(HXTA=5-メチル-2-ヒドロキシ-1.3-キシレン-a,a-ジアミン-N,N,N',N'-四酢酸)）、ポリアルコールと大環状リガンドのランタニド複合体、ポリアミンリガンドのCo(III)複合体、Fe(II)ブレオマイシン複合体、カナマイシンとネアミンのCu(II)複合体からなる群から選択される。

【００１８】

本明細書において、化学式Nuc-$(T^b)_r$で表される抗ウイルス性組成物が示される。Nucは、少なくとも１つの標的リガンド$(T^b)_r$と共有結合するヌクレアーゼを備える。ここで、bは、リガンドの種類に関連する１乃至８の整数であり、rは、各種のリガンドの量に関係する１乃至４の整数である。

これに関連して、化学式$(T^b)_r$-P_m-Hで表される抗ウイルス性組成物が示される。この抗ウイルス性組成物は、少なくとも１つの標的リガンド$(T^b)_r$を備え、このリガンドは、mユニットのモノマーPのポリマーP_mに共有結合する。ここで、mは、１乃至２０００の整数である。また、P_mは、非極性成分Hに共有結合する。

【００１９】

本明細書において、化学式Nuc-Hで表される抗ウイルス性組成物が示される。Nucは、非極性成分Hと共有結合するヌクレアーゼを備える。Hは、アルキル鎖からなる炭化水素、アリル鎖からなる炭化水素、置換されたアルキル鎖からなる炭化水素及び置換されたアリル鎖からなる炭化水素からなる群から選択される。

これに関連して、化学式Nuc-H-$(T^b)_r$で表される抗ウイルス性組成物が示される。抗ウイルス性組成物は、少なくとも１つの標的リガンド$(T^b)_r$と共有結合する。ここで、bは、前記リガンドの種類に関連する１乃至８の整数であり、rは、各種のリガンドの量に関係する１乃至４の整数である。

【００２０】

本明細書において、化学式$(Nuc^a)_q$-P_n-Hで表される抗ウイルス性組成物が示される。この抗ウイルス性組成物は、少なくとも１つのヌクレアーゼ成分$(Nuc^a)_q$を備える。ここで、aは、ヌクレアーゼの種類に関連する１乃至３の整数であり、qは、各ヌクレアーゼの量に関連する１乃至５０の整数である。Nucは、nユニットのモノマーPのポリマーP_nに共有結合する。ここで、nは１乃至２０００の整数であり、P_nは、非極性成分Hに共有結合する。

【００２１】

本明細書において、化学式$(Nuc^a)_q$ - P_n-H- P_m -$(T^b)_r$で表される抗ウイルス性組成物が示される。この抗ウイルス性組成物は、上記の２つの組成物を備え、これら組成物が、互いに共有結合する。

これに関連して、化学式$[(Nuc^a)_q$ - P_n-H$]_i$-D-[H- P_m -$(T^b)_r]_k$で表される抗ウイルス性組成物が示される。ここで、i及びkは、前記組成物の種類それぞれの量に関係する１乃至８の整数である。各組成物は、更に、非極性成分Hを介して疎水性コア基盤Dに非共有結合する。ここで、Dは、修飾されたデンドリマーであり、長く形成された疎水性コアを備える。

【００２２】

上述と同様に、本明細書において、化学式$(Nuc^a)_q$-P_n-H-$L^a{}_{(+)}$で表される抗ウイルス性組成物が示される。この抗ウイルス性組成物は、修飾オリゴヌクレオチド$L^a{}_{(+)}$に共有結合する。またh、修飾オリゴヌクレオチド$L^a{}_{(+)}$は、塩基対合の能力を備える。更に、$L^a{}_{(+)}$は、それぞれ相補的なヌクレオチド配列を備えるオリゴヌクレオチド$L^a{}_{(-)}$と混成する。

更に、化学式$(T^b)_r$-P_m-H-$L^b{}_{(+)}$で表される抗ウイルス性組成物が示される。この抗ウイルス性組成物は、塩基対合の能力を備える特異なヌクレオチド配列を備える修飾オリゴヌクレオチド$L^b{}_{(+)}$に共有結合される。$L^b{}_{(+)}$は、それぞれ相補的なヌクレオチド配列を備えるオリゴヌクレオチド$L^b{}_{(-)}$と混成する。

【００２３】

更に、本明細書において、上記の組成物に従う化学式$[(Nuc^a)_q$-P_n-H-$L^a{}_{(+)}]_k$-$[(L^a{}_{(-)})_k$-D_c-$(L^b{}_{(-)})_i]$-$[L^b{}_{(+)}$-H-P_m-$(T^b)_r]_i$で表される抗ウイルス性組成物が示される。ここで、i及びkは、前記組成物の種類それぞれの量に関係する１乃至８の整数である。$L^a{}_{(+)}$及び$L^b{}_{(+)}$は、それぞれ相補的なヌクレオチド配列を備えるオリゴヌクレオチド$L^a{}_{(-)}$又は$L^b{}_{(-)}$と混成する。このオリゴヌクレオチド$L^a{}_{(-)}$又は$L^b{}_{(-)}$は、多価分子スカホールドD_cに共有結合する。この多価分子スカホールドD_cは、有限数の付着部位を備える。ここで、cは、付着部位の数であるとともに４乃至６４の整数である。

【００２４】

化学式$[(Nuc^a)_q$ - P_n-H$]_k$-D_s- $L^a{}_{(+)}$で表される抗ウイルス性組成物が示される。この抗ウイルス性組成物は、複数の上記の組成物を備える。この複数の組成物は多価分子スカホールドD_sに共有結合する。多価分子スカホールドD_sは、有限数の付着部位を備える。ここで、sは、付着部位の数であるとともに４乃至６４の整数である。更にD_sは、塩基対合の能力を備える特異なヌクレオチド配列を有する修飾オリゴヌクレオチド$L^a{}_{(+)}$に共有結合する。

上記実施形態のいずれかにおいて、ヌクレアーゼNucが、野生型の未変性ヌクレアーゼ、遺伝的に修飾されたヌクレアーゼ、化学的且つ遺伝的に修飾された生体起源のヌクレアーゼ及び人工的なヌクレアーゼからなる群から選択される。

【００２５】

化学式$[(T^b)_r$-P_m-H$]_i$-D_s- $L^b{}_{(+)}$で表される抗ウイルス性組成物が示される。この抗ウイルス性組成物は、上記の組成物を複数備える。この複数の組成物は多価分子スカホールドD_sに共有結合する。ここで、sは、付着部位の数であるとともに４乃至６４の整数である。更に、D_sは、塩基対合の能力を備える特異なヌクレオチド配列を有する修飾オリゴヌクレオチド$L^a{}_{(+)}$に共有結合する。

【００２６】

本発明の一実施形態において、化学式$\{[(Nuc^a)_q$ - P_n-H$]_k$-D_s- $L^a{}_{(+)}\}_j$-$[L^a{}_{(-)}]_j$-D_c-$[L^b{}_{(-)}]_f$-$\{[$ $L^b{}_{(+)}$-D_s - $[$H- P_n -$(T^b)_q]\}_f$で表される抗ウイルス性組成物が示される。ここで、j及びfは、各成分の量に関連するとともに１乃至８の整数である。各組成物は、修飾オリゴヌクレオチド$L^a{}_{(-)}$又は$L^b{}_{(-)}$に接続し、これら修飾オリゴヌクレオチド$L^a{}_{(-)}$又は$L^b{}_{(-)}$は、塩基対合並びにこれらに相補的に対応するオリゴヌクレオチド$L^a{}_{(+)}$又は$L^b{}_{(+)}$に混成することの能力を備える特異なヌクレオチド配列を備える。更に、$L^a{}_{(-)}$及び$L^b{}_{(-)}$は、有限数の付着部位を備える多価分子スカホールドD_cに共有結合する。ここで、cは、D_cの付着部位の数であるとともに４乃至６４の整数である。

【００２７】

上記の実施形態のいずれかにおいて、上述のポリマーが、PEG[ポリ(エチレングリコール)]、PEG-PLA(ポリ乳酸)、PEG-PLGA(ポリ乳酸グリコール酸)及びPEG-PLLA(ポリＬ乳酸)、HPMA[N-(2-ヒドロキシプロピル)メタアクリルアミド]コポリマ及びPEI[ポリ(エチレンイミン)]からなる群から選択される。このポリマーは、直線状、分岐状、叉状或いは星型形状の構造を備える。

【００２８】

本明細書に示される抗ウイルス性組成物は、少なくとも１つの加水分解可能な架橋剤を備えることができる。

【００２９】

関連する実施形態において、多価分子スカホールドD_c又はD_sは、デンドリマーである。例えば、このデンドリマーは、ポリ（アミドアミン）(PAMAM)、PAMAM(エチレンジアミン-EDA)及びポリ（リジン）デンドリマーからなる群から選択される。

さまざまな実施形態において、相補的なオリゴヌクレオチド$L^{a,b}{}_{(+)}$及び$L^{a,b}{}_{(-)}$それぞれが、Locked Nucleic Acids (LNA)（登録商標）、架橋化核酸（BNA）、ペプチド核酸(PNA)、ビスペプチド核酸（bis-PNA）、ヒドロキシプロリン・ペプチド核酸（hypNA）、セリン・ペプチド核酸（SerNA）、ヘアピン・ポリアミド、モルホリノ・オリゴ、ホスホロチオエート（PS）オリゴ及びピロリジン－アミド・オリゴヌクレオチドミミック(POM)である。

本明細書においては総じて、各オリゴヌクレオチド$L^{a}{}_{(-)}$及び$L^{b}{}_{(-)}$が若しくはそれぞれの相補的に対応するオリゴヌクレオチド$L^{a}{}_{(+)}$又は$L^{b}{}_{(+)}$が、特異なヌクレオチド配列（即ち、このヌクレオチド配列は、治療を受ける被験者から発見されないものである）を備える。さらに、このヌクレオチド配列は、二官能性（bi-functional）化学試薬に結合し、この化学試薬は、混成されたオリゴヌクレオチドの間に、共有結合を形成する。この二官能性化学試薬は、不活発な化学基を備えることもできる。この化学基は、混成されたオリゴヌクレオチドの間の共有結合に対して活性化する。この不活発な化学基は、芳香族のβ-クロロエチル・アルキル化した基を備え、この芳香族のβ-クロロエチル・アルキル化した基が、隣接するホルミル残基により抑制され、水素化ホウ素ナトリウムを用いてホルミル残基を低減している間に、芳香族のβ-クロロエチル・アルキル化した基が化学的に活性化し、混成されたオリゴヌクレオチドの間の共有結合が形成される。

ある実施形態においては、不活発な化学基が、光能動的な架橋剤である。この架橋剤は、アジド、ソラレン又はポルフィリンからなる群から選択される。

関連する実施形態において、不活発なアジド架橋剤、ソラレン架橋剤又はポルフィリン架橋剤は、更に、光活性化し、混成されたオリゴヌクレオチド間の共有結合を形成する。

【００３０】

ある実施形態において、標的リガンドT^{b}は、ウイルス核酸に対するヌクレオチド配列特異的な結合親和力を有するオリゴマーの群から選択され、この群は、ペプチド核酸（PNA）、ビスペプチド核酸（bis-PNA）、ヒドロキシプロリン・ペプチド核酸（hypNA）、セリン・ペプチド核酸（SerNA）、Locked Nucleic Acids (LNA)（登録商標）、架橋化核酸（BNA）、ヘアピン・ポリアミド、モルホリノ・オリゴ、ホスホロチオエート（PS）オリゴ及びピロリジン－アミド・オリゴヌクレオチドミミック(POM)及びジンクフィンガーの配列を備えるオリゴペプチドからなる。標的リガンドT^{b}は、配列特異的な核酸結合タンパク質の群から形成されてもよい。この核酸結合タンパク質は、設計されたジンクフィンガタンパク質（ZFP）及び高アルギニンペプチドからなる。

他の実施形態においては、標的リガンドT^{b}は、膜透過型のオリゴペプチド若しくはポリペプチドである。この膜透過型のペプチドは、塩基性ポリ(Arg)及びポリ(Lys)ペプチド、アルギニン及びリジン残基の非天然型類似体を含有する塩基性ポリ(Arg)及びポリ(Lys)ペプチド、遺伝子由来の高Arg(R)/Lys(K)ペプチドからなる群から選択される。塩基性ポリ(Arg)ペプチドは、６乃至１０のArg残基を含有する。

上記した実施形態において、高Arg(R)/Lys(K)ペプチドは、YGRKKRPQRRR(HIV TAT_{47-57}; SEQ ID NO: 17)、RQIKIWFQNRRMKWKK (ショウジョウバエ・アンテナペディア(ANTp16); SEQ ID NO 18)、RRWRRWWRRWWRRWRR(W/R; SEQ ID NO 19)、CWK_{18}(AlkCWK_{18}; SEQ ID NO:20)、K_{18}WCCWK_{18}(Di-CWK_{18}; SEQ ID NO:21)、WTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL(トランスポータン; SEQ ID NO 22)、GLFEALEELWEAK(DipaLytic; SEQ ID NO:23)、K_{16}GGCRGDMFGCAK_{16}RGD(K_{16}RGD; SEQ ID NO: 24)、K_{16}GGCMFGCGG(P1; SEQ ID NO:25)、K_{16}ICRRARGDNPDDRCT (P2; SEQ ID NO: 26)、KKWKMRRNQFWVKVQRbAK(B)bA (P3; SEQ ID NO 27)、VAYISRGGVSTYYSDTVKGRFTRQKYNKRA (P3a; SEQ ID NO: 28)、IGRIDPANGKTKYAPKFQDKATRSNYYGNSPS (P9.3; SEQ ID NO:29)、KETWWETWWTEWSQPKKKRKV(Pep-1; SEQ ID NO: 30)、PLAEIDGIELTY (Plae; SEQ ID NO:31)、K_{16}GGPLAEIDGIELGA (Kplae; SEQ ID NO:32)、K_{16}GGPLAEIDGIELCA (cKplae; SEQ ID NO: 33)、GALFLGFLGGAAGSTMGAWSQPKSKRKV (MGP; SEQ ID NO 34)、WEAK$(LAKA)_2$LAKH$(LAKA)_2$LKAC (HA2; SEQ ID NO: 35)、$(LARL)_6NHCH_3$ (LARL4_6; SEQ ID NO 36)、KLLKLLLKLWLLKLLL(Hel-11-7; SEQ ID NO 37)、$(KKKK)_2$GGC (KK; SEQ ID NO: 38)、$(KWKK)_2$GCC (KWK; SEQ ID NO: 39)、$(RWRR)_2$GGC (RWR; SEQ ID NO: 40)、PKKKRKV (SV40 NLS7; SEQ ID NO 4

1)、PEVKKKRKPEYP (NLS12; SEQ ID NO:42)、TPPKKKRKVEDP (NLS12a; SEQ ID NO:43)、GGGGPKKKRKVGG (SV40 NLS13; SEQ ID NO 44)、GGGFSTSLRARKA (AV NLS13; SEQ ID NO: 45)、CKKKKKKSEDEYPYVPN (AV RME NLS 17; SEQ ID NO: 46)、CKKKKKKKSEDEYPYVPNFSTSLRARKA (AV FP NLS28; SEQ ID NO 47)、LVRKKRKTEEESPLKDKDAKKSKQE (SV40 N1 NLS24; SEQ ID NO: 48)及び$K_9K_2K_4K_8GGK_5$(Loligmer; SEQ ID NO: 49)からなるペプチドの群から選択される。

他の実施形態において、膜透過型のポリペプチドは、HSV-1テグメントタンパク質VP22、核外輸送シグナル(NES)と融合したHSV-1テグメントタンパク質VP22r、大腸菌エンテロトキシンのＢ－サブユニットEtxB (H57S)、非毒化されたエキソトキシンA (ETA)及びこれらの類似体からなる。

関連する実施形態において、オリゴペプチドのタンパク質分解を低減若しくは避けるために、アミノ酸配列は、Ｄアミノ酸を備える。他の実施形態において、アミノ酸配列が全ての或いは略全てのＤアミノ酸を備えるものであってもよいことは明らかである。

【００３１】

標的リガンドT^bは、宿主細胞のＴ細胞（T-CSR）、即ち、ウイルス宿主細胞（T-CSR）により発現された宿主細胞表面レセプター（CSR）のリガンドからなる群から選択されるものであってもよい。例えば、ステロイド及び模倣剤或いはこれらの誘導体に対するレセプターの群から選択される。レセプターは、コルチゾール、コルチコステロン、グルココルチコイド・デキサメタゾンなどのステロイドに対するものであってもよい。

T-CSRは、ヘパラン硫酸レセプター結合ペプチドHPV31 L1 Gta: GYRARPKFKAGKR (SEQ ID NO:53)、HPV 45 L1 Ctb: RPAKRVRIRSKK (SEQ ID NO: 54)、hpv-16l1 Cta: SSTSTTAKRKKRKL (SEQ ID NO: 55)、HPV-16 L2 Ct: MLRKRRKRL (SEQ ID NO:56)、HPV-16 L2 Nt: MRHKRSAKRTKRA (SEQ ID NO:57)の群から選択されるウイルスの核カプシドタンパク質から由来するペプチドである。

他の実施形態において、T-CSRは、Tペプチド: ASTTTNYT (SEQ ID NO:1)及びD-Ala-T-ペプチド-アミド(DAPTA)からなるウイルスの外膜タンパク質由来の合成ペプチドからなる群から選択される。

関連する実施形態において、T-CSRは、葉酸誘導体である。

関連する実施形態において、T-CSRは、更に、リガンド宿主レセプターを備える。このリガンド宿主レセプターは、単糖類：Ｄ－マンノース、Ｄ－グルコース、Ｌ－ガラクトース、Ｌ－フコース（6-デオキシガラクトース）、Ｎ－アセチルグルコサミン、Ｎ－アセチルガラクトサミン、Ｎ－アセチルノイラミン酸（シアル酸）及びＮ－アセチルムラミン酸、Ｄ－マンノース－６－リン酸塩のような炭素６部位を占めるＬ－フコース及びＤ－マンノースの誘導体、Ｌ－フコシル－ラクトース、Ｄ－マンニトール、マンナン及びこれらの類似体の群から選択される。

【００３２】

ある実施形態において、標的リガンドT^bが、CSR誘導体であり、このCSR誘導体が、ウイルス感染した細胞のメンブレン上に発現したウイルスの糖タンパク質に対する結合親和力を備える。例えば、CSR誘導体は、CD4又はCD8などのＴ細胞レセプターである。

更に、ある実施形態においては、標的リガンドT^bは、プレニル化標的システインの阻害物質であり、このプレニル化標的システインが、ウイルス蛋白質のＣ末端近傍に$CX_1X_2X_3$を含む。即ち、プレニル化阻害物質である。プレニル化阻害物質は、更に、偽ペプチドを備えることもできる。

【００３３】

関連する実施形態において、これらの組成物のいずれかは、更に、薬剤として使用可能な緩衝剤を更に備えることができる。上記何れかの或いは上記の複数の組成物を一回当たり一定量で投与するキットも本明細書で示され、必要に応じて、使用に関する説明も示される。

【００３４】

本発明の他の実施形態として、本明細書中には、少なくとも１つのウイルス性因子との感染により引き起こされる被験者内のウイルス性疾患を予防及び治療する方法が示される

。

該方法は、ヌクレアーゼの組み合わせを投与する段階を備える。そして、これらのヌクレアーゼは、ウイルス核酸の複製の遺伝的若しくは中間的形態を標的とする。一本鎖ＤＮＡウイルスの複製は、一本鎖ＤＮＡ、二本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＲＮＡ（mRNA）の出現により生ずる。したがって、特定のメカニズム或いは理論に制限されることなしに、ウイルス核酸に適当な形態を特に分解するように標的化された異なるヌクレアーゼの組み合わせは、本発明に係る方法の抗ウイルス作用を増大させる。同様に、二本鎖ＤＮＡウイルスの複製は、二本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＲＮＡの出現により生ずる。適切なヌクレアーゼの組み合わせは、抗ウイルス作用を生じせしめる。一本鎖ＲＮＡウイルスの複製は、二本鎖ＲＮＡと一本鎖ＲＮＡの合成により生ずる。適切なヌクレアーゼの組み合わせは、相乗作用的な抗ウイルス作用を生じせしめる。逆転写酵素を持つＲＮＡウイルスは、ハイブリッドＲＮＡ－ＤＮＡ分子、一本鎖ＲＮＡ及び二本鎖ＲＮＡの中間形態を生み出す。リボヌクレアーゼＨ、一本鎖ＤＮＡを分解するデオキシリボヌクレアーゼ、一本鎖ＲＮＡ及び二本鎖ＲＮＡを分解するリボヌクレアーゼの組み合わせは、ヌクレアーゼの抗ウイルス作用を増大させる。

【００３５】

本発明の他の実施形態において、野生型出芽ウイルス、自然に発生する突然変異ウイルス及び抗ウイルス療法の過程で発生する突然変異ウイルスからなる群から選択される少なくとも１つのウイルス性因子との感染により引き起こされる被験者内のウイルス性疾患を予防及び治療する方法が示される。この方法は、ヌクレアーゼを投与する段階を備える。ヌクレアーゼは、野生型ウシ膵臓デオキシリボヌクレアーゼＩ若しくは野生型ウシ膵臓リボヌクレアーゼＡでないことを条件として、ヌクレアーゼが、ウイルス性因子のビリオン内で発見されるようなウイルス核酸の遺伝子形態に対して優先的に作用する加水分解活性を備えるヌクレアーゼの群から選択される。

【００３６】

本発明の他の実施形態において、野生型出芽ウイルス、自然に発生する突然変異ウイルス及び抗ウイルス療法の過程で発生する突然変異ウイルスからなる群から選択される少なくとも１つのウイルス性因子との感染により引き起こされる被験者内のウイルス性疾患を予防及び治療する方法が示される。この方法は、複数のヌクレアーゼ若しくはヌクレアーゼ由来の抗ウイルス性組成物を投与する段階を備える。少なくとも２つのヌクレアーゼ若しくはヌクレアーゼ由来の抗ウイルス性組成物は、ウイルス性病原体のビリオン内で発見されるようなゲノム形態のウイルス核酸と、ウイルスのゲノム核酸の複製中に生じる中間形態の核酸に対して優先的に作用する加水分解活性を備える酵素である。

【００３７】

本発明の他の実施形態において、野生型出芽ウイルス、自然に発生する突然変異ウイルス及び抗ウイルス療法の過程で発生する突然変異ウイルスからなる群から選択される少なくとも１つのウイルス性因子との感染により引き起こされる被験者内のウイルス性疾患を予防及び治療する方法が示される。この方法は、少なくとも１つの抗ウイルスヌクレアーゼ若しくはヌクレアーゼ由来の抗ウイルス性組成物を投与する段階を備える。ヌクレアーゼは、ウイルス性因子のライフサイクル内で発見されるようなウイルス核酸の少なくとも１つの複製中間体の形態に対して優先的に作用する加水分解活性を備える酵素である。

【００３８】

本発明の他の実施形態において、被験者のウイルス性疾患を治療する方法が示される。対象となる被験者は、ウイルス感染しており、このウイルスは、抗ウイルス性治療薬剤に対して増大した耐性を備える。薬剤は、一般的に、本発明に係る治療に用いられる方法により投与されるヌクレアーゼよりも低い分子量を有する化学療法薬である。薬剤に対して耐性を有するウイルスは、ヌクレアーゼの抗ウイルス性活性に影響を受けやすい。なぜなら、ヌクレアーゼは、薬剤耐性ウイルス突然変異体内のヌクレオチドの配列内の既存或いは潜在的な変質を生じさせることなしに、ウイルス核酸を分解するからである。このため、ヌクレアーゼに対する耐性が増大する可能性は極めて低く、或いは、ヌクレアーゼに対

する耐性の増大はほとんど生じえず、ウイルスの薬剤耐性突然変異体は本明細書中で示されるヌクレアーゼの抗ウイルス活性に影響を受けやすいものとなる。

【００３９】

本発明の他の実施形態において、被験者のウイルス性疾患を治療するとともに治療のため投与されるヌクレアーゼ以外の抗ウイルス治療剤に対するウイルス耐性の増大を防止する方法が示される。この方法は、少なくとも１つのヌクレアーゼ又はヌクレアーゼ由来の組成物とともに抗ウイルス性薬剤を投与する段階を備える。

この実施形態に関連する実施形態において、抗ウイルス性治療剤は、ウイルス侵入阻害剤、ウイルス集合阻害剤、ウイルスＤＮＡ及びＲＮＡポリメラーゼ阻害剤、ウイルス逆転写酵素阻害剤、ウイルスプロテアーゼ阻害剤、ウイルスインテグラーゼ阻害剤及びウイルス排出の阻害剤からなる抗ウイルス性組成物の群から選択される少なくとも１つの組成物である。

【００４０】

本発明の他の実施形態において、ウイルス感染が要因となって生じた被験者の非ウイルス性疾患を予防並びに治療する方法が示される。この方法は、少なくとも１つの抗ウイルス性ヌクレアーゼ又は抗ウイルス性ヌクレアーゼ由来の組成物と組み合わせて非ウイルス性疾患に対抗する治療薬を投与する段階を備える。

【００４１】

上記の方法に関連する実施形態において、疾患は、複数のウイルス性因子により引き起こされる。

さまざまな実施形態において、抗ウイルス性ヌクレアーゼは、人、動物、バクテリア、植物及び人工由来の野生型ヌクレアーゼ、人、動物、バクテリア、植物及び人工由来の野生型ヌクレアーゼの遺伝子工学的に作り出された一般若しくは特殊変異体及び人、動物、バクテリア、植物及び人工由来の野生型ヌクレアーゼの化学的及び遺伝的に修飾された一般若しくは特殊変異体からなる群から選択される。

更に、さまざまな実施形態において、ウイルス性因子は、グループＩ及びＩＩの二本鎖ＤＮＡウイルス若しくは一本鎖ＤＮＡウイルスそれぞれであり、抗ウイルス性ヌクレアーゼが、グループＩの二本鎖ＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＩの一本鎖ＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＶの一本鎖ＲＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＶＩの非特異的ヌクレアーゼ及びグループＶＩＩの人工的ヌクレアーゼからなる群から選択される。

更に、さまざまな実施形態において、ウイルス性因子がそれぞれグループＩＩＩ、ＩＶ及びＶの二本鎖ＲＮＡ、一本鎖（＋）ＲＮＡ若しくは一本鎖（－）ＲＮＡウイルスであり、ヌクレアーゼは、グループＩの二本鎖ＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＩの一本鎖ＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＩＩの二本鎖ＲＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＶの一本鎖ＲＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＶＩの非特異的ヌクレアーゼ及びグループＶＩＩの人工的ヌクレアーゼからなる群から選択される。

更に、さまざまな実施形態において、ウイルス性因子が、グループＩＶの逆転写酵素を持つs/s(+)RNAウイルスであり、ヌクレアーゼが、グループＩの二本鎖ＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＩの一本鎖ＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＶの一本鎖ＲＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＶＩの非特異的ヌクレアーゼ及びグループＶＩＩの人工的ヌクレアーゼからなる群から選択される。

更に、さまざまな実施形態において、ウイルス性因子が、グループＶＩＩの二本鎖ＤＮＡ逆転写酵素（ＲＴ）ウイルス（dsDNA RT viruses）であり、ヌクレアーゼが、グループＩの二本鎖ＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＩの一本鎖ＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＶの二本鎖ＲＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＶの一本鎖ＲＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＶのハイブリッド特異的ヌクレアーゼ、グループＶＩの非特異的ヌクレアーゼ及びグループＶＩＩの人工的ヌクレアーゼからなる群から選択される。

更に、さまざまな実施形態において、ウイルス性因子が、グループＩの二本鎖ＤＮＡウイルス、グループＩＩの一本鎖ＤＮＡウイルス、グループＶＩのss(+)RNA逆転写酵素及びグループＶＩＩの二本鎖ＤＮＡ逆転写酵素ウイルスからなる群から選択される複数のウイ

ルスであり、ヌクレアーゼが、グループＩの二本鎖ＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＩの一本鎖ＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＶの一本鎖ＲＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＶのハイブリッド特異的ヌクレアーゼ、グループＶＩの非特異的ヌクレアーゼ及びグループＶＩＩの人工的ヌクレアーゼから選択される。

更に、さまざまな実施形態において、ウイルス性因子が、グループＩＩＩの二本鎖ＲＮＡ、グループＩＶのss(+)RNA、グループＶのss(-)RNAウイルス、グループＶＩのss(+)RNA逆転写酵素及びグループＶＩＩの二本鎖ＤＮＡ逆転写酵素ウイルスから選択され、ヌクレアーゼが、グループＩの二本鎖ＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＩの一本鎖ＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＩＩの二本鎖ＲＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＶの一本鎖ＲＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＶのハイブリッド特異的ヌクレアーゼ、グループＶＩの非特異的ヌクレアーゼ及びグループＶＩＩの人工的ヌクレアーゼからなる群から選択される。

【００４２】

上記の組成物のいずれかに使用されるキットが本明細書中に示される。本発明の組成物に追加して示された関連する実施形態において、このキットは、容器を備え、使用のための説明書を有する。組成物は、薬剤に使用可能な緩衝剤、担体或いは塩とともに用いられてもよく、１回当たりに一定量の組成物が提供される形態を採用することもできる。

【発明を実施するための最良の形態】

【００４３】

上記の或いは他の関連する問題点に関しては、本発明の様々な実施形態を通じて説明される。本発明の一部は、ウイルス性疾患の予防及び治療に対するコンビナトリアル手法に関連し、この方法は、ウイルス複製サイクルの過程において生ずるウイルス核酸の多数の中間形態を考慮したものであり、ヌクレアーゼを主体とした抗ウイルス性組成物の選択された組み合わせを投与することによりなされる。このヌクレアーゼを主体とした抗ウイルス性組成物は、複数のウイルス核酸に対抗するものである。

本発明は、抗ウイルス性組成物にも関連する。この抗ウイルス性組成物は、化学的且つ遺伝的に修飾された様々なヌクレアーゼに由来する。この修飾されたヌクレアーゼは、ウイルス核酸の異なる形態を標的とし、生理学的状態、延長された半減期、高い細胞吸収、低い免疫原性、内因性プロテアーゼによる細胞内阻害剤及び細胞内分解に対する耐性の下、向上した加水分解活性により特徴付けられる。

【００４４】

本発明の一実施形態は、抗ウイルス性組成物に関する。この抗ウイルス性組成物は、人間、細菌、植物及び人工的な由来物（例えば、半合成ヌクレアーゼ及び合成ヌクレアーゼなど）の様々な種類のヌクレアーゼから得られる。これらヌクレアーゼは、ウイルスＤＮＡ及び／又はＲＮＡの形態に対して加水分解活性を発揮する。本明細書中で示される抗ウイルス性ヌクレアーゼは、野生型の未変性のヌクレアーゼ及び組み換え型のヌクレアーゼ、化学的／遺伝的に増強されたヌクレアーゼ、半合成ヌクレアーゼ及び合成ヌクレアーゼを備える。これらヌクレアーゼは、ウイルス複製サイクルの過程で生ずるウイルス核酸の特定の形態に対して加水分解活性を発揮する。

【００４５】

本発明の技術的範囲において、抗ウイルス性ヌクレアーゼが、７つの異なるグループに分けられる。この分類は、ヌクレアーゼの好適な基質ウイルス核酸の構造にしたがってなされる。ウイルスは、バルチモアにより提案された分類にしたがって分けられ、ウイルス核酸の構造及びウイルスの複製の異なるパターンにしたがって、７つの基本的に異なるグループとされる。

【００４６】

本明細書において示される７つのヌクレアーゼのグループが、以下のように分類される。

（１）二本鎖ウイルスＤＮＡ（dsDNA）に対して優先的に作用する加水分解活性を備えるヌクレアーゼ。このヌクレアーゼは、デオキシヌクレアーゼＩの仲間であり、この仲間

には、ヒトデオキシヌクレアーゼＩ及びウシデオキシヌクレアーゼＡ、デオキシヌクレアーゼα、β、γなど及びこれらの化学的／遺伝的に増強された変異体が含まれる。

（２）一本鎖ウイルスＤＮＡ（ssDNA）に対して優先的に作用する加水分解活性を備えるヌクレアーゼ。例えば、哺乳類のエンドヌクレアーゼＧ（endoG）、Basidiobolus haptosporusからの細胞外菌性ヌクレアーゼBh1、マング・ビーン・ヌクレアーゼ及びこれらの化学的／遺伝的に増強された変異体である。

（３）一本鎖ウイルスＲＮＡ（ssRNA）に対する好適な加水分解活性を備えるヌクレアーゼ。例えば、野生型リボヌクレアーゼＡ様ヌクレアーゼ及びこれらの化学的／遺伝的に増強された変異体である。

（４）ＲＮＡ－ＤＮＡハイブリッドに対して優先的に作用する加水分解活性を備えるヌクレアーゼ。例えば、野生型リボヌクレアーゼＨ様ヌクレアーゼ及びこれらの化学的／遺伝的に増強された変異体である。

（６）核酸の全ての形態に対して加水分解活性を有するヌクレアーゼ。これには、例えば、Serratia marcescensからのベンゾナーゼ（登録商標）、Cunninghamella echinulataからのヌクレアーゼＣＩ及びこれらの化学的／遺伝的に増強された変異体が含まれる。

１若しくはそれ以上の形態のウイルス核酸に対して、優先的に作用する加水分解活性が予め設計されてなる人工的ヌクレアーゼ。このヌクレアーゼは必然的に上記の６つの抗ウイルス性ヌクレアーゼのグループのいずれに属することができる。人工的ヌクレアーゼは、更に、ペプチド及び偽ペプチドを含有する生理学的ヌクレアーゼとしても分類することができる。このペプチド及び偽ペプチドは、核酸分解活性を発揮する。この核酸分解活性は、核酸分解ジペプチド・核酸分解トリペプチドにより実証される。この核酸分解ジペプチド・核酸分解トリペプチドは、例えば、Ser-His,Ser-His-Asp或いはセリウムCe (IV)の四価イオンなどにより生ずる金属イオン複合体の触媒活性に基づく化学的ヌクレアーゼである。セリウムCe (IV)の四価イオンは、二本鎖ＤＮＡ加水分解に対する最も有効な金属イオンのうちの１つである。

【００４７】

本発明の一部は、未変性ヌクレアーゼを化学的／遺伝的に増強した変異体に関する。この変異体は、非天然型アミノ酸残基を備え、この非天然型アミノ酸残基は、選択された位置において天然アミノ酸残基と置換される。このような化学的／遺伝的に増強された未変性ヌクレアーゼの変異体は、増大した核酸分解活性及び／又は内因性プロテアーゼに対する耐性及び／又はヌクレアーゼ阻害物質により特徴付けられる。ここで、増強された未変性ヌクレアーゼの変異体は、生理学的状態における最小の細胞毒性における最大の加水分解活性に基づいて選択される。

【００４８】

別の実施形態において、化学的／遺伝的に修飾された変異体が示され、この変異体は、ウイルス核酸の特定の形態に対して一層高い加水分解活性を備える。この変異体は、基質若しくは阻害物質のヌクレアーゼ結合ドメイン内に位置する１若しくはそれ以上の中性アミノ酸或いは負の電荷を付加された自然に生ずるアミノ酸或いは「天然型」アミノ酸の置換により得られる。この置換は、１若しくはそれ以上の非天然的に生ずるアミノ酸或いは「非天然型」アミノ酸或いは正の電荷を多数付加された側鎖若しくは大きな中性の側鎖若しくはケトン基を運搬する置換されたアミノ酸を用いるものである。

ケトン基は、その後に生ずる小さな分子量の多価化学成分或いは立体障害成分（例えば大きな分子量の高分子担体）の付着のために導入され、これにより、ヌクレアーゼが、タンパク質分解に対する増大した抵抗性、増大した半減期及び細胞吸収を備えることとなる。

【００４９】

関連する実施形態において、本発明は、抗ウイルス性組成物を提供する。この抗ウイルス性組成物は、グループ（グループＩのdsDNA特異的ヌクレアーゼ及びグループＩＩＩのssRNA特異的ヌクレアーゼ）内の化学的／遺伝的に増強されたものである。

グループＩのdsDNA特異的ヌクレアーゼは、高い加水分解活性及びアクチン耐性を備え

るヒトデオキシリボヌクレアーゼの特殊突然変異体により例示される。このヒトデオキシリボヌクレアーゼの特殊突然変異体は、以下の置換により得られる。

５つの追加的正電荷（+5）を有する置換物Q11RU/E13KU$^{(2+)}$/N74KU$^{(2+)}$/A114FU$^{(keto)}$と置換される。ここで、RUは非天然型ホモアルギニンであり、KU$^{(2+)}$は、２つの正の電荷が付加された側鎖アミノ基を備える非天然型リジンであり、FU$^{(keto)}$は、ケトン基を搬送するp－アセチル－Ｌ－フェニルアラニン残基である。

グループＩＩＩのssRNA特異的ヌクレアーゼは、リボヌクレアーゼ阻害物質（ＲＩ）により例示される。このリボヌクレアーゼは、置換物K1FU$^{(keto)}$/Q11A/N71A/E111Aにより得られるヒトリボヌクレアーゼＩの特殊変異体、切り取られたＳペプチド（アミノ酸配列における位置１乃至１５を備える断片）からなるヒトリボヌクレアーゼＳ（これは置換物K1FU$^{(keto)}$/Q11Aにより得られる）、切り取られたＳプロテイン（残基２１－１２４のアミノ酸残基断片）（これは置換物N71A/G89FU$^{(keto)}$/E111Aにより得られる）の特殊変異体であり耐性を備えるとともに非毒性である。ここで、FU$^{(keto)}$は、ケトン基を有するp－アセチル－Ｌ－フェニルアラニン残基である。

【００５０】

更に他の実施形態において、本発明において開示される抗ウイルス性組成物は、多価の「シェル・コア」デンドリマー複合体を備える。「シェル」デンドリマーは、多数の非機能的抗ウイルス性ヌクレアーゼポリマー複合体若しくは標的リガンドを運搬する。１若しくはそれ以上のシェル・デンドリマーが、コア・デンドリマーと、ワトソン・クリック結合を通じて結合する。ワトソン・クリック結合は、デンドリマーと共有結合する相補的なオリゴヌクレオチドの対の間に生ずる。シェル・デンドリマーは化学的に修飾され、相補的な対間に後に生ずる共有結合の形成を可能とする。

【００５１】

更なる実施形態において、抗ウイルス性組成物は、未変性の抗ウイルス性ヌクレアーゼ及びヘテロ型の二官能性ポリマーと共有結合した化学的／遺伝的に増強された抗ウイルス性ヌクレアーゼを備える。このヘテロ型の二官能性ポリマーは、直接的に或いはデンドリマー又は星形ポリマーといった多価分子スカホールドを介して、様々な作用をもたらす多数の標的リガンドと結合する。

高分子担体により搬送される標的リガンドは、（ａ）ウイルス性核細胞の選択された部位に配列特異的な親和性を備えるオリゴマーを有する。ウイルス性核細胞として、ペプチド核酸（PNA: peptide nucleic acid）、モルホリノ及びピロリジン・アミド・オリゴヌクレオチドミミック（pyrrolidine-amid oligonucleotid mimic）オリゴヌクレオチド、ヘアピン・ポリアミド、ジンクフィンガーなどを挙げることができる。

更に、高分子担体により搬送される標的リガンドは、（ｂ）膜透過型のペプチド（MPP: membrane permeating peptide）を備える。膜透過型のペプチドには、ポリArg/Lysペプチド、HIV-TAT由来の高Arg含有ペプチド、アンテナペディア、非毒化されたエキソトキシンＡ(extoxin A) (ETA)などや核局在シグナル(NLS: nuclear localization signal)／核外輸送シグナル（NES: nuclear export signal）が含まれる。

更に、高分子担体により搬送される標的リガンドは、（ｃ）細胞表面レセプター認識リガンド（T-CSR）を備える。この細胞表面レセプター認識リガンド（T-CSR）は、ウイルスの主要宿主細胞の細胞表面レセプター（CSR: cell surface receptor）に対する高い結合親和性を発揮する。この宿主細胞として、８アミノ酸Ｔペプチド（１文字アミノ酸コードではASTTNYT：SEQ ID NO:1）及びＨＩＶ－Ｉの外膜タンパク質gp120由来の他の短い合成タンパク質及び他のウイルス蛋白質由来の他の短い合成タンパク質を挙げることができる。また、この宿主細胞は、HIV gp120断片（残基413-434）を備える部分的なアミノ酸配列相同性を保有し、CD4レセプターを含有する主要宿主T細胞を標的化する。

更に、高分子担体により搬送される標的リガンドは、（ｄ）CD4などの細胞表面レセプターを備える。この細胞表面レセプターは、リガンドとして用いられ、ウイルス感染細胞のメンブレン上に発現したgp120といった糖タンパク質を標的化する。

【００５２】

更なる実施形態において、本発明は抗ウイルス性組成物を提供する。この抗ウイルス性組成物は、修飾されたリボヌクレアーゼＳを備える。この修飾リボヌクレアーゼＳは、略等しい分子量の２つの複合間に形成される非共有核酸分解複合体の形態である。この２つの複合体のうち第１の複合体は、11.5kDaのヒトＳタンパク質（21-124）であり、20kDaの標的高分子担体に共有結合する。第２の複合体は2kDaのヒトＳペプチド（1-15）であり、30kDaの標的高分子担体に共有結合する。各高分子担体は、膜透過型ペプチドArg(R)8及び標的ウイルス核酸の保護されたドメインに相補的なbis-PNAに共有結合する。

【００５３】

他の実施形態において、本発明は抗ウイルス性組成物を提供する。この抗ウイルス性組成物は、PEG-DNase-RNase Sを備え、略等しい分子量の２つの複合体の間に形成される非共有核酸分解複合体の形態である。この２つの複合体のうち第１の複合体は、11kDaのヒトＳプロテイン（21-124）であり、31kDaのヒトDNase I及び20kDaの標的高分子担体に共有結合する。第２の複合体は2kDaのヒトＳペプチド（1-15）であり、60kDaの標的高分子担体に共有結合する。各高分子担体は、膜透過型ペプチドArg(R)8及び標的ウイルスＤＮＡ又はＲＮＡの選択されたヌクレオチド配列に対して相補的なbis-PNAに共有結合する。

【００５４】

別の実施形態において、本発明は多機能性の抗ウイルス性組成物を提供する。この抗ウイルス性組成物は、ヌクレアーゼ及び高分子担体に共有結合する標的リガンドを備える。高分子担体は、多価デンドリマー及び「シェル」デンドリマー－「コア」デンドリマー複合体を備える。デンドリマーの末端基は化学的に修飾され、配列特異的オリゴヌクレオチドを備える。この配列特異的オリゴヌクレオチドは、混成作用を受け、後に相補的なオリゴヌクレオチドとともに共有結合を形成する。この相補的なオリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ及び標的リガンド及び／又は他の分岐型デンドリマーと結合する。２つの相補的な塩基対合したオリゴ・デオキシヌクレオチド又はポリ・デオキシヌクレオチドの共有結合は、倍ファンクショナル試薬を用いることによりなされる。この２つの試薬として、限定されるものではないが、異性作用的なポリアルキル化試薬（N,N,N'-トリ-(β-クロロエチル)-N'-(p-ホルミルフェニル)プロピレンジアミン-1,3）(N,N,N'-tri-(β-chloroethyl)-N'-(p-formylphenyl)propylene diamine-1,3)を例示することができる。この試薬は、オリゴ・デオキシヌクレオチド又はポリ・デオキシヌクレオチドのうち一方に、高い反応性を有する脂肪族のβ-クロロエチルアミノ基を通じて付着する。潜在的に活性を有する芳香族のアルキル化基の反応度は、隣接するホルミル残基により強く阻害される。水素化ホウ素ナトリウムを用いてホルミル残基を低減している間に、その活性化作用により、オリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドの塩基対合の後、この基は、必要に応じて、活性化する。

【００５５】

本発明の他の実施形態において、人間及び人間を除く動物、昆虫及び植物のウイルス性疾患に対する予防方法並びに治療方法が提供される。この本発明に係る方法は、ウイルス・グループ特異的「カクテル」を用いるものである。この「カクテル」には、ヌクレアーゼ由来の抗ウイルス性組成物が含まれる。このヌクレアーゼ由来の抗ウイルス性組成物には、本発明を制限するものではないが、本発明に係る抗ウイルス性組成物も含まれ、各抗ウイルス性「カクテル」は、標的ウイルスの複製サイクルの間に生ずるウイルス核酸の特定の中間複製形態に対して加水分解活性を備えるヌクレアーゼを含有する。

【００５６】

ある実施形態において、本発明は、ＤＮＡウイルスにより引き起こされるウイルス性疾患の予防及び治療方法を提供する。このＤＮＡウイルスは、グループＩのdsDNAウイルス(二本鎖ＤＮＡウイルス：double strands virus)及びグループＩＩのssDNAウイルス(一本鎖ＤＮＡウイルス：single strand virus)である。この方法では、グループＩのdsDNA特異的ヌクレアーゼ、グループＩＩのssDNA特異的ヌクレアーゼ、グループＩＶのssRNA特異的ヌクレアーゼ、グループＶＩの非特異的ヌクレアーゼ及びグループＶＩＩの人工的ヌクレアーゼ（これらは、本発明に係る「ヌクレアーゼの分類」に従う）から選択される抗ウ

イルス性ヌクレアーゼが用いられる。

【００５７】

他のもう１つの実施形態において、本発明は、ＲＮＡウイルスにより引き起こされるウイルス性疾患に対する予防及び治療方法を提供する。このＲＮＡウイルスには、グループＩＩＩのdsRNAウイルス、グループＩＶのss(+)RNAウイルス及びグループＶのss(-)RNAウイルスが含まれる。この方法は、グループＩＩＩのdsRNA特異的ヌクレアーゼ、グループＩＶのssRNA特異的ヌクレアーゼであってグループＩのdsDNA特異的ヌクレアーゼから選択されるヌクレアーゼが付加されたもの、グループＩＩのssDNA特異的ヌクレアーゼ、グループＶＩの非特異的ヌクレアーゼ及びグループＶＩＩの人工的ヌクレアーゼ（これらは、本発明に係る「ヌクレアーゼの分類」に従う）からなるヌクレアーゼの群から選択される抗ウイルス性ヌクレアーゼを用いるものである。

【００５８】

更に他のもう１つの実施形態においては、本発明は、グループＶＩのss(+)RNA RTウイルスにより引き起こされるウイルス性疾患の予防及び治療方法を提供する。この方法は、グループＩのdsDNA特異的ヌクレアーゼ、グループＩＩのssDNA特異的ヌクレアーゼ、グループＩＶのssRNA特異的ヌクレアーゼ、グループＶのRNA-DNAハイブリッド特異的ヌクレアーゼ、グループＶＩの非特異的ヌクレアーゼ及びグループＶＩＩの人工的ヌクレアーゼ（これらは、本発明に係る「ヌクレアーゼの分類」に従う）からなるヌクレアーゼの群から選択される抗ウイルス性ヌクレアーゼを用いるものである。

【００５９】

更に他のもう１つの実施形態において、本発明は、グループＶＩＩのdsDNA RTウイルスにより引き起こされるウイルス性疾患の予防及び治療方法を提供する。この方法は、グループＩのdsDNA特異的ヌクレアーゼ、グループＩＩのssDNA特異的ヌクレアーゼ、グループＩＩＩのdsRNA特異的ヌクレアーゼ、グループＩＶのssRNA特異的ヌクレアーゼ、グループＶのRNA-DNAハイブリッド特異的ヌクレアーゼ、グループＶＩの非特異的ヌクレアーゼ及びグループＶＩＩの人工的ヌクレアーゼ（これらは、本発明に係る「ヌクレアーゼの分類」に従う）からなるヌクレアーゼの群から選択される抗ウイルス性ヌクレアーゼを用いるものである。

【００６０】

別の実施形態において、本発明は、ヌクレアーゼ以外の抗ウイルス性治療薬に対するウイルス耐性の増大を防止する方法を提供する。この方法は、少なくとも１つのヌクレアーゼ若しくはヌクレアーゼ由来の組成物とともに抗ウイルス性治療薬を投与する段階を備える。治療のために投与される抗ウイルス性治療薬は、ウイルス侵入阻害剤、ウイルス集合阻害剤、ウイルスＤＮＡ及びＲＮＡポリメラーゼ阻害剤、ウイルス逆転写酵素阻害剤、ウイルスプロテアーゼ阻害剤、ウイルスインテグラーゼ阻害剤及びウイルス排出の阻害剤からなる抗ウイルス性化合物の群から選択される少なくとも１つの化合物である。

【００６１】

本発明は、ウイルス性疾患の予防及び治療のための抗ウイルス性治療用組成物並びにウイルス特異的方法を提供する。

ある実施形態において、抗ウイルス性組成物は、抗ウイルス性ヌクレアーゼに由来するものである。この抗ウイルス性ヌクレアーゼは、様々な高分子担体と共有結合する。抗ウイルス性ヌクレアーゼは、哺乳類、両生類、細菌及び植物からの由来物の野生型ヌクレアーゼ及び化学的及び／又は遺伝的に修飾されたヌクレアーゼ並びに１若しくはそれ以上の核酸の構造的形態に対する増強された加水分解活性を備える人工由来物のヌクレアーゼを備える。ヌクレアーゼは、化学的及び遺伝的に修飾され、生物学的利用可能性、低濃度のウイルス核酸に対する加水分解活性及び強力なヌクレアーゼ阻害物質に対する耐性が高められる。

標的化された多価高分子担体－ヌクレアーゼ複合体は、ウイルス核酸の特定の形態を標的化し、この特定の形態に対して最大限に加水分解性の分解をもたらすことにより、抗ウイルス作用を生じさせる。このウイルス核酸の特定の形態は、感染細胞内部でのウイルス

複製サイクルの過程で生ずるものである。この結果、ウイルス蛋白質の合成及びウイルス複製が遮断される。

標的化された高分子担体は高分子量の分子スカホールドを備える。この分子スカホールドは、本発明を限定するものではないが、親水性ポリマー、星形ポリマー、ブロック共重合体或いは様々な機能を有する標的リガンドと共有結合したデンドリマーを含む。

標的リガンドは、抗ウイルス性のヌクレアーゼ－ポリマー複合体を宿主細胞に向けるように作用する。これにより、リガンドは、細胞及び核酸の吸収力を高め、ウイルス核酸に対する配列特異的結合親和力を備えるものとなる。多価抗ウイルス性ヌクレアーゼ－高分子複合体は、感染細胞内部のウイルス核酸を標的化し、最大限に加水分解性の分解作用を発揮する。また、この多価抗ウイルス性ヌクレアーゼ－高分子複合体は、内因性プロテアーゼから保護するヌクレアーゼをもたらす。内因性プロテアーゼは、血漿及び細胞内部両方で観察可能である。この結果、多価抗ウイルス性ヌクレアーゼ－高分子複合体は、高い細胞吸収性、長い半減期、低減した免疫原性並びに低減した細胞毒性をもたらすこととなる。

【００６２】

本発明は、抗ウイルス性組成物の使用方法も提供する。この抗ウイルス性組成物は、野生型ヌクレアーゼ、化学的／遺伝的に増強されたヌクレアーゼ並びに高分子担体に共有結合するヌクレアーゼ由来の組成物である。本発明に係る使用方法は、ウイルスにより引き起こされるウイルス性疾患の予防及び治療のためのものである。ここで、ウイルスは、バルチモアによる分類にしたがって、７つのグループに分けられる。

より詳しくは、本発明に係る使用方法は、１若しくはそれ以上のウイルス核酸を標的化する段階を備える。この１若しくはそれ以上のウイルス核酸は、ウイルス感染細胞内部でのウイルス複製サイクルの過程で生じるものである。この方法においては、ネイキッドヌクレアーゼ（naked nuclease）及び１若しくはそれ以上のウイルス核酸の特定の形態に対して高い加水分解活性を発揮する様々なヌクレアーゼ－ポリマー複合体両方の特別に選択された組み合わせにより最大限に加水分解性の分解が引き起こされる。ウイルス核酸の特定の形態には、一本鎖、二本鎖、ハイブリッドや特定のウイルスの複製の過程で現れるウイルスＤＮＡ及びＲＮＡの他の形態が含まれる。

【００６３】

本発明は、ウイルスの複製の抑制に対する多くの標的化手法を備えるが、様々な種類のウイルス及びこれに関連するヌクレアーゼの特性が説明される。

【００６４】

（定義）

本明細書中において、「ヌクレアーゼ（nuclease）」及び「抗ウイルス性ヌクレアーゼ（antiviral nuclease）」との語は、少なくとも１つの形態のウイルス核酸（例えば、ＤＮＡ又はＲＮＡ）に対して加水分解活性を有する酵素のことをいう。

本発明の範囲内において、抗ウイルス性ヌクレアーゼには、野生型ヌクレアーゼ、野生型ヌクレアーゼの相同体、ヒト、動物、細菌、及び植物由来の化学的及び遺伝的に修飾されたヌクレアーゼ、ジペプチド／トリペプチド、核酸に対して加水分解活性を有する偽ペプチド、及びその他の人工ヌクレアーゼが含まれる。本発明の範囲内において、ヌクレアーゼには、野生型ヌクレアーゼ及び修飾されたヌクレアーゼの二量体、三量体、及びより高次のオリゴマーが含まれる。

【００６５】

「ヌクレアーゼ由来組成物」との語は、野生型又は化学的／遺伝的に修飾されたヌクレアーゼ、又は高分子担体と複合体を形成したヌクレアーゼをその成分の一つとして含む任意の組成物のことをいう。

【００６６】

「被験者（subject）」とは、ウイルス性因子により感染可能なヒト、及び任意の動物、実用的に重要な植物或いは微生物のことをいう。

【００６７】

「ウイルス性因子」とは、ウイルス、プロウイルス、ファージ、及びその他の任意のウイルス様微生物のことをいう。

【００６８】

核酸の「特定の形態」とは、ウイルス複製サイクル中に現れる直線状、環状又はスーパーコイル状の、或いは一本鎖又は二本鎖のＤＮＡ又はＲＮＡのことをいう。

【００６９】

「ウイルス核酸を標的とするヌクレアーゼ」との語は、ウイルス核酸の特定の形態に対してより優れた加水分解活性を有するとともに、標的となるウイルス核酸のヌクレオチド配列と結合する特別な能力を有するリガンドと、直接的に又は高分子担体を介して間接的に共有結合した1若しくはそれ以上のヌクレアーゼのことをいう。

【００７０】

「ヌクレアーゼ一般変異体（common mutant nuclease）」とは、少なくとも１つの一般的な又は天然型アミノ酸残基が、別の一般的な或いは天然型アミノ酸残基と置換されたヌクレアーゼ変異体のことをいう。「ヌクレアーゼ一般変異体」は、典型的には無作為の又は部位特異的の変異誘発により生成され、１若しくはそれ以上の天然型アミノ酸構成ブロックが置換されている。

【００７１】

「ヌクレアーゼ特殊変異体（uncommon mutant nuclease）」とは、少なくとも１つの天然型アミノ酸残基が、「特殊な（uncommon）」又は非天然型アミノ酸残基と置換されたヌクレアーゼ変異体のことを言う。２０の天然型Ｌ－アミノ酸残基の特徴が十分に解析されている。「特殊なアミノ酸残基」との語には、無制限に全ての非天然型アミノ酸（例えばβ－アミノ酸及びδ－アミノ酸など）、無制限に全てのＤ－アミノ酸（例えばＤ－セリン、Ｄ－アスパラギン酸、Ｎ－メチル－Ｄアスパラギン酸など）、天然には殆ど存在しないホルミルメチオニン（formyl-methionine）、セレノシステイン（selenocystein）が含まれる。Ｄ－アミノ酸は、細菌から哺乳類まで様々な生物体に微量に含まれる天然型アミノ酸であり（Yang, et al., FEBS letters 552(2-3): 95-98, 2003）、ホルミルメチオニン（RajBhandary, J. Bacteriol. 176, 547, 1994）とセレノシステイン（A. Bock, et al., Mol. Microbiol. 5, 515, 1991）は、特定の生物体における翻訳中にパンクチュエーション・シグナルに対する反応に用いられる。

【００７２】

「非天然型アミノ酸（non-natural amino acid）」との語は、天然型アミノ酸の類似体であって天然には生物中に存在しないアミノ酸のことをいう。これら類似体は、一価の若しくは多価の側鎖、分枝の側鎖、及びその他の方法で修飾された側鎖が得られるように化学的に修飾される。一般的な変異誘発方法は、２０の一般的なアミノ酸に限って使用できる。一方で多くの場合、プロテオーム（Krshenbaum et al., Chem.BiolChem. 3:235(2002); Doring et al. Science 292:501, 2001）を用いると、一般的なアミノ酸の構造に近い類似体を競合的に組み込むことが従来より可能である。非天然型アミノ酸を含むヌクレアーゼは、生合成技術及び半合成技術を用いて生産できる。このような合成技術として例えば、アンバーコドン抑制方法（amber codon suppression method）が挙げられる。非天然型アミノ酸との語には、化学的に修飾された側鎖基を有する天然型アミノ酸の誘導体が含まれるが、これには限定されない。化学的修飾された側鎖基としては、多価側鎖基、立体障害側鎖基、ケージ化側鎖基、及びその他の方法で化学的に修飾された側鎖基が挙げられる。

【００７３】

「ケトン修飾（keto-modified）」ヌクレアーゼとの語は、非天然型アミノ酸（例えばケト基を有するp－フェニル－アラニン及びｍ－フェニル－アラニン）を部位特異的に組み込むことにより得られるヌクレアーゼ特殊変異体のことをいう。ケトン基の独特な反応性により、ケトン修飾ヌクレアーゼは、ヒドラジド、ヒドロキシルアミン、又はセミカルバミド誘導体などの多様な薬剤により選択的に修飾可能となる。

【００７４】

「チオール修飾（thiol-modified）」ヌクレアーゼとの語は、チオール基を含む天然型アミノ酸又は非天然型アミノ酸のいずれかを部位特異的に組み込むことにより得られるヌクレアーゼ一般変異体及びヌクレアーゼ特殊変異体のことをいう。チオール基を含むアミノ酸としては例えば、システイン、セレノシステイン、及びその他の非天然のシステイン誘導体が挙げられる。

【００７５】

「ケトン－チオール修飾（keto-thiol-modified）」ヌクレアーゼとの語は、少なくとも２つの反応部分を部位特異的に置換することにより得られるヌクレアーゼ特殊変異体のことを言う。２つの部分とは、ｐ－フェニル－アラニン及びｍ－フェニル－アラニンなどのケトン基を含む非天然型アミノ酸と、システイン、セレノシステイン、及び非天然型システイン誘導体などのチオール基を有する天然型アミノ酸及び非天然型アミノ酸である。

【００７６】

「アルキル（alkyl）」鎖、「アリル（aryl）」鎖、「置換アルキル（substituted alkyl）」鎖、及び「置換アリル（substituted aryl）」鎖との語は、１，２－ジステアリル３－ｓｎ－グリセロホスファチジルエタノールアミン（1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidyl ethanolamine（DSPE））、DSPEのラウリル類似体、ミリストイル類似体、パルミトイル類似体、ステアロイル類似体、オレオイル類似体、及びリネオイル類似体、脂肪酸などの炭化水素及びリン脂質のことをいうが、これらには限定されない。

【００７７】

「一価の（singly-charged）」との語は、生理学的pHにおいて、正味電荷が＋１から－１であることをいう。一価の非天然型アミノ酸としては、ホモアルギニン、ホモリジン、ジアミノブタン酸（Diaminobutanoic acid （Dab））（Shakkottai, et al. J. Biol. Chem., Vol. 276, Issue 46, 43145-43151, November 16, 2001）などを例示できるがこれらには限定されない。

【００７８】

「多価の（multiply-charged）」との語は、生理学的pHにおいて、正味電荷が＋１より大きいこと及び－１より小さいことをいう。多価の非天然型アミノ酸としては＋１から＋３の正の電荷を有するリジン、－２の負の電荷を有するジアスパラギン酸などを例示できるがこれらには限定されない。

【００７９】

「抗ウイルス性複合体含有酵素（antiviral complex containing enzyme（ＡＣＥ））」との語は、少なくとも１つの標的リガンド或いは送達促進リガンドと共有結合された酵素、或いは少なくとも１つの高分子担体と共有結合された酵素、或いはこれらを任意に組合せたもの（例えばこれには限らないが、１若しくはそれ以上の標的リガンド又は送達促進リガンドを有する１若しくはそれ以上の多価の高分子担体）のことをいう。

【００８０】

「人工ヌクレアーゼ（artifical nuclease）」との語は、基質核酸に対する少なくとも１つの認識ドメインと、核酸のリン酸ジエステル結合の加水分解のための少なくとも１つの触媒ドメインを含む半合成分子スカホールド又は合成分子スカホールドを有するヌクレアーゼのことをいう。

この分子スカホールドは、ペプチド、ペプチドデンドリマー、偽ペプチド、ポリペプチド、その他の任意の生物学的ポリマー或いは合成ポリマー、又はこれらの組み合わせを有することができる。人工ヌクレアーゼの触媒ドメインは、生物学的なものであっても、或いは無機的化学的なものであってもよい。人工ヌクレアーゼのバックボーンとして用いられる合成ポリマーは、触媒成分として、複数の有機的又は無機的官能基を含むことができる（Suh,Acc.Chem.Res.36:562-570,2003）。無機的触媒ドメインとしては例えば、人工ヌクレアーゼの核酸認識ドメインと共有結合又は非共有結合されたランタニド・イオン又はそれらの複合体（Yamamoto et al. Nuc. Ac. Res., 31(15):4497-4502,2003;Welch et al., PNAS,100(7):3752-3730,2003）などの加水分解性金属を例示できる。核酸ベース触媒としては、ヒスタジンの側鎖イミダゾール基を例示できる。生理学的ｐＨにおいて、ヒスタジ

ンはプロトンの供与体又は受容体として働くことができる（Gray, Enzye Catalyzed Reactions, Van nostrand Reinhold, London, pp.264-271, 1971; Galburt, et al., Nat. Struct. Biolo, 6:1096-1099, 1999; Van der Woerd, et al., Structure 9:133-144, 2001）。いくつかの非天然型ヒスタジン誘導体は、ヒスタジンの立体因子と同一の又は類似の立体因子を有するが、酸性度と求核性に関しては異なる性質を有する。既知のヒスタジン誘導体としては、β－（１，２，３－トリアゾール－４－ｙｌ）－ＤＬ－アラニン（２）、β－（１，２，４－トリアゾール－３－ｙｌ）－ＤＬ－アラニン（３）、β－（１，２，３，４－トリアゾール－５－ｙｌ）－ＤＬ－アラニン（４）などを例示できる。これらの中には、生体内でタンパク質に効率的に組み込まれるものが含まれる（Ikeda, et al., Protein Engineering 16: 699-706, 2003）。

【００８１】

「化学的／遺伝的（chemically/genetically）」に修飾又は操作されたヌクレアーゼとの語は一般的に、遺伝的に修飾されたヌクレアーゼ一般変異体及びヌクレアーゼ特殊変異体、加水分解性、ヌクレアーゼ阻害剤とプロテアーゼに対する耐性、及び口腔内での生物学的利用能を高めるために更に化学的に修飾されたヌクレアーゼ誘導体のことをいう。本明細書中において抗ウイルス性組成物には、自然の（自然から単離された）又は組換え型のヌクレアーゼと野生型のヌクレアーゼが含まれるのに加えて、化学的／遺伝的に操作されたヌクレアーゼ、半合成及び合成ヌクレアーゼ、及び様々な標的リガンドを有するヌクレアーゼが含まれる。標的リガンドは、例えば多価の高分子担体と共有結合している。高分子担体は、ヌクレアーゼ・ベースの抗ウイルス性組成物の半減期を延ばし、プロテアーゼによる分解に対する抵抗性を向上させ、免疫原性及び毒性を低減する。標的指向化部分は、ヌクレアーゼ・ベース抗ウイルス性組成物に感染細胞を標的とさせるためのアドレスを提供するとともに、高い細胞吸収量及び核吸収量を提供し、またヌクレアーゼを、感染細胞の細胞質内又は核内に存在するウイルス特異的核酸と、それらの複製中間体に作用させる。

【００８２】

（ウイルスの分類）

ウイルスは、そのビリオン内に存在する核酸の形態により大まかに分類できる。近年の分類法では、ゲノム内容がウイルス複製方法に及ぼす影響が重視されている。「Virus Taxonomy」によると、ビリオン内の核酸の構造と基本的な複製パターンに基づいて、ウイルスは７つのグループに分類される。ウイルスは、David Baltimoreにより考案された方法（本明細書中においては「Baltimore分類法」という）（Virus Taxonomy, H.V. van regenmortel, et al. (Eds.), Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Academic Press, 1024 pp., 2000, San Diego, New York; Cann, Principles of Molecular Virology, Academic Press, 3rs Ed. 2001, App.2）に従って分類される。

【００８３】

（ＤＮＡウイルス）

多くのＤＮＡウイルスは、核内で複製し、細胞構造に依存して転写とタンパク質合成を行う。ポックスウイルスは例外的に、細胞質内で複製し、ウイルスＤＮＡ複製のために宿主細胞の酵素を用いる。ＤＮＡウイルスには、ｄｓＤＮＡウイルス及びｓｓＤＮＡウイルスが含まれる。

【００８４】

グループＩのｄｓＤＮＡウイルスとしては、アデノウイルス科の非エンベロープウイルス（例えばヒトアデノウイルスＣ）、パポーバウイルス科の非エンベロープウイルス（例えばポリオーマウイルス、パピローマウイルス）、ヘルペスウイルス科（例えばシンプレックスウイルス属、ワリセロウイルス属、サイトメガロウイルス属、ロゼオラウイルス属、リンホクリプトウイルス属／エプスタイン－バールウイルス属）のエンベロープウイルス、ポックスウイルス科のエンベロープウイルス（例えば天然痘を引き起こす痘瘡ウイルス、哺乳類と鳥類に感染するワクシニアウイルス）を例示できる。このグループには更に

、昆虫に感染するバキュロウイルス科、ポリドナウイルス科、及びフィコドナウイルス科のウイルス、及びその他のウイルスが含まれる。

【００８５】

ｄｓＤＮＡウイルスは単成分の直鎖状又は環状ゲノムを有する。ゲノムのサイズは、ポリドナウイルスでは５ｋｂｐ（kilobase pair、キロベースペアー）、アデノウイルスでは３０乃至３８ｋｂｐ、バキュロウイルス及びヘルペスウイルスでは約２００ｋｂｐ、ポックスウイルス及びフィコドナウイルスでは３００ｋｂｐ以上である。ｄｓＤＮＡウイルスの複製は細胞ゲノムに関する半保存複製により行われる。真核生物のウイルスでは、複製は主に核内において、ＤＮＡポリメラーゼ、トポイソメラーゼ、リガーゼ、ＤＮＡ依存ＲＮＡポリメラーゼ、及びその他の細胞酵素を用いて行われる。ｄｓＤＮＡウイルスの複製は宿主のＤＮＡ複製機構に完全に依存している。

【００８６】

ウイルスｄｓＤＮＡは細胞分裂のＳ期及びＧ２期に産生される。しかしながら、ポックスウイルス及びバキュロウイルスの一部（顆粒症グループ）、イリドウイルスの複製は、細胞周期のその他の時期にも、細胞質内のウイルス特異的な封入体内において、ウイルスゲノムがコードされた酵素（例えばＤＮＡポリメラーゼ）を用いて行われる。これらのウイルスに関しては以下の複製段階が特定されている。まず、宿主の酵素によるｄｓＤＮＡの第１複製が行われる。次に初期ｍＲＮＡの翻訳と調節蛋白の合成が行われる。次に、宿主の酵素の補助を受けてウイルスｄｓＤＮＡの複製が行われる。次にウイルス調節蛋白の制御下で後期転写が行われる。次に初期ｍＲＮＡの翻訳と後期ウイルス構造蛋白の合成が行われる。最後に構造蛋白とウイルスｄｓＤＮＡが集合して成熟ビリオンを形成する。

【００８７】

本発明の一つの実施形態において、ウイルスゲノムｄｓＤＮＡ、複製中のウイルスｄｓＤＮＡのｓｓＤＮＡ領域、及び中間状態まで転写されたウイルスｓｓＲＮＡに対して加水分解特性を有する１若しくはそれ以上のヌクレアーゼで処理することにより、ｄｓＤＮＡウイルスの複製を抑制する方法を提供する。

【００８８】

グループＩＩのｓｓＤＮＡウイルスには、非エンベロープパルボウイルス及びサーコウイルスが含まれる。これら哺乳類のウイルスに加えて、鳥類に感染するシルコ様ウイルス、及び植物に感染するジェミニウイルス及びバナナ萎縮病関連ウイルス（Banana Bunchy Top-Related Viruses（ＢＢＴＲＶ））が含まれる。これらのｓｓＤＮＡウイルスは直鎖状ＤＮＡゲノム、一重環状、二重環状、或いは多重環状のＤＮＡゲノムを有することができる。これらのｓｓＤＮＡウイルスのＤＮＡゲノムは全てサイズが小さく、サーコウイルスでは３ｋｂ、パルボウイルスでは４乃至５ｋｂ、ジェミニウイルスでは２．７乃至５．４ｋｂ、ＢＢＴＲＶでは５乃至６ｋｂである。ｓｓＤＮＡウイルスの核内における複製について以下のような段階が特定されている。まず感染直後に（－）センスＤＮＡ鎖が形成される。次に「複製可能形態」中間ｄｓＤＮＡが形成される。次に宿主酵素によりｄｓＤＮＡテンプレートが転写される。次に調節蛋白をコードするｍＲＮＡの初期翻訳が行われる。ウイルスｓｓＤＮＡの「ローリングサイクル（rolling cycle）」型転写が行われる。次にウイルス調節蛋白の制御下で後期転写が行われる。次に後期ウイルス構造蛋白が合成される。最後にウイルスｓｓＤＮＡとウイルス構造蛋白が集合して成熟ビリオンを形成する。パルボウイルス属のウイルスの一部（例えばアデノ関連ウイルス）は、霊長類宿主内において確実に生存するために、二相性のライフサイクルを発展させてきた。二相性のライフサイクルにおいては、増殖性感染のために、無関係なｓｓＤＮＡヘルパー・ウイルス（アデノウイルス又はヘルペスウイルス）が必要とされる（Muzyczka et al., In Fields Virology, 4th Edn, pp. 2327-2359, 2001,. D.M. Knipe et al., Eds., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins）。ヘルパーウイルスが存在しない場合、ＡＡＶタイプ２（ＡＡＶ－２）はヒトクロモソーム１９上の特定部位への優先的な組込みにより潜伏期を確立する（Huser & Heilbronn J Gen Virol 84: 133-137, 2003, Kotin et al., Proc Natl Acad Sci USA 87:2211-2215, 1990）。

【００８９】
本発明の他の実施形態において、ウイルスゲノムｓｓＤＮＡ、中間ｄｓＤＮＡ、及びｓｓＲＮＡに対して好ましい加水分解作用を有する１若しくはそれ以上のヌクレアーゼを用いて処理することによりｓｓＤＮＡの複製を阻害する方法を提供する。
【００９０】
（ＲＮＡウイルス）
多くのＲＮＡウイルスは細胞質内で複製する。例外的にオルソミクソウイルス（例えばインフルエンザＡ、Ｂ、Ｃウイルス）は核内で複製する。ＲＮＡウイルスでは、ウイルス遺伝子発現のメカニズムはＤＮＡゲノムを含む宿主細胞の遺伝子発現と根本的に異なる。ＲＮＡウイルスゲノムは二本鎖ＲＮＡすなわちｄｓＲＮＡ、又はネガティブセンスすなわちアンチセンスｓｓ（－）ＲＮＡ、及びウイルス蛋白質又はｓｓ（＋）ＲＮＡをコードするポジティブセンスＲＮＡから構成されることができる。ＲＮＡ複製段階はＲＮＡ依存的ＲＮＡポリメラーゼ（RNA-dependent RNA polymerases（ＲｄＲｐｓ））により触媒される。ＲＮＡ依存的ポリメラーゼは、ウイルスのコードされたタンパク質（例えばポリメラーゼ、ヘリカーゼ）と、いくつかの宿主因子により形成される。
【００９１】
グループＩＩＩのｄｓＲＮＡウイルスには、非エンベロープ型レオウイルス、ビルナウイルス、パルティティウイルス、トティウイルス、及びクリプトウイルスが含まれる。レオウイルスは動物、植物、及び昆虫に感染する。ビルナウイルスは脊椎動物及び非脊椎動物に感染する。パルティティウイルスは主に菌類に感染する。トティウイルスは菌類、原生動物、及び昆虫に感染する。クリプトウイルスは植物中に存在し、明らかに種子又は花粉を介して伝染する。
【００９２】
単一コンポーネント・ウイルスのｄｓＲＮＡゲノム又は複数コンポーネント・ウイルスのｄｓＲＮＡゲノムのサイズは、パルティティウイルス、ビルナウイルス、及びトティウイルスでは４乃至７ｋｂｐであり、レオウイルスでは２０乃至２７ｋｂｐである。レオウイルスは１つのカプシド内に１０乃至１２セグメントのｄｓＲＮＡを有する。感染初期において、部分的にコーティングされていないサブウイルス（subvirus）粒子内で、ウイルス特異性転写酵素によるｄｓＲＮＡゲノムの転写が行われる。初期転写の結果として複数のｓｓ（＋）ＲＮＡが合成される。ｓｓ（＋）ＲＮＡは、細胞質内に放出されると、構造蛋白の合成をコードする後期ｍＲＮＡとして、及びｄｓＲＮＡ合成のためのテンプレートとして働く。ｄｓＲＮＡ合成は新たに形成されたカプシド内で行われる。
【００９３】
ｄｓＲＮＡウイルスの以下の複製段階が特定されている。部分的に開口したカプシド内において、ウイルス特異的転写酵素によるｓｓ（＋）ＲＮＡを形成するｄｓＲＮＡの初期転写が行われる。次にｓｓ（＋）ＲＮＡが細胞質内に搬出される。次に細胞質内においてｓｓ（＋）ＲＮＡが翻訳されるとともにウイルスの調節蛋白及びウイルスの初期構造蛋白が蓄積される。次にｓｓ（＋）ＲＮＡとウイルス蛋白が未成熟ビリオン内に集合する。次に、非成熟ビリオン内のウイルスＲｄＲｐにより、ｓｓ（＋）ＲＮＡが相補的ｓｓ（－）ＲＮＡを介してｄｓＲＮＡに複製される。次にｄｓＲＮＡの第二の転写が行われる。次にｓｓ（＋）ＲＮＡが翻訳され、後期構造ウイルス蛋白が蓄積される。ゲノムｄｓＲＮＡと構造蛋白が成熟ビリオン内に集合する。
【００９４】
グループＩＶのｓｓ（＋）ＲＮＡウイルスには、非エンベロープ型ウイルス（ピコルナウイルス、カリチウイルス、ライノウイルス、及び一般的な感冒ウイルス）、及びエンベロープ型ウイルス（ニドウイルス、コロナウイルス／ＳＡＲＳ、フラヴィ属ウイルス、Ｃ型肝炎ウイルス／ＨＣＶ、トガ属ウイルスなど）、植物のウイルス（例えば、ブロモウイルス、コモウイルス、ポティウイルス、タバコモザイクウイルス／ＴＭＶなど）、昆虫のウイルス（ノダウイルス、テトラウイルス）、菌類のウイルス（バルナウイルス）が含まれる。ｓｓ（＋）ＲＮＡウイルスの単成分の或いは複数成分のゲノムのサイズは、バルナ

ウイルスでは５ｋｂ未満、ピコルナウイルス及びフラビウイルスでは７乃至１２ｋｂ、コロナウイルスでは非分節の状態で２７乃至３１ｋｂである。コロナウイルスは人間の体内で重症急性呼吸器症候群（Severe Acute Respiratory Syndrome（ＳＡＲＳ））を引き起こす。

【００９５】

これらのウイルスゲノムはｍＲＮＡとして働き、宿主細胞に感染した後に翻訳される。しかしながらウイルスゲノムのｄｓＲＮＡ形態とサブゲノムＲＮＡが多くのｓｓ（＋）ＲＮＡウイルスに感染した細胞から単離された。このようなｓｓ（＋）ＲＮＡウイルスとしては、ＴＭＶ等の植物ウイルスの大部分、いくつかのピルコマ様昆虫ウイルス、及びコロナウイルスを例示できる。ｓｓ（＋）ＲＮＡウイルスは感染細胞の細胞質内で複製する。

【００９６】

複製過程は次の段階を含む。ｍＲＮＡとしてｓｓ（＋）ＲＮＡが翻訳され、ＲｄＲｐの早期産生が行われる。次にＲｄＲｐによりｓｓ（＋）ＲＮＡテンプレート上でｓｓ（－）ＲＮＡが合成され、これに伴い膜関連複製複合体（replicative complex（ＲＣ））が形成され、ｓｓ（－）ＲＮＡが膜結合型のＲＮＡポリメラーゼにより産生されるゲノム長ｄｓＲＮＡの形態となる。例えば、トガウイルス科アルファウイルス属のシンビスウイルス（Sindbis virus（ＳＩＮ））は、３つのｄｓＲＮＡ中間複製形態を有する。１つは完全長ゲノムであり、残りの２つはそれぞれ、最初の３分の２のゲノム（非構造領域）と、残りの３分の１のゲノム（構造領域）に対応する。次に複数のｓｓ（＋）ＲＮＡ、ｍＲＮＡ、及びｓｓ（－）ＲＮＡが合成される。次にｓｓ（＋）ＲＮＡとｍＲＮＡの翻訳、及び構造蛋白の合成が行われる。最後に構造蛋白とｓｓ（＋）ＲＮＡが集合して成熟ビリオンを形成する。

【００９７】

グループＶのｓｓ（－）ＲＮＡウイルスには、エンベロープ型一本鎖（－）ＲＮＡウイルス（モノネガウイルス目のフィロウイルス科、パラミクソウイルス科、ラブドウイルス科）、複数鎖（－）ＲＮＡウイルス（オルソミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、アレナウイルス科）が含まれる。ウイルスゲノムのサイズは、モノネガウイルス目では１１～１９ｋｂ、６から８分節のオルソミクソウイルス（インフルエンザウイルス）では１０～１４ｋｂ、３分節のブニヤウイルスでは１１～２０ｋｂである。しかしながらｓｓ（－）ＲＮＡウイルスは、より高度な真核生物にのみ直接感染する。ｓｓ（－）ＲＮＡウイルスはまた、いくつかの昆虫と宿主植物の間の密接な関係の結果、植物に感染することもできる。ｓｓ（－）ＲＮＡウイルスは宿主細胞の細胞質内において複製する。例外的にオルソミクソウイルスは宿主細胞の核内において複製する。

【００９８】

以下の複製過程が特定されている。まずウイルスＲｄＲｐによりｓｓ（－）ＲＮＡの第一の転写が行われるのに伴い主にｍＲＮＡとｓｓ（＋）ＲＮＡが産生される。同時に、複製複合体（replicative complex（ＲＣ））が形成されるのに伴いＲＣ内においてｓｓ（＋）ＲＮＡが部分的にｄｓＲＮＡの形態となる。次に完全長ｓｓ（＋）ＲＮＡ及び子孫ｓｓ（－）ＲＮＡが産生される。子孫ｓｓ（－）ＲＮＡから第２の転写が行われる。次に構造蛋白が翻訳され、蓄積される。次にヌクレオカプシドが集合し成熟する。最後に、ウイルスのエンベロープ蛋白を含む宿主の膜を介してヌクレオカプシドが出芽する。

【００９９】

上記の複製過程によると、ＲＮＡウイルスの複製中、中間ウイルスＤＮＡは合成されない。しかしながら、相補的ウイルスｓｓＤＮＡ産生の実験的証拠が生体内及び生体外に存在する。相補的ウイルスｓｓＤＮＡ産生において、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（lymphocytic choriomeningitis virus（ＬＣＭＶ））（Klenerman, et al., Letters to Nature, 390: 298-301, 1997）、ポリオ、及び麻疹ウイルス（Zhdanov, Nature 256: 471-473, 1975）などのＲＮＡウイルスに感染した細胞内に存在する内在性逆転写酵素（reverse transcriptase（ＲＴ））が用いられる。内在性ＲＴはその他の感染性ウイルス由来の逆転写ＲＮＡを逆転写することが可能であることが分かっている（Zhdanov, Nature 256: 4

71-473, 1975）。内在性ＲＴ源としては、内在性レトロウイルス、又はその他の様々な散在反復配列（Wiener et al., A. Rev. Biochem. 55, 631-661, 1986）を例示できる。このような内在性ソースからの逆転写物は哺乳類のゲノムにおいては１０％～２０％を占める（Coffin, in Reverse Transcriptase, pp.445-479, 1993, Eds. Skalka and Gough, Cold Spring Harbor Lab Press, NY）。内在性トリ白血病ウイルス（endogenous avian leukosis virus（ＡＬＶ－Ｅ））とトリ白血病ウイルス（avian leukosis virus（ＡＬＶ））の存在に起因する低いＲＴ活性もまたトリ胚線維芽細胞基質（chicken embryonic fibroblast substrate）において観察された（Hussain et al., Journal of Virology, January 77(2):1105-1111, 2003; Johnson and Heneine, J. Virol. 75(8): 3605-3612, 2001）。トリ胚線維芽細胞基質は、麻疹、流行性耳下腺炎、及び黄熱病のワクチン作製に用いられる。

【０１００】

リボヌクレアーゼＩのＲＮＡウイルスに対する抗ウイルス作用は、リボヌクレアーゼＩとデオキシリボヌクレアーゼＩを組み合わせることにより増強される。驚くべきことに、デオキシリボヌクレアーゼＩとリボヌクレアーゼＩを組み合わせることにより、ウマ脳炎ウイルスの複製に対する強い抑制効果が得られる（実施例４０参照）。その他のＲＮＡウイルスの複製中に中間ウイルスＤＮＡが生じることは、この知見と同様のものとみなしうる。本明細書中において「中間ウイルスＤＮＡ」との文言は、ＤＮＡウイルス及びＲＮＡウイルスを含む任意のウイルスの複製サイクル中に合成されるウイルス特異的ＤＮＡのことをいう。ウイルス学の当業者の間では、中間ウイルスＤＮＡが、ＲＮＡウイルスのライフサイクルにおけるＲＴ作用の産物であると一般的に考えられているが、本明細書中における「中間ウイルスＤＮＡ」との文言はいかなる特定の合成メカニズムにも限定されるものではない。むしろ、「中間ウイルスＤＮＡ」とは、産生の方法に関わらず、ウイルス複製において観察される全ての種のウイルスＤＮＡを示す。

【０１０１】

その他のＲＮＡウイルスに感染した細胞内の内在性ＲＴ作用又はその他の未知の要因を原因として中間ウイルスＤＮＡが出現する可能性があるため、本発明の組成物の一つの実施形態として、グループＩのｄｓＤＮＡウイルスとグループＩＩのｓｓＤＮＡウイルスに対する核酸分解活性を有するヌクレアーゼの組み合わせが用いられる。このような組成物は結果として全てのＲＮＡウイルスに対する抗ウイルス「カクテル」となる。したがって、本発明の他の実施形態は、ｄｓＲＮＡ、ｓｓＲＮＡ、及び中間ウイルスｓｓＤＮＡ及びｄｓＤＮＡに対して好ましい加水分解作用を有する１若しくはそれ以上のヌクレアーゼを用いて、ｄｓＲＮＡウイルス、ｓｓ（＋）ＲＮＡウイルス、及びｓｓ（－）ＲＮＡウイルスの複製を抑制する方法に関する。

【０１０２】

（ＤＮＡ及びＲＮＡ逆転写（Reverse Transcribed（ＲＴ））ウイルス）

グループＶＩのｓｓ（＋）ＲＮＡウイルスには、エンベロープ型レトロウイルス科に属するウイルス、例えば、レンチウイルス属、アルファレトロウイルス属、ガンマレトロウイルス属、ベータレトロウイルス属、デルタウイルス属のウイルスなどが含まれる。レンチウイルス属のウイルスの例としては、ヒトに感染するヒト免疫不全ウイルス（human immunodeficiency virus（ＨＩＶ））、サルに感染するサル免疫不全ウイルス（simian immunodeficiency virus（ＳＩＶ））、ヒツジに感染するビスナマエディウイルス（visna-maedi virus（ＶＩＳＮＡ））、ウマに感染するウマ伝染性貧血ウイルス（equine infectious anemia virus（ＥＩＡＶ））が挙げられる。アルファレトロウイルス属の例としては、トリ白血病ウイルス（avian leucosis virus（ＡＬＶ））、ラウス肉腫ウイルス（Rous sarcoma virus（RSV））が挙げられる。ガンマレトロウイルス属の例としては、ネコ白血病ウイルス（feline leukemia virus（ＦＬＵ））、マロニー・ネズミ白血病ウイルス（Maloney murine leukemia virus（ＭＯＶＥ））が挙げられる。ベータレトロウイルス属の例としては、哺乳類マウス乳癌ウイルス（mammalian mouse mammary tumor virus（ＭＭＴＶ））及びメイソン・ファイザー・モンキー・ウイルス（Mason-Pfizer monkey vi

rus（ＭＰＭＶ））が挙げられる。デルタウイルス属は、ヒトＴ細胞白血病ウイルス（human T-lymphotropic virus（ＨＴＬＶ））及びスプーマウイルス（ヒト・スプーマ・レトロ・ウイルス）（Spumavirus（human spumaretrovirus））に代表される。

【０１０３】

レトロウイルスビリオンは標的細胞膜と融合して、細胞質内にウイルスゲノムを放出する。ウイルスゲノムのそれぞれは、２つのｓｓ（＋）ＲＮＡ分子を含む。逆転写物（reverse transcript（ＲＴ））はレトロウイルスのウイルスゲノムと関連しており、ウイルスＲＮＡは逆転写のためのテンプレートとして働く。全てのレトロウイルスは４つの遺伝子をコードする。４つの遺伝子は、gag、 pro 、pol 、及びenvと呼ばれる。レトロウイルスのｓｓ（＋）ＲＮＡゲノムのサイズは７，０００～１１，０００ｂであり、ＨＩＶゲノムのサイズは９，７４９ｂである。

【０１０４】

以下の複製過程が特定されている。細胞質内で、ビリオン関連ＲＴによりビリオンｓｓ（＋）ＲＮＡの逆転写が行われ、結果として中間ＲＮＡ－ＤＮＡハイブリッド複合体が産生される。次にリボヌクレアーゼＨによりＲＮＡ－ＤＮＡ複合体内のＲＮＡの消化が行われる。次にＲＴにより、残りのｄｓＤＮＡが、末端反復配列を有する直鎖状又は環状ｄｓＤＮＡの形態に複製される。次にｄｓＤＮＡが核内に移入される。次に組込み酵素により、直鎖状プロウイルスＤＮＡが宿主細胞のＤＮＡ内に組込まれる。次に宿主の酵素により、組込まれたｄｓＤＮＡの複製及び転写が行われ、それに伴い子孫ｓｓ（＋）ＲＮＡが産生される。次に後期構造蛋白が翻訳及び蓄積される。次にタンパク質と子孫ｓｓ（＋）ＲＮＡが集合してウイルス核タンパク質を形成する。次に細胞膜を介してウイルスが出芽する。出芽中に、ウイルスのエンベロープ糖タンパク質がビリオン内に組込まれる。

【０１０５】

他の実施形態において、本発明は１若しくはそれ以上のウイルスゲノムｓｓＲＮＡ、中間ハイブリッドＲＮＡ－ＤＮＡ、ｓｓＤＮＡ、ｄｓＤＮＡ、及びｓｓＲＮＡに対して好ましい加水分解作用を有するヌクレアーゼを用いてｓｓ（＋）ＲＮＡ　ＲＴウイルスの複製を抑制する方法を提供する。

【０１０６】

グループＶＩＩのｄｓＤＮＡ　ＲＴウイルスとして例えば、エンベロープ型のヘパドナウイルス科のウイルスが挙げられる。ヘパドナウイルス科にはＢ型肝炎ウイルス（hapetitis B virus（ＨＢＶ））が含まれる。以下に述べるように、グループＶＩＩにはまた、独特の生態を有する非エンベロープ型デルタ型肝炎ウイルス（hepatitis delta virus（ＨＤＶ））が含まれる。デルタ型肝炎ウイルスの複製及び伝播には、Ｂ型肝炎ウイルスの存在が不可欠である。ＨＤＶは共有結合により閉環したｓｓ（－）ＲＮＡ分子からなる１，６７８ベースのゲノムを有する。このｓｓ（－）ＲＮＡ分子は、広範囲の分子内塩基対形成により、ｄｓＲＮＡの桿状構造に似た構造に折畳まれている。多くの植物ウイルスについて二重ローリング・サークル・モデルとして知られているメカニズムを用いて、１つの開始点から両方のＲＮＡが転写される。その他のｓｓ（－）ＲＮＡウイルスと同様に、ＨＤＶはその複製過程において中間ｄｓＲＮＡを産生する。

【０１０７】

ｄｓＤＮＡ　ＲＴウイルスについて次のウイルス複製過程が特定されている。ウイルスのヌクレオカプシドが細胞質内に入って細胞の核に達する。環状ｄｓＤＮＡが合成されるとともに（＋）ＤＮＡ鎖の間隙が修復される。この結果共有結合により閉環した（covalently closed circular）スーパーコイル状ＤＮＡが得られる。次にＣＣＣテンプレートが転写され、４つのウイルスｓｓ（＋）ＲＮＡが得られる。これらのウイルスｓｓ（＋）ＲＮＡはその後細胞質に輸送される。次に新たなウイルスヌクレオカプシド内において逆転写が行われる。ＣＣＣ－ＤＮＡ、開環状ＲＣ－ＤＮＡ、直鎖状ｓｓＤＮＡとｄｓＤＮＡ、及びｓｓ（＋）ＲＮＡの形態で複製中間体が産生される。次にＤＮＡが転写されて、宿主ＤＮＡ依存的ＲＮＡポリメラーゼによりｍＲＮＡ及びｓｓ（＋）ＲＮＡが合成される。次に細胞質内において、ｍＲＮＡ及びｓｓ（＋）ＲＮＡが翻訳される。次にウイルスＲＮＡ

及びウイルス蛋白が蓄積される。次にウイルス蛋白質とｓｓ（＋）ＲＮＡが相互作用し、蓄積物が集合する。次にビリオン内において、ウイルスＲＴによりｓｓ（＋）ＲＮＡが、中間ｓｓＤＮＡを有するｓｓＤＮＡＲＮＡ／ＤＮＡ複合体に逆転写される。次にリボヌクレアーゼＨによりＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッドからＲＮＡが除去される。ビリオンＲＴによりＲＮＡ／ＤＮＡ複合体が、ギャップを有するとともに中間ｓｓＤＮＡを備える環状ｄｓＤＮＡに変換される。最後にビリオンが成熟する。

【０１０８】

本発明の他の実施形態において、ウイルスゲノムｄｓＤＮＡ、及び／又は中間ウイルス・ハイブリッドＲＮＡ－ＤＮＡ、環状ｓｓＤＮＡ、直鎖ｓｓＤＮＡ、ｄｓＤＮＡ、及びｓｓＲＮＡに対して加水分解作用を有する１若しくはそれ以上のヌクレアーゼによりｄｓＤＮＡ　ＲＴウイルスの複製を抑制する方法を提供する。「ヘルパー」ＨＶＢと関連したＨＤＶを抑制するためには、ｄｓＲＮＡに対して加水分解作用を有する更に別のヌクレアーゼが必要である。

【０１０９】

要約すると、ウイルスはそのＤＮＡ又はＲＮＡゲノムの形態により７つのグループに分類され、それぞれのグループにより引き起こされるウイルス性疾患の治療のための組成物及び治療方法には、ＤＮＡ及びＲＮＡの異なる中間形態の性質に基づいて、異なる戦略が必要とされる。多くの場合、ＤＮＡ及びＲＮＡの中間形態は複数存在する。

（表１）ＤＮＡウイルス及びＲＮＡウイルスの例

グループ	核酸	ウイルスの例	エンベロープの有無	ゲノムサイズ（ｋｂ）
Ｉ	ｄｓＤＮＡ	天然痘	有	130－375
		ヘルペス	有	120－225
		アデノ	無	30－38
		パピローマ	無	8.0
		ポリオーマ	無	5.3
ＩＩ	ｓｓＤＮＡ	パルボ、サーコ	無	5.0
ＩＩＩ	ｄｓＲＮＡ	レオ	無	18－31＊
		ビルナ	無	5.8－6.0
ＩＶ	ｓｓ（＋）ＲＮＡ	コロナ／ＳＡＲＳ	有	27－31
		Ｃ型肝炎	有	10.5
		Ａ型肝炎	有	7.5
		トガ	無	9.7－11.8
		口蹄疫	無	8.5
		ポリオ	無	7.4
		ＴＭＶ	無	6.4
Ｖ	ｓｓ（－）ＲＮＡ	インフルエンザ	有	12－15＊
		麻疹	有	17－20
ＶＩ	ｓｓＲＮＡ　ＲＴ	ＨＩＶ	有	9.75
ＶＩＩ	ｄｓＤＮＡ　ＲＴ	ＨＢＶ	有	3.1

尚、表中＊印は分節ゲノムの全体のサイズであることを表す。

【０１１０】

本発明の様々な実施形態は、複製中のウイルス核酸の異なる中間形態を標的とするヌクレアーゼの性質に基づいてウイルスの複製を抑制するための複数標的アプローチを提供する。以下では、関連する抗ウイルス性ヌクレアーゼの分類と、それらの特徴的特性の説明

を行う。

【０１１１】

（ヌクレアーゼの分類）

２つの異なる核酸（ＤＮＡ及びＲＮＡ）内の糖成分、リボース、又はデオキシリボースの間のリン酸ジエステル結合に対する加水分解攻撃の特異性に基づいて、ヌクレアーゼを大別できる。したがって、これら酵素はまずデオキシリボヌクレアーゼとリボヌクレアーゼに分類された（Kunitz, J. Gen. Physiol 24: 15, 1940）。いくつかの細菌のエンドヌクレアーゼと、毒液ホスホジエステラーゼはＲＮＡとＤＮＡの両方を加水分解する（Shmidt, in Chargaff and Davidson (eds.), The Nucleic Acids, Vol. 1, Academic Press, 1955）が、ここでは、Kunitzにより提案されたデオキシリボヌクレアーゼとリボヌクレアーゼへの分類を用いる。ＤＮＡとＲＮＡの様々な形態に対するヌクレアーゼの加水分解作用が大きく異なることから、新たな分類法が提案された。この分類では、基質の構造的特異性が考慮される。構造的特異性としては例えば、ＤＮＡ及びＲＮＡが１本鎖又は２本鎖であるか、ハイブリッドＤＮＡ－ＲＮＡやＤＮＡのＡ－、Ｂ－、及びＺ－高次構造の存在、マイナー・グローブ・ドメインにおけるデオキシリボヌクレアーゼＩによるＤＮＡ切断などの切断特性など（Mishra, Nucleases:Molecular Biology and Applications, John Willey & Sons, Hoboken, NJ, 2002, Ch.1）が挙げられる。

【０１１２】

本明細書中において、治療用途に用いられる抗ウイルス剤としてのヌクレアーゼの分類は、ヌクレアーゼの特性、例えば、生物学的ソース及び基質核酸（すなわち、ウイルス複製サイクル中に生み出されるウイルスゲノムと核酸中間体）の構造や特異性に基づいて行われる。ヌクレアーゼは更に、作用機序にしたがってエンドヌクレアーゼとエクソヌクレアーゼに下位分類される。エンドヌクレアーゼはＤＮＡ又はＲＮＡを複数の内部部位で切断するのに対して、エクソヌクレアーゼは１つのヌクレオチドをＤＮＡ又はＲＮＡの３’又は５’末端から連続的に切断する。また、この分類に関係する事実として、右巻き又は拡張Ｂ－ＤＮＡを形成するウイルス複製サイクル中に細胞内において、ＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッドを形成するとき以外はウイルスｄｓＤＮＡが保護されない状態で現われることが挙げられる。ＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッドはＡタイプらせん体である。Ｂ－ＤＮＡは通常、ハイブリッド形成前にＡ－ＤＮＡに変換されなければならない。第３の形態であるＺ－ＤＮＡはＢ－ＤＮＡより長く、逆のねじれを有する左巻きらせん体である（Calladine and Drew, Understanding DNA, Academic, London, 1997）。多くの天然又は人工のヌクレアーゼはＢ－ｄｓＤＮＡに対して選択的核酸分解活性を有する。例外的にリボヌクレアーゼＨは、ＲＮＡ－ＤＮＡタイプＡらせん体内のＲＮＡを特に標的とする。

【０１１３】

本明細書中で説明する抗ウイルス性ヌクレアーゼは、野生型で未変性のヌクレアーゼと、組換え型の天然ヌクレアーゼを含む。組換え型の天然ヌクレアーゼとはすなわち、化学的／遺伝的に修飾された天然のヌクレアーゼであって、結合親和性と加水分解活性が増強されることにより、抑制剤及び内在性プロテアーゼに対するヌクレアーゼの抵抗性が向上されている。本発明により提供される抗ウイルス性ヌクレアーゼはまた、人工ヌクレアーゼを含み、人口ヌクレアーゼには、ウイルス核酸の特殊な形態に対して加水分解活性を有するように生物学的半合成ヌクレアーゼ及び化学的半合成ヌクレアーゼが含まれる。抗ウイルス性ヌクレアーゼは、それらに適した基質の性質と形態に従って７つのグループに分類される。これらの基質は、ウイルス複製サイクル中に現われる様々な形態のウイルス核酸である。

【０１１４】

グループにＩｄｓＤＮＡに特異的なヌクレアーゼは、二本鎖ＤＮＡに対して選択的な加水分解活性を有する酵素である。このグループには、野生型で未変性のヌクレアーゼと、組換え型の化学的／遺伝的に修飾された、哺乳類、細菌、又は植物由来のデオキシリボヌクレアーゼ様ヌクレアーゼが含まれる。この組換え型ヌクレアーゼは、直鎖状に本さＤＮＡ、ニックの入った環状の二本鎖ＤＮＡ、又はスーパーコイル状の二本鎖ＤＮＡを分解す

る。このグループのヌクレアーゼとして例えば、デオキシリボヌクレアーゼＩファミリー、デオキシリボヌクレアーゼα、デオキシリボヌクレアーゼβ、デオキシリボヌクレアーゼγ、デオキシリボヌクレアーゼＩＩファミリー、デオキシリボヌクレアーゼＩＩ様酸性デオキシリボヌクレアーゼ（DNase II-like Acid DNase（ＤＬＡＤ））、エクソヌクレアーゼＩＩＩ及びこれらに類するもの、及び二本鎖ウイルスＤＮＡのため配列特異的認識ドメインを内部に持つ人工ヌクレアーゼが挙げられる。グループＩを代表する２つのヌクレアーゼであるヒトデオキシリボヌクレアーゼＩとヒトデオキシリボヌクレアーゼＩＩの主な特徴を以下に説明する。

【０１１５】

ヒト膵臓デオキシリボヌクレアーゼＩは弱アルカリ性（例えば、約ｐＨ６～９．５）の条件で最適な活性を有する。デオキシリボヌクレアーゼＩの最適な活性には、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Ca^{2+}などの二価カチオンの存在が必要である。生理的濃度のナトリウム、カリウム、及びリン酸塩の存在下では、デオキシリボヌクレアーゼＩの活性は低下する。例えばヒトデオキシリボヌクレアーゼは、５０ｍＭのNaClでは５０％の活性を保つのに対して、生理的濃度（１５０－２００ｍＭのNaCl）ではその活性が１０％以下となる。

【０１１６】

費変性の野生型デオキシリボヌクレアーゼＩの加水分解作用強度が生体内において制限される他の要因は、ヒトの血清中にＤＮＡ結合タンパク質が存在することである。血清中の典型的濃度（約３．２＋／－１．４ｎｇ／ｍＬ）において、デオキシリボヌクレアーゼＩの潜在的阻害物質であるアクチンの存在を主な原因として、内在性ヒトデオキシリボヌクレアーゼＩは、内在性血清ＤＮＡに対して非常に低い、又は検出不可能なレベルの核酸分解活性を有する。薬学的研究により、ヒト血清中に存在する２５～２５０ｎｇ／ｍＬの内在性ＤＮＡに対して検出可能なレベルの触媒作用を得るためには、野生型組換え型ヒトデオキシリボヌクレアーゼＩの血清中濃度は、最低でも５０～１００ｎｇ／ｍＬ必要であることがわかっている（Prince, et al., Clin. Exp. Immunol. 113(2):289-96, 1998）。単量体のＧ－アクチン及び重合体のＦ－アクチンを含むアクチンの総濃度は、正常なヒト血清中では１２５μｇ／ｍＬであると報告されている（Pan, et al., J. Biol. Chem., 273:18374-18381, 1998）。ヒトの血漿中濃度としてはこれより少し低い濃度（３０－５０μｇ／ｍＬ）が報告されている（Mejean et al., J. Immuno. Methods 99:129-135, 1987）。Ｇ－アクチン、４２ｋＤａの構造蛋白、及び３１ｋＤａのデオキシリボヌクレアーゼＩがK_i １０$^{-9}$ Ｍの複合体を形成する（Lazarides, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71:4742-4746, 1994; Ulmer, et al. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 93:9225-8229, 1996）。

【０１１７】

組換え型ヒトｒｈデオキシリボヌクレアーゼＩの変異体が、米国特許出願第２００１／００４１３６０号（出願人：Lazarus et al. 出願日：２００１年１１月１５日）及び米国特許出願第２００２／０１７３０２５号（出願人：Lazarus and Pan 出願日：２００２年１１月２１日）に開示されている。これらの変異体は、向上された活性を有し、生理的濃度の塩類の存在下でアクチンによる阻害の影響を受けにくい。これらの変異体は、基質核酸とＧ－アクチンの結合に関与するアミノ酸残基において、又はアミノ酸残基近傍に変異を有する。Ｇ－アクチンがヒトデオキシリボヌクレアーゼＩ、ウシデオキシリボヌクレアーゼＩ、マウスデオキシリボヌクレアーゼＩ、ウサギデオキシリボヌクレアーゼＩの潜在的阻害物質であるのに対して、両生類デオキシリボヌクレアーゼＩはＧ－アクチンにより影響されない。ヒトデオキシリボヌクレアーゼＩとウシデオキシリボヌクレアーゼＩにおいてアクチン結合を担う残基Ｙ６５、Ｖ６７、及びＡ１１４は、両生類デオキシリボヌクレアーゼＩには保存されていない（Paudel and Liao, J.Biol.Chem.261:16012-16017,1986;Yasuda T. et al. J.Biochem.(Tokyo)108:393-398,1990）。

【０１１８】

ヒト膵臓デオキシリボヌクレアーゼＩは２８２のアミノ酸からなる糖タンパク質であり、Ｎ１８及びＮ１０６位置に２つのアスパラギン連鎖のグリコシル化部位を有する。この

酵素は２２のシグナルアミノ酸（MW 2197.7Da）と２６０のチェーンアミノ酸（MW 29253.9Da）からなり、シグナル内に陽性のアルギニン残基と陽性のリジン残基を有し、チェーン（Ｋ２、Ｋ１５、Ｋ５０、Ｋ７７、Ｋ１５７、Ｋ２６０）内に１３の陽性のアルギニン酸残基（Ｒ３１、Ｒ４１、Ｒ７３、Ｒ７９、Ｒ８５、Ｒ１１１、Ｒ１１７、Ｒ１２１、Ｒ１２６、Ｒ１７７、Ｒ１８５、Ｒ２１３、Ｒ２２２）、チェーン内に１２の陰性グルタミン酸残基（Ｅ）、チェーン内に２２の陰性アスパラギン酸（Ｄ）残基を有する。結果として、２８２のアミノ酸（MW 31, 451.6 Da）の天然のヒト膵臓デオキシリボヌクレアーゼＩ（ref. SWISS PROT P24855）について、電荷の合計（２＋１３＋６－１２－２２）は－１３の負の電荷となる。

【０１１９】

ヒト膵臓デオキシリボヌクレアーゼＩはまた、マンノース－６－リン酸（mannose-6-phosphate（Ｍ－６－Ｐ））残基を含む。Ｍ－６－Ｐ残基は２つのグリコシル化部位（２つのアスパラギン残基Asn-106及びAsn-18）に存在する。ヒト膵臓デオキシリボヌクレアーゼＩは、カチオン非依存性マンノース－６－リン酸受容体（CI-MPR）に対して非常に強い結合親和力を有する（Cacia et al., Biochemistry 37:15154-15161, 1998）。

【０１２０】

ヒト内在性膵臓デオキシリボヌクレアーゼＩが、細胞膜上に存在するCI-MPRの結合を介してヒトの生体細胞内に入ることが最近明らかにされている（Oliveri, et al., Eur.J. Immun. 34:273-279,2004）。対照的にウシ膵臓デオキシリボヌクレアーゼＩは、１つの部位Asn-18においてグリコシル化される（Liao, et al., J. Biol. Chem. 248:1489-1493, 1973）。ウシデオキシリボヌクレアーゼＩは高マンノースとハイブリッドオリゴ糖を含み、ハイブリッドオリゴ糖はシアル酸を含む（Salmikow, et al., J. Biol. Chem. 245:5685-5690, 1970）。しかし、ウシデオキシリボヌクレアーゼＩにはＭ－６－Ｐ残基は存在しない（Cacia et al., Biochemistry 37:15154-15161,1998）。

【０１２１】

本発明の一つの実施形態において、デオキシリボヌクレアーゼＩ、リボヌクレアーゼＩ、及びその他のヌクレアーゼを含む高分子複合体を説明する。これら高分子複合体において、高分子化合物は、CI-MPR細胞表面受容体（実施例３参照）を標的とする複数のマンノース－６－リン酸（Ｍ－６－Ｐ）残基を含むように修飾されている。

【０１２２】

ヒトデオキシリボヌクレアーゼＩＩは３４４のアミノ酸（MW38 kDa）からなるエンドヌクレアーゼであり、約ｐＨ４．５～５．０の範囲内で最適に機能し、必ずしも２価カチオンを必要としない。ヒトデオキシリボヌクレアーゼＩＩはデオキシリボヌクレアーゼＩと同様にＤＮＡを切断する。このときヒトデオキシリボヌクレアーゼＩＩは２本鎖のカットではなく１本鎖のニックを生み出す（Baker et al., Gene 215:281-289(1998)）。おそらくは細胞ＤＮＡを直接損傷することにより、デオキシリボヌクレアーゼＩＩは細胞アポトーシスを助長又は誘発するが、最近のデータによりデオキシリボヌクレアーゼの過剰発現は生体内で細胞死を引き起こすには至らないことが示されている（Evans et al. Gene 295:61-70, 2002）。デオキシリボヌクレアーゼＩＩ酵素は、ＤＮＡの貪食媒介排除に用いられる（Evans et al., Gene 295:61-70, 2002, MvIlroy et al., Genes Dev. 14:549-558, 2000）。デオキシリボヌクレアーゼＩＩはリーダーペプチドを有し、このリーダーペプチドは、小胞体内への酵素の挿入を促進する（Lyon et al., Gene 252:147-154, 2000; Shiokawa and Tanuma, Biochem.Biophys. Res. Commun. 247:864-869, 1998; Baker et al., Gene 215:281-289, 1998）。

【０１２３】

組織特異的な発現パターンを有するデオキシリボヌクレアーゼＩと異なり、デオキシリボヌクレアーゼＩＩはあらゆる組織に分布している（Krieser et al., Gene 269: 205-216(2001)）。このことは、デオキシリボヌクレアーゼＩＩの役割が、食作用とＤＮＡ喰殺（cannibalism）の後にＤＮＡの分解することであるとの説と整合している。デオキシリボヌクレアーゼＩＩファミリーには、酸性ヌクレアーゼ、例えば、哺乳類デオキシリボヌ

クレアーゼＩＩ様酸性デオキシリボヌクレアーゼ（DNase II-like acid DNase（ＤＬＡＤ））が含まれる。ＤＬＡＤは、４０．７ｋＤａの塩基性細胞質タンパク質であり、デオキシリボヌクレアーゼＩＩと３７％のアミノ酸が一致している。ＤＬＡＤは哺乳類の肝臓において発現する（Shiokawa and Tamura, Nucl. Acid Res. 27(20):4083-4089, 1999）。酸性条件下でデオキシリボヌクレアーゼＩＩが示す高い核酸分解活性は、本発明により提供されるデオキシリボヌクレアーゼＩＩ由来の抗ウイルス性組成物の特徴である。エンドソームのウイルス貪食と外因的なデオキシリボヌクレアーゼＩＩが同時に作用することにより、酸性二次リソソーム内のヌクレアーゼによるウイルスＤＮＡの加水分解的消化が促進される。

【０１２４】

グループＩＩのｓｓＤＮＡに特異的なヌクレアーゼには、一本鎖ＤＮＡに対して優先的加水分解活性を有する酵素が含まれる。グループＩＩｓｓＤＮＡ特異的ヌクレアーゼには例えば、１本鎖ＤＮＡとして、野生型の未変性のヌクレアーゼ、野生型の組換えヌクレアーゼ、化学的／遺伝的に修飾されたBasidiobolus haptosporus由来のＢｈ１ヌクレアーゼ、マング・ビーン・ヌクレアーゼ（Mung Bean nuclease）、及びこれらに類するもの、及び１本鎖ウイルスＤＮＡのための特殊な配列特異的認識ドメインを内部に有する人工ヌクレアーゼが含まれる。グループＩＩの代表的なヌクレアーゼであるヒトエンドヌクレアーゼＧと真菌のＢｈ１ヌクレアーゼの特徴を以下で説明する。

【０１２５】

ヒトエンドヌクレアーゼＧ（endoG）（糖類非特異性の２９ｋＤａの酵素）はｓｓＤＮＡ及びｓｓＲＮＡに対して強い加水分解活性を示す。この酵素はミトコンドリア内の主要なヌクレアーゼ活性の原因である。この酵素は、カスパーゼ非依存的アポトーシスの間にミトコンドリアの膜間の空間から放出される（Parrish, et al. Nature 412: 90-94, 2001; Liu, et al., Nature 412:95-99, 2001）。EndoGは、ｄｓＤＮＡに対してより、１本鎖基質核酸ｓｓＤＮＡおよびｓｓＲＮＡに対して高い加水分解活性を有する（Cote and Ruiz-Carrillo, Science 261:765-769, 1993;Ikeda, et al., Biochem Biophys.Res Comm. 235:291-294, 1997）。EndoGは二価カチオンとしてMg^{2+}、Mn^{2+}のいずれかを必要とする。尚、EndoGは二価カチオンとしてCa^{2+}を用いることはできない（Ruiz-Carrillo and Renaud, EMBO J. 6:401-407, 1987; Gershenson, et al. Nucleic Acid Res 23:88-97, 1995）。EndoGは二相性の最適ｐＨ（ｐＨ９．０及びｐＨ７．０）を有する。EndoGは、生理的一価カチオン強度が約１５倍に抑制されている。

【０１２６】

ファースト・ヒット・キネティックスにより、スーパーコイル状のプラスミドが、endoGの作用により一本鎖ニックにより弛緩されることが示されている（Widlak, et al.J.Biol.Chem.276(51):48404-48409,2001）。endoGは生体内でミトコンドリアＤＮＡ（ｍｔＤＮＡ）に対して重要なニック化機能を発揮する。一方でミトコンドリア因子は、酵素の活性を調節するとともに、ｍｔＤＮＡの一本鎖成分の切断を防止する。ミトコンドリア因子としては、特異的膜リン脂質、ポリアミン、一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質（single stranded DNA-binding protein（ＳＳＢ））などが挙げられる。ミトコンドリア内膜の主要な成分であるホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンは、生体内で、精製EndoGの活性を刺激して５倍～１０倍に高めることが示されている。スペルミンもまた、５～１００μＭの低い濃度においては、この酵素の活性を刺激して、約４倍に高める。スペルミンはまた、５００μＭの濃度においては、ｓｓＤＮＡとｄｓＤＮＡの分解の大部分を抑制する（Ikeda, et al. J. Biochem. Mol. Biol. Biophys. 6(1):17021,2002）。

【０１２７】

このグループの他の代表例として、Ｂｈ１ヌクレアーゼが挙げられる。Ｂｈ１ヌクレアーゼは、Basidiobolus haptosporus（Basidiobolus ranarum）から単離される細胞外ヌクレアーゼである。Basidiobolus haptosporusは接合菌綱ハエカビ目に属する菌類である。この雑菌は世界中に広く分布しており、爬虫類、両生類、及び一部の哺乳類の腸内容物中に見出される。一本鎖核酸と二本鎖核酸の一本鎖領域に対して高い選択性を有する一本鎖

特異的ヌクレアーゼは、微生物、植物、及び動物中に広く分布している。しかしながら、マング・ビーン・ヌクレアーゼ、コウジカビ由来のＳ１ヌクレアーゼ、ペニシリウム・シトリナム（Penicillium citrinum）由来のＰ１ヌクレアーゼ、Alteromonas espejiana、アカパンカビ（Neurospora crassa）、Ustilago maydis由来のＢａｌ３１ヌクレアーゼ及びその他少数の一本鎖特異的酵素しかその特性が十分に決定されていない（Shishido et al., Single-strand-specific nucleases. In Nucleases, Linn, S.M., Lloyd, R.S. & Roberts, R.J., Eds）,2nd Ed, pp. 155-185, 1985）.Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York）。

【０１２８】

多くの一本鎖特異的ヌクレアーゼは、最適ｐＨを有するとともに、活性状態を保つために金属イオンを必要とする。このことは、一本鎖特異的ヌクレアーゼの生理的条件下での使用を困難にしている。Ｂｈ１ヌクレアーゼは３０ｋＤａのメタロプロテインであり、活性状態を保つために必ずしも金属イオンを必要としない。またＢｈ１ヌクレアーゼは一本鎖ＤＮＡ対一本鎖ＲＮＡに対して高度に選択的な加水分解活性を有する。しかしながら、その他のいくつかの一本鎖特異的酵素と同様にＢｈ１ヌクレアーゼは高濃度においては、二本鎖ＤＮＡをゆっくりと消化することができる。塩濃度がヌクレアーゼＢｈ１のｓｓデオキシリボヌクレアーゼ活性に及ぼす影響として、Ｂｈ１のｓｓデオキシリボヌクレアーゼ活性はNaCl又はKClの濃度が２５～５０ｍＭ付近で最大に達することが分かっている。しかしながら、NaClの塩濃度が１５０～２００ｍＭの生理学的濃度において、Ｂｈ１は最大活性の約３５％の活性を示した（Desai and Shankar, Eur.J.Biochem. 267, 5123-5135, 2000）。

【０１２９】

グループＩＩＩのｄｓＲＮＡ特異的ヌクレアーゼには、二本鎖ＲＮＡに対して優先的加水分解活性を有する酵素が含まれる。このグループには、野生型の未変性ヌクレアーゼ、野生型の組換えヌクレアーゼ、化学的／遺伝的に修飾されたリボヌクレアーゼＩＩＩ様ヌクレアーゼ、及び二本鎖ウイルスＲＮＡに対する特殊配列特異的認識ドメインを内部に有する人工ヌクレアーゼが含まれる。このグループを代表するヌクレアーゼである哺乳類リボヌクレアーゼＩＩＩ及びヒトリボヌクレアーゼＩの特徴を以下で説明する。

【０１３０】

哺乳類リボヌクレアーゼＩＩＩヌクレアーゼは、二本鎖ＲＮＡ特異的エンドリボヌクレアーゼのスーパーファミリーに属する。二本鎖ＲＮＡ特異的エンドリボヌクレアーゼは、多様な変異や真核生物及び原核生物の減衰経路に関与する（Aravind et al., Methods Enzymol 341:3-28, 2001）。リボヌクレアーゼＩＩＩスーパーファミリーにはまた、ヒトダイサー（human Dicer）も含まれる。ヒトダイサーは、２１８ｋＤａの多領域エンドヌクレアーゼであり、二本鎖ＲＮＡを低分子干渉ＲＮＡ（SiRNAs）に処理し、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）の過程において特定の遺伝子を抑制する役割を担う。リボヌクレアーゼＩＩＩスーパーファミリーは、調節ミクロＲＮＡの前駆体からの切除を触媒する（Provost, et al., EMBO J. 21(21):5864-5874, 2002; Zhang, et al., EMBO J. 21(21):5875-5885,2002）。リボヌクレアーゼＩＩＩタンパク質は、特徴的配列（ＨＮＥＲＬＥＦＬＧＤＳ；ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）を含み、その分子量は２５～５５ｋＤａである。ショウジョウバエ（Drosophila）及びエレガンス線虫（Caenorhabditis elegans）などの種では、リボヌクレアーゼＩＩＩヌクレアーゼはこの配列の２つのコピーを含む（Filippov, et al., Gene (Amst.)245, 213-221, 2000）。このことは、いくつかのリボヌクレアーゼＩＩＩタンパク質が、単量体として活性触媒中心を形成できることを示唆している。サイン配列の欠失及び変異は、リボヌクレアーゼＩＩＩヌクレアーゼの触媒活性を失わせる或いは低下させる（Nicholson, Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol. 52, 1-65, 1996）。大腸菌（Escherichia coli）では、リボヌクレアーゼＩＩＩは５２ｋＤａのホモ二量体を形成し（Dunn, J. Biol. Chem. 251, 3807-3814, 1976）、二価の金属イオン（好ましくはMg^{2+}）を必要とする（Dunn and Boye, Eds., Ribonuclease III, The enzymes (New York, Academic Press):485-499, 1982）。

【０１３１】
ｃＤＮＡをコードするヒトリボヌクレアーゼＩＩＩ（米国特許出願第２００３／００４４９４１号　出願人：Grooke）は、前駆体ｒＲＮＡプロセシング（pre-ribosomal processing）（Wu, et al., J Biol Chem 275:36957-36965(2000)）に関与する複数のドメインを含む１６０ｋＤａ（アミノ酸数１３７４）のタンパク質をコードする。ヒトリボヌクレアーゼＩＩＩドメイン（アミノ酸数４２５：残基９４９－１３７４）はタンパク質のカルボキシ末端に位置し、線虫（C. elegans）リボヌクレアーゼＩＩＩ、酵母菌リボヌクレアーゼＩＩＩ、細菌リボヌクレアーゼＩＩＩの相同体である。ヒトリボヌクレアーゼＩＩＩはプロリンに富むドメイン（アミノ酸数１－２２０）と、セリンとアルギニンに富むドメイン（アミノ酸数２２１－４７０）をアミノ末端近傍に備える。

【０１３２】
外因性の「ＲＮＡ様」オリゴヌクレオチドの補助を受けて人工的に形成された二本鎖領域のリボヌクレアーゼＩＩＩによる切断が説明されてきた（Wu et al., J. Biol. Chem. 273:2532-2542, 1998、米国特許第５，８９８，０３１号及び第６，１０７，０９４号（出願人：Crooke））。ヒトリボヌクレアーゼＩＩＩポリヌクレオチドの複数の相同体が、ヒトリボヌクレアーゼＩＩＩＤＮＡによりコードされるポリペプチドの相同体とともに開示されてきた（米国特許出願第２００３／００４４９４１号　出願人：Crooke））。

【０１３３】
グループＩＶのｓｓＲＮＡ特異的ヌクレアーゼには、一本鎖ＲＮＡに対して優先的加水分解活性を有する酵素が含まれる。このグループには、野生型の未変性のヌクレアーゼ、野生型の組換えヌクレアーゼ、化学的／遺伝的に修飾されたリボヌクレアーゼＡ様ヌクレアーゼ、及びウイルス一本鎖ＲＮＡに対する特殊配列特異性認識ドメインを内部に有する人工ヌクレアーゼが含まれる。グループＩＶの代表的なヌクレアーゼはであるウシ膵臓リボヌクレアーゼＡ及びヒト膵臓リボヌクレアーゼＩの相対的特性を以下で説明する。

【０１３４】
ウシ膵臓リボヌクレアーゼＡは、２６のシグナルアミノ酸（ＭＷ＝２７８８．６）と、１２４のチェーンアミノ酸（ＭＷ＝１３，６９０．２Ｄａ）からなり、１つの陽性アルギニン残基と１つの陽性リジン残基をシグナル内に有し、４つの陽性アルギニン残基をチェーン（Ｒ１０、Ｒ３３、Ｒ３９，Ｒ８５）内に有し、１０の陽性リジン残基をチェーン（Ｋ１、Ｋ７、Ｋ３１、Ｋ３７、Ｋ４１、Ｋ６１、Ｋ６６、Ｋ９１、Ｋ９８、Ｋ１０４）内に有し、５つの陰性グルタミン酸残基をチェーン（Ｅ）内に有し、５つの陰性アスパラギン酸残基をチェーン（Ｄ）内に有する。結果として、１５０のアミノ酸（ＭＷ１６，４７８．８Ｄａ）の未変性のウシ膵臓リボヌクレアーゼＡ（ref. SWISS PROT P00656）に関して、電荷の合計（２＋４＋１０－５－５）は＋６の正の電荷となる。リボヌクレアーゼＡは一本鎖ＲＮＡのリン酸ジエステル結合を加水分解する。特に、ピリミジン塩基（例えばウラシル）と、ヒスチジン残基Ｈ１２及びＨ１１９と関連する２段階の反応を介して連鎖した結合を加水分解する。以下の残基の側鎖は、酵素の活性ドメインを形成する。すなわち、His12、Lys41、Val43、Asn44、Thr45、His19、Phe120、Asp121、Ser123である（Raines, Chem. Rev.98:1045-1065,1998）。

【０１３５】
「リボヌクレアーゼ阻害剤（ribonuclease inhibitor（ＲＩ））」と呼ばれるリボヌクレアーゼＡの強力な阻害物質は、５０ｋＤａのタンパク質であり、哺乳類細胞のサイトゾル中のタンパク質の約０．０１％を構成する（Blackburn and Moore, Enzymes XV: 317-433, 1982）。２４のアミノ酸残基からなる群が、リボヌクレアーゼＡとＲＩの接触に関与する。リボヌクレアーゼＡは、Ala20残基とSer21残基の間でサブチリシン又はプロテアーゼＫにより切断される。この結果酵素的に活性なリボヌクレアーゼＳが産生される。リボヌクレアーゼＳは、Ｓ－ペプチド（残基１－２０）とＳ－タンパク質（残基２１－１２４の密に結合した非共有結合複合体を含む。リボヌクレアーゼＳはリボヌクレアーゼＡの全ての活性を有する（Richards and Bithayathil, J.Biol.Chem. 234:1459-1465, 1959）。ウシＳ－ペプチドのＮ末端残基１－１５（Lys(K)-Glu(E)-Thr(T)-Ala(A)$_3$-Lys(K)-Phe(F)

-Glu(E)-Arg(R)-Gln(Q)-His(H)-Met(M)-Asp(D)-Ser(S)(SEQ.ID No:3)は、高い親和力K_d＜10^{-9}を有する完全に活性なリボヌクレアーゼSを再構築できる（Kim and Raines, Protein Sci.2:348-356, 1993）。

【０１３６】

このグループのもう一つの代表的なヌクレアーゼは、ヒト膵臓リボヌクレアーゼＩである。ヒト膵臓ヌクレアーゼＩはウシ膵臓ヌクレアーゼＩの相同体であると考えられている（Seno, et al., Biochem.Biophys.Acta 1218:466-468,1994;Beintema,et al. Anal.Biochem. 136:48-64, 1984）ヒトリボヌクレアーゼＩはウシリボヌクレアーゼＡと約７０％の相同性を有するとともに、ウシリボヌクレアーゼＡと同様のキー構造と触媒残基を有する（Weickmann, et al., Biochemistry 20:1272-1278(1981)）。ヒトヌクレアーゼＩは、リボヌクレアーゼＡが中性残基を有する位置において、代わりに６つの塩基性アミノ酸を有する。特に、Arg(R)4及びLys(K)102は、ＲＮＡのための結合部位付近に位置する。更に、リボヌクレアーゼＡ内の陰性のアスパラギン酸Asp(D)38は、ヒトリボヌクレアーゼにおいては中性のグリシンGly(G)38により置換されている。これらの位置の近傍には、両方の酵素に共通のArg(K)39が位置する（Libonatti and Sorrentino, Mehod Enzymol. 341:234-248,2001）。

【０１３７】

リボヌクレアーゼＩの加水分解活性は、イオン強度と二価イオンにより個別に影響される。リボヌクレアーゼＡと比べて、リボヌクレアーゼＩは４つのアミノ酸カルボキシル末端延長を有する（Sorrentino and Libonatti, Arch.Biochem.Biophys.312:340-348, 1992; Sorrentino, et al., J. Biol.Chem. 267:14859-14865,1992）。生理的塩類濃度下で、リボヌクレアーゼＩは、リボヌクレアーゼＡに比して約５００倍の二本鎖ＲＮＡ基質に対する酵素活性を有する。強い局所的陽性電位が、二本鎖を非安定化すると推論されている。（Sorrentino and Libonatti, FEBBS Lett, 404, 1-5, 1997）。完全に酵素的に活性なヒトリボヌクレアーゼＳは、合成又はクローンＳ－ペプチド（残基１－１５（SEQ ID NO:60）：Lys(K)-Glu(E)-Ser(S)-Arg(R)-Ala(A)-Lys(K)$_2$-Phe(F)-QRQ-His(H)-Met(M)-Asp(D)-Ser(S)及びクローン切断型ヒトＳ－タンパク質（２１－１２４））を組み合わせることにより再構築できる。ヒトＳ－ペプチドとヒトＳ－タンパク質をコードする遺伝子断片はヒト胎盤ｃＤＮＡから得られた（Dubel, Tumor Targeting 4:37-46, 1999）。

【０１３８】

本発明において、非免疫原生ヒトリボヌクレアーゼＩとリボヌクレアーゼＳ由来の抗ウイルス性組成物は、ＲＮＡウイルスにより引き起こされるウイルス性疾患の治療及び予防に用いられる。例えば、潜在的宿主細胞に非常に高濃度のヒトＳ－ペプチドを予防的に添加することができる。ヒトＳ－ペプチドは高分子量の親水性高分子体（例えばＰＥＧ）と結合し、特殊なリガンド（例えば、エボラウイルスの場合葉酸塩）を用いてウイルス宿主細胞の受容体を標的とする。またヒトＳ－ペプチドは、膜貫通性のペプチド（例えばPoly(Arg)ペプチド、HIV-TAT$_{43-49}$等を有する。このようなＳ－ペプチド－ＰＥＧ結合は、半減期が長いこと、強いタンパク分解性を有すること、及び細胞吸収量が大きいことを特徴とする。いかなる特定の理論又はメカニズムによらなくても、非免疫原性の加水分解的に非活性のＳ－ペプチド－ＰＥＧ複合物を更に多量に吸収しても、非感染細胞においては、重大な副作用は起こらない。次の段階において、Ｓ－ペプチド－ＰＥＧ複合体と同じ分子量と半減期を有し、同じ葉酸塩リガンドとポリ（Arg）ペプチドの標的となるヒトＳ－タンパク質－ＰＥＧ複合体を投与する。この二重標的技術により、完全に活性なリボヌクレアーゼＳの非標的細胞内における再構築を低減し、副作用を低減することができる。

【０１３９】

このグループは更にヒトリボヌクレアーゼＩ、ウシリボヌクレアーゼＡ、ヒトリボヌクレアーゼＳ、及びウシリボヌクレアーゼＳそれぞれの一般変異体及び特殊変異体を含む。これらの変異体は、未変性のリボヌクレアーゼＩ、リボヌクレアーゼＡ、及びリボヌクレアーゼＳと比べて、ＲＩに対してより低い結合親和力を示す一方で、高い酵素活性と低い細胞毒性を保っている。これらの変異体は、少なくとも１つの置換を含み、例えば保存さ

れたヌクレアーゼＲＩ結合ドメインが、非天然型アミノ酸により置換されている。非天然型アミノ酸としては例えば、大型の中性側鎖或いは大型の荷電側鎖、又はケト基を含むアミノ酸が挙げられる。

【０１４０】

ヒトリボヌクレアーゼＩ及びウシリボヌクレアーゼＡにおいて保存されているＲＩ結合ドメインは、切断されたＳ－ペプチド領域（Lys(K)1-Ser(S)15）内に位置する３つのアミノ酸Lys(K)1、 Lys(K)7、及びGln(Q)11と、Ｓ－プロテイン領域に位置する２つのアミノ酸Asn(N)71及びAsp(E)111と、２つのジスルフィド結合の間の第２ループ領域内に位置する１０のアミノ酸Arg(R)85-Asn(N)94を含む。グループＩＶのｓｓＲＮＡ特異的特殊変異体の例として、リボヌクレアーゼ阻害物質（ribonuclease inhibitor（ＲＩ））抵抗性で且つ非毒性のヒトリボヌクレアーゼＩ特殊変異体が挙げられる。この変異体は、遺伝子工学的手法を用いて置換物K1FU$^{(keto)}$/Q11A/N71A/E111Aを生み出すことにより得られる。グループＩＶのｓｓＲＮＡ特異的特殊変異体の他の例として、切断型Ｓ－ペプチド（１－１５のアミノ酸残基断片）からなるヒトリボヌクレアーゼＳが挙げられる。このヒトリボヌクレアーゼＳは、置換物K1FU$^{(keto)}$/Q11Aにより得られる。グループＩＶのｓｓＲＮＡ特異的特殊変異体の更に別の例として、切断型Ｓ－タンパク質（残基２１－１２４のアミノ酸残基断片）が挙げられる。この切断型Ｓ－タンパク質は、置換物N71A/G89FU$^{(keto)}$/E111Aにより得られる。尚、式中FU$^{(keto)}$は、ケト基を有する非天然型ｐ－アセチル－Ｌ－フェニルアラニン残基を表す。

【０１４１】

グループＶのハイブリッド特異的ヌクレアーゼには、基質としてのＲＮＡ－ＤＮＡハイブリッドに対して選択的な酵素活性を有する酵素が含まれる。このファミリーには、野生型で未変性のリボヌクレアーゼＨファミリーのヌクレアーゼ、及び組換え型の化学的／遺伝的に修飾されたリボヌクレアーゼＨファミリーのヌクレアーゼ、及び人工ヌクレアーゼが含まれる。これらヌクレアーゼのそれぞれは、ウイルスＲＮＡ－ＤＮＡハイブリッド内の一本鎖ＲＮＡに対する配列特異的認識ドメインを有する。

【０１４２】

グループＶの抗ウイルス性ヌクレアーゼは、２種類の哺乳類リボヌクレアーゼＨ（タイプ１及びタイプ２）により代表され、これらのリボヌクレアーゼＨは、ＲＮＡ－ＤＮＡヘテロ二本鎖内のＲＮＡ鎖を加水分解する。リボヌクレアーゼＨ酵素は、全ての生物体で確認されている（Stein & Hausen, Science 166, 393-395, 1969、 Cathala et al. J. Biol. Chem. 254, 7353-7361, 1979、Frank, et al., J. Biol. Chem 379, 1407-1412, 1998、frank, et al., FEBS Letters, 450, 251-256, 1999、Ohtani et al., Biochemistry, 38: 605-618,1999）。リボヌクレアーゼＨ酵素は、レトロウイルス内でも確認されている（Moelling, et al., Nat. New Biol. 234, 240-243, 1971）。原核生物において、リボヌクレアーゼの３つの種類（Ｈ１、Ｈ２、及びＨ３）が確認されている。リボヌクレアーゼＨ１及びＨ２は大部分の配列において相同性を有するのに対して、リボヌクレアーゼＨ１及びＨ３は、その二価カチオンと基質選択性が類似している（Wu, et al., J. Bio. Chem., 274 (40):28270-28278, 1999）。

【０１４３】

クローン化された遺伝子と配列比較が利用可能になる以前は、真核生物のリボヌクレアーゼＨ酵素は、その精製特徴にしたがって、リボヌクレアーゼＨタイプ１とリボヌクレアーゼＨタイプ２に分類された（Busen and Hausen, Eur. J. Biochem. 52:179-190, 1975）。リボヌクレアーゼＨタイプ１は活性を発揮するためにMg^{2+}又はMn^{2+}イオンを必要とし、ｎ－エチル－マレイミド等のスルフヒドリル試薬の存在下で活性を保つ。対照的にリボヌクレアーゼＨタイプ２は、Mg^{2+}イオンの存在下でのみその活性を発揮し、Mn^{2+}イオンやスルフヒドリル試薬により抑制される。哺乳類リボヌクレアーゼＨタイプ１及びタイプ２酵素は、多様な哺乳類の組織から単離され、生化学的な特性が明らかにされてきた。このような組織として、子ウシの胸腺（Buesen, J. Viol. Chem. 255:9434-9443, 1980; Vonwirth, et al., Experientia, 46(3):319-321, 1990）、マウス細胞（Ma

sutani, et al. J. Biol. Chem. 265:10210-10216, 1990）、ＨｅＬａ細胞（Kane, Biochemistry 27:3187-3190, 1988）、ヒトの赤白血病細胞（Eder and Walder, J. Biol. Chem. 266, 6472-6479, 1991）、及びヒトの胎盤（Frank, et al., Nucleic Acids Res. 22: 5247-5254, 1994）が挙げられる。ヒトの胎盤から採取されてほぼ均一に精製されたリボヌクレアーゼＨタイプ２は、分子量が約３３ｋＤａで、ｐＨ６．５～ｐＨ１０の範囲で最適な活性を示し、ｐＨ８．５～ｐＨ９で比較的低い活性を示す。このリボヌクレアーゼＨタイプ２はまた、Mg^{2+}イオンの存在を必要とし、Mn^{2+}イオンとｎ－エチル－マレイミド等のスルフヒドリルにより抑制される（Frank, et al., Nucleic Acids Res. 22: 5247-5254, 1994）。

【０１４４】

参考として、大腸菌（E. coli）リボヌクレアーゼＨ１は、リボヌクレアーゼＨタイプ１に属する（Itaya, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8587-8591,1990）。一方で、大腸菌（E. coli）リボヌクレアーゼＨ２はリボヌクレアーゼＨタイプ２に属する（Davis et al., Science 252: 88-95, 1991）。ヒトリボヌクレアーゼＨ１は大腸菌リボヌクレアーゼＨ１と同種であるが、その生化学的特性はリボヌクレアーゼＨタイプ２と類似している。一方で、ヒトリボヌクレアーゼＨ２は大腸菌リボヌクレアーゼＨ２と同種であるが、その生化学的特性はリボヌクレアーゼＨタイプ１と類似している。

【０１４５】

2つのヒトリボヌクレアーゼＨ遺伝子がクローン化され、発現されている。すなわち、リボヌクレアーゼＨ１（Wu et al., Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 8, 53-61, 1998及び米国特許出願第２００３／０１４４４９６号（出願日：２００３年７月３１日　出願人：Crooke et al.）及びリボヌクレアーゼＨ２（Frank, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 9, 12872-12877, 1998; Carritelli and Crouch, Genomics 53:307-311, 1998）である。ヒトリボヌクレアーゼＨ１は２８６のアミノ酸からなるタンパク質であり、ヒトのあらゆる細胞及び組織において発現する。ヒトヌクレアーゼＨ１のアミノ酸配列は、酵母菌、大腸菌、ニワトリ、及びマウスと強い相同性を示す。ヒトリボヌクレアーゼＨ２酵素は２９９のアミノ酸からなるタンパク質で、質量の測定値は、３３．４ｋＤａである。ヒトリボヌクレアーゼＨ２酵素はヒトのあらゆる細胞及び組織において発現する（Frank, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 9, 12872-12877, 1998）。ヒトリボヌクレアーゼＨ２は、エレガンス線虫、酵母菌、枯草菌、及び大腸菌由来のリボヌクレアーゼＨ２に対して強いアミノ酸配列相同性を有する（Wu et al., Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 8, 53-61, 1998; Ohtani et al., Biochemistry, 38: 605-618, 1999）。

【０１４６】

グループＶＩの非特異的ヌクレアーゼには、全ての核酸に対して非選択性の加水分解活性を有する酵素が含まれる。このグループに含まれる酵素として、Benzonaze（登録商標）、セラチア菌（Serratia marcescens）から単離されるエンドヌクレアーゼ（Eaves and Jeffries J. Bact. 85: 273-278, 1963; Nestle and Roberts, J. Biol. Chem. 244 5219-5225, 1969）、クスダマカビ（Cunninghamella echinulata）から単離されるヌクレアーゼＣＩ（Ho, et al., Eur. J. Biochem. 256:112-118, 1998）が挙げられる。

【０１４７】

Benzonaze（登録商標）は、核酸を５’－一リン酸塩末端オリゴヌクレオチド（長さ約２～５ベース）に分解する（Nestle and Roberts, J. Biol. Chem. 244 5219-5225, 1969; Janning, et al., Rapid Commun. Mass. Spectrom. 8:1035-1040, 1994）。このヌクレアーゼは核酸鎖のほぼ全ての位置で切断を行う能力を有するが、いくつかの配列選択性を有することが示されている（Meiss, et al., Biochemistry 34:11979-11988, 1995）。この酵素はＧＣに富んだ領域を選び、d(A)/d(T)路を避ける。構造的にこの酵素は同じ２４５のアミノ酸からなる３０ｋＤａのサブユニット２つからなる。この酵素は、ｐＨ６～ｐＨ１０（最適ｐＨはｐＨ８～ｐＨ９）、０℃～４２℃（最適温度は３７℃）において機能性を有しする。この酵素は、その活性を発揮するために、１～１０ｍＭ（１～２ｍＭが最適）の範囲の濃度のMg^{2+}を必要とする。しかしながら、一価カチオン（Ｎａ＋、Ｋ＋

など）の高濃度（＞１５０ｍＭ）存在下においてはその活性は抑制される（相対的活性が約７５％低下）。このような濃度は、生理的条件において典型的にみられる。Benzonaze（登録商標）はNovagen社、Epicentre社、及びその他の供給業者から商業的に入手可能である。

【０１４８】

Cunninghamella echinulata var. echinulata由来のヌクレアーゼＣＩは、一本鎖及び二本鎖のＤＮＡ及びＲＮＡを、ほぼ等しい開裂速度で分解する。核酸の二本鎖を分解するとき、この酵素は、一方の鎖を認識してこの鎖において開裂を起こし、他方の鎖は分解しない。このヌクレアーゼはMg^{2+}又はMn^{2+}二価カチオンを必要とし、ＥＤＴＡなどの金属イオンキレート剤により抑制される。この酵素は、ｐＨ＝７．０～８．５で、１０ｍＭのMg^{2+}又は５ｍＭのMn^{2+}のいずれかの存在下において最適な活性を有し、Ca^{2+}イオンのみの存在下においては１００分の１の低い活性を示す。この酵素の活性はｐＨ６．０以下において大幅に低下する。この酵素は、高温でより高い活性を示す。最適温度は、Mn^{2+}存在下では５５℃、Mg^{2+}存在下では５０℃である（Ho, et al., Eur. J. Biochem. 256:112-118, 1998）。

【０１４９】

グループＶＩＩの人工ヌクレアーゼには、１若しくはそれ以上の形態のウイルス核酸に対して選択的活性を有するように予め設計された酵素的化合物が含まれる。天然の酵素の加水分解機能を模した人工の生物学的又は化学的核酸開裂剤が開発されてきた（Sigman et al., Chem. Rev. 93:2295-2316, 1993; Komiyama and Sumaoka, Curr. Opin. Chem Biol.2:751-757, 1998; Kramer, Coord. Chem. Rev. 182:243-261, 1999; Ott and Kramer, Appl. Microbiol. Biotechnol, 52:761-767, 1999; Franklin, Curr. Opin. Chem. Biol. 5:201-208, 2001）。人工的核酸開裂剤の例として、核酸分解活性を示すペプチド及び偽ペプチド、加水分解活性を有する化学的ヌクレアーゼ（例えばランタニドイオン複合体）などが挙げられる（Wan, et al. Chin. Sci. Bull. 45(22): 2017-2028, 2000; Sigman et al., Chem Rev. 93:2295-2316, 1993）。合成ポリマーが人工ヌクレアーゼのバックボーンとして用いられてきた。人工メタロヌクレアーゼは、CysのCu(II)複合体を架橋されたポリスチレンに無作為に付加することにより得られる（Jung, et al., J. Am. Chem. Soc. 120:12008-12016, 1998; Suh, Acc. Chem. Res. 36:562-570, 2003）。ペプチド・バックボーン又は非ペプチド・バックボーンを用いた完全に合成の分子もまたヌクレアーゼ模倣薬として設計されている。

【０１５０】

核酸やタンパク質などの複数種類の天然の基質に対して加水分解による開裂活性を有する短いペプチドはSer-Hisである（Li, et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry 8(12):2675-2680, 2000）。セリルーヒスチジン（Seryl-histidine（S-H））ジペプチドと、セリルーヒスチジンーアスパラギン酸（Seryl-histidine-aspartate（S-H-D））トリペプチドは、一本鎖及び二本鎖のＤＮＡ及びＲＮＡの分子を非特異的に開裂できるので、ウイルス性疾患の予防及び治療に用いることができる。尚、これらのＤＮＡ及びＲＮＡ分子は、直鎖状、環状、又はスーパーコイル状のいずれであってもよい。

【０１５１】

タンパク質ベースのヌクレアーゼの設計において、天然の酵素活性部位から取り出された触媒基、又は同様の触媒特性を有する他のペプチド・ベースの物質を人工ヌクレアーゼの活性基として選択できる。例えば、ｓｓＲＮＡを分解するリボヌクレアーゼＡの模倣薬は、２～４のイミダゾール基（Breslow and labelle, J. Am. Chem. Soc. 108(10):2625, 1986; Breslow, Acc. Chem. Res. 24(11): 317, 1991）を、アクリジン（Lorente, et al. Tetrahedron Letters 37(25):4417, 1996）などの干渉物質と結合させることにより得られる。選択した部位にオリゴヌクレオチド相補物質を有するリボザイム模倣薬は、部位特異的ＲＮＡ切断を行うことができる（Ciesiolka et al., Eur.J., Bioch.204, 575-581, 1992）。

【０１５２】

人工ヌクレアーゼは、核酸結合ドメインと金属結合ドメインの２つのドメインを備えるポリペプチドとして設計されることができる。核酸結合ドメインは、核酸配列と特異的に結合する任意のアミノ酸配列とすることができる。この核酸配列として例えば、ウイルスのｄｓＤＮＡ、ｓｓＤＮＡ、ｄｓＲＮＡ、ｓｓＲＮＡ、ＲＮＡ－ＤＮＡハイブリッド、Ｂ－ＤＮＡ、Ａ－ＤＮＡ、又はこれらに類するものが挙げられる。金属結合ドメインは、核酸結合ドメイン内に位置することができる。金属結合ドメインは、任意の金属、例えばCa(II)、Eu(II)、Zn(II)、Cr(IV)、Cd(II)、Ce(III)、Fe(III)、Co(III)、Cu(III)に結合する。また好ましくは金属結合ドメインは、ランタニドなどの加水分解性金属に結合する。加水分解性ポリペプチドとして例えば、以下のアミノ酸配列或いはこれらポリペプチドの触媒的活性部分が挙げられる（米国特許出願第２００２／０１４６７８８号　出願人：Franklin）。尚この出願の内容の全ては参照により本明細書中に組込まれる）。すなわちTERRRQQLDKDGDGTIDEREIKIHFQNKRAKIK (Seq ID NO: 4)、TERRRfdkdqngyigaadlrhvkiwfqnkrakik (Seq ID NO: 5)、TERRRfrvfdkdgngyisaaekiwfqnkeakik (Seq ID NO: 6) 、TERRRRfslfdkdgdgtittkeevwfqnrrmkwk (Seq ID NO: 7)、dekrprtafsgeqlarlkrefnenrylterrrlrvfdkdgngfisaaekiwfqnkrakikkst(Seq ID NO: 8)である。ＤＮＡ挿入ロジウム複合体に繋ぎ止められたＺｎ$^{2+}$結合ペプチドＰ１Asp-Pro-Asp-Glu-leu-Glu-His-Ala-Ala-Lys-His-Glu-Ala-Ala-Ala-Lys-$CONH_2$(SEQ ID NO:9)は、プラスミドＤＮＡとオリゴヌクレオチド基質を加水分解することが示されている（Copeland, et al., Biochemistry 41:343-356, 2002; Fitzsimmons and Barton, J. Am. Chem. Soc. 119: 3379-3380, 1997）。

【０１５３】

化学的ヌクレアーゼ及びその他の金属複合対をベースとする人工的核酸開裂剤は更に、遊離基又は酸化的開裂、或いはリン酸ジエステル結合加水分解のいずれの作用機序を有するかに従って、２つの主なグループに分けられる。いくつかの遊離基開裂剤（例えばEDTA-Fe^{2+}及び$Cu(phen)_2^+$）及びその他の遷移金属ベースの化合物は、過酸化水素とのフェントン反応により発生したヒドロキシラジカルを有する水素原子を抽出する（Wan et al., Chin.Sci. Bull., 45:2017-2028 (2000)）。いくつかの人工ヌクレアーゼは、特定の形態のＤＮＡ及び／又はＲＮＡに対して特異的加水分解活性を有する。$Cu(phen)_2^+$の遊離基開裂活性は、右巻き二本鎖Ｂ－ＤＮＡに対する特異性を有し、より幅が広く扁平な二本鎖Ａ－ＤＮＡに対する反応性はＢ－ＤＮＡに対する反応性よりも約６～７倍低く、左巻き二本鎖Ｚ－ＤＮＡに対する反応性はＢ－ＤＮＡに対する反応性よりも約５０倍低い（Kuwabara, et al., Biochemistry, 25 (23): 7401(1986)）。この化合物はまた、一本鎖ＲＮＡに対しても有効であるが、二本鎖ＲＮＡに対しては反応性を有さない（Murakawa, et al., Nucleic Acid Res. 17(130):5361, 1989）。

【０１５４】

天然型ヌクレアーゼと同様に、酸化メカニズムを用いる人工的核酸開裂剤よりも、リン酸ジエステル結合の加水分解を触媒する人工的核酸開裂剤のほうが、医療的用途には好ましい。加水分解開裂はレドックス活性反応物を必要としないから、鎖の末端が酵素により退けられることがない。更に、酸化作用により高反応性で拡散性の遊離基と、金属oxenesが生み出される（Sigman et al., Chem. Rev. 93:2295-2316, 1993）。しかしながら、金属イオン複合体などの化学的ヌクレアーゼが潜在的に細胞毒性を有する一方で、これらのヌクレアーゼは野生の動物、鳥類、昆虫、植物内でウイルス感染の治癒のために実際に用いられている。

【０１５５】

ランタニドによるＲＮＡの金属イオン促進加水分解が知られている（Rordorf and Kearns, Biopolymers 15:1491-1504, 1976; Magda, et al., J. Am.Chem. Soc.116:7439-7440, 1994; Hall, et al., Chem. Biol. 1:185-190, 1994）。また遷移金属によるＲＮＡの金属イオン加水分解も知られている（Hegg. et al., Inorg. Chem. 36:1715-1718, 1997; Chapman et al., J. Am. Chem. Soc. 117:5462-5469, 1995及びMorrow, et al., Inorg. Chem. 31:16-20, 1992）。２’－ヒドロキシルリボース環はＲＮＡの加水分解に対する反応性をＤＮＡの約１００，０００倍に高める。相補的ＤＮＡオリゴヌクレオチドはウイ

ルスＲＮＡの部位特異的開裂に用いられることができる（Thompson, et al. Biorg. Chem. 23: 471-481, 1995）。酸化的開裂剤（Zheng, et al., J. Am. Chem. Soc 118:2320-2325, 1996)と加水分解性開裂剤（Brown et al., Nature 303: 543-546, 1983）のいずれも、二本鎖ＲＮＡに対しては一本鎖ＲＮＡに対するより一般的に反応性が低い。特定のメカニズム又は理論には制限されないが、これらの相違点は、ＲＮＡ二本鎖の構造的特徴を原因としていると考えられる。二本鎖ＲＮＡには、Ｂ－ＤＮＡに比べてはるかに深くて幅の狭い主溝を有するＡタイプの二重らせんが用いられる。結果として二本鎖ＤＮＡに結合する薬剤の多くがｄｓＲＮＡに結合できない。更に、二本鎖ＲＮＡは一本鎖ＲＮＡと比べて柔軟性が低い。したがって、基質の配向性により２’－ＯＨの加水分解を抑制することができる（Kolasa, et al. Inorg. Chem. 32: 3983-84, 1993）。しかしながら、いくつかのサイズの小さい遷移金属複合体（例えば$Cu([9]aneN_3)Cl_2$）は、ｓｓＲＮＡとｄｓＲＮＡの両方の開裂に有効である（Hegg, et al., Inorg. Chem. 36:1715-1718, 1997）。ウイルス核酸を標的とするオリゴマーを含むとともに柔軟な構造骨格を有する二官能性のＰＥＧに付加された$Cu([9]aneN_3)Cl_2$複合体は、ウイルス二本鎖ＲＮＡの開裂に使用可能である。オリゴヌクレオチドが結合されたFe(III)/EDTA複合体はＲＮＡ分子を選択的に加水分解できる（Brown et al., Nature, 303, 543-546, 1985）。

【０１５６】

部位選択的ＲＮＡ加水分解には、アクリジン・テザー・オリゴヌクレオチドが用いられ、アクリジン・テザー・オリゴヌクレオチドはＲＮＡと相互作用するとともに標的リン酸ジエステル結合を活性化することが示されている（Ciesolka et al., Eur. J. Biochem 204, 583-589, 1992）。アクリジン含有オリゴヌクレオチドにより形成されるＲＮＡのバルジ部位はその後、非結合性のランタニドにより選択的に加水分解される（Kuzuya, et al. J. Am. Chem. Xoc. 124:6887-6894, 2002; Husken, et al., Biochemistry 35:16591-16600, 1996; Michailovski et al., Biochemie, 78, 131-138, 1996）。

【０１５７】

金属イオン複合体によるＤＮＡの加水分解開裂はより困難である。これは、ＤＮＡリン酸ジエステル結合が、生理的条件下において、比較的高い安定性を有するからである（Williams, et al. Acc. Chem. Res. 32:485-493, 1999; Westheimer, F.H. Science 235: 1173-1178, 1987）。本明細書中で説明する多くの天然型ヌクレアーゼがウイルスに抗する目的に使用可能であるが、ＤＮＡを特定の対象配列に結合し、天然型ヌクレアーゼと同程度の速度でＤＮＡを加水分解的に切断可能な低分子の薬剤の設計は、引き続き重要な課題である。これまでのところ、遷移金属またはランタニド金属に完全に依存してＤＮＡを加水分解的に切断する低分子量分子は極少数しか報告されていない（Branum, J. Am. Chem. Soc., 123:1898-1904, 2001; Sreedhara and Cowan, J. Biol. Inorg. Chem., 6:337-347, 2001）。

【０１５８】

低分子ランタニドLn(III)イオン複合体は、ＤＮＡの加水分解のための触媒中心としての実用に適している（Franklin, Curr. Opin. Chem. Biol. 5:201-208, 2001）。セリウムCe(IV)イオンは、水性条件下で、四価の酸化状態となることが可能なランタニドである。Ce(IV)は、二本鎖ＤＮＡ加水分解に対して最も有効な金属イオンの一つであり、Ln(III)イオンと比べて２０～１０００倍大きいＤＮＡ加水分解速度を有する（Komiyama, Che. Comm: 1443-1451, 1999）。二本鎖ＤＮＡの部位選択的加水分解は、Ce(IV)/EDTA複合体が一本鎖ＤＮＡに対して非常に大きな基質選択性を有することにより可能となっている。修飾オリゴヌクレオチドによって、標的二本鎖ＤＮＡにバルジ又はギャップを有する一本鎖構造は、非結合性Ce(IV)/EDTA複合体に適した基質である（Kitamura and Komiyama, Nucleic Acid Res. 30(19): 102-108, 2002）。

【０１５９】

要約すると、動物、昆虫、細菌、又は植物由来の未変性の及び／又は修飾されたヌクレアーゼ、及び本明細書中で説明する人工ヌクレアーゼは、核酸の加水分解によって抗ウイルス活性を有するとともに、特定形態のビリオン核酸、又は本明細書中で説明する動物、

細菌、植物のウイルスのウイルス複製中に生成する中間ウイルス核酸に対して作用することができる。

【０１６０】

本発明の一つの実施形態において、抗ウイルス性ヌクレアーゼは非天然型アミノ酸を含むように化学的／遺伝的に修飾される。部位特異的に非天然型アミノ酸をタンパク質内に組込むためには、従来半合成的手法が用いられてきた。この手法では、タンパク質断片がペプチド固相合成により合成される。このときのタンパク質断片は、化学的に結合された断片（Dawson, et al. Science 266, 776-779, 1994）であっても、酵素的に結合された断片（Southworth, et al. BioTechniques 27:110-120, 1999）であってもよい。半合成的手法の使用は一般的に、分子量が１０ｋＤａ以下のタンパク質の合成に限定されている（Merrifield, Science 232: 341, 1986; Jackson et al., Science 266, 243, 1994; dawson and Kent, Annu. Rev. Biochem., 69: 923, 2000）。発現タンパク質結合法（expressed protein ligation（ＥＰＬ））によると、非天然型アミノ酸を含む分子量の大きな遺伝的にコードされたタンパク質又は、合成の非天然型アミノ酸を含む低分子のタンパク質の化学的結合が可能である（Miur, et al. Proc. Nat. Ac. Sci., USA 95:6705-6710, 1998; Hoffman and Miur, Current Opinion in Biotech. 13: 297-303, 2002）。ＥＰＬにおいて、組換えタンパク質のチオエステル修飾Ｃ末端は合成ペプチドのＮ末端システインに結合される。したがって、非天然型アミノ酸の組込みは、組換えタンパク質のＣ末端への組込みに限定される。

【０１６１】

アンバー・コドン抑制に基づく生体内における生合成法が、非天然型アミノ酸をタンパク質に部位特異的に組込むことを可能にするために開発されてきた（Noren, et al. Science 244: 182-188, 1989; Bain, et al., J. Am. Chem. Soc. 11:8013-8014, 1989）。この手法には、アンバー抑制因子として所望の非天然型アミノ酸残基を用いて化学的に修飾されたアミノアシルｔＲＮＡが用いられる。この手法において、結果として得られるaa^{u}－ｔＲＮＡは、所望の部位にアンバー・ストップ・コドン（amber stop codon（ＵＡＧ））を有する所望の遺伝子を含むｍＲＮＡ及びＤＮＡとともに試験管内に加えられる。アンバー・コドンのみが抑制に使用可能であるから、この手法によると、一種のみの非天然型アミノ酸を所望のタンパク質に組込むことが可能である。この手法を用いて、ケトン・ハンドル含有アミノ酸（ketone handle-containing amino acid）は生体内において、タンパク質内に部位特異的に組込まれた後、低分子フルオロフォアとビオチン誘導体を用いて修飾される（Wang et al., Proc. Nat. Ac. Sci. USA 100(1):56-61, 2003; Cornish, et al., J. Am. Chem. Soc. 118:8150-8151, 1996）。

【０１６２】

システインの反応性チオール基はタンパク質修飾のために広く用いられてきた。タンパク質修飾の例としては、リボヌクレアーゼＡに対する葉酸の付加（米国特許第６，２８０，９９１号　権利者：Raines　２００１年）、プロテアーゼに対する多価成分の付加（米国特許出願第２００２／０１２７６９５号　出願人：Davies他　２００２年）、様々な生物物理学的なプローブの付加（Gaietta, et al., Science 296:503-507, 2000）が挙げられる。しかしながら１より多いシステイン残基がタンパク質内に存在することと、遊離チオールの存在下でジスルフィド結合が形成されるときに交換反応が起きることにより、システイン残基との部位選択的反応はしばしば複雑化される。直交性の反応性を有する非天然型アミノ酸が利用可能であることにより、一つのシステインを部位特異的に修飾できない場合や、或いは２つの異なる部位特異的修飾が必要である場合にも、タンパク質の部位特異的修飾が可能になる。

【０１６３】

２つの異なる非天然型アミノ酸の部位特異的挿入を可能にする技術として、４塩基コドンを有するｍＲＮＡと、同属の４塩基アンチコドンを有する化学的にアミノアシル化された変異体ｔＲＮＡを使用する方法が用いられてきた（Moore, et al., J. Mol. Biol. 298: 195-209, 2000）。この手法により、２つの異なる非天然型アミノ酸をタンパク質に挿

入することが可能となった（Hohsaka, et al., J. Amer Chem Soc 121: 12194-12195, 1999; Hohsaka and Sisido, Curr. Opin Chem Biol 6: 809-815, 2002）。

【０１６４】

化学的にアミノアシル化された抑制因子ｔＲＮＡを哺乳類細胞内に移入する一般的に使用可能な方法として、アンバー・コドン及びオーカー・コドンの２つの抑制因子を用いる方法が行われてきた。これらコドンはチロシンを用いてアミノアシル化された大腸菌ｔＲＮＡのコドンである。２つの抑制因子はトランスフェクト試薬であるEffecteneを用いて細胞内に移入される。活性クロラムフェニコール・アセチル・トランスフェラーゼが、同時に移入された内部部位にアンバー・コドン又はオーカー・コドンを有するクロラムフェニコール・アセチル・トランスフェラーゼ遺伝子から発現された（Kohrer, et al., Proc Nat Acad Sci. 98:14310-14315, 2001; Kowal, et al. Proc.Nat Acad Sci 98:2268-2273, 2001）。

【０１６５】

生体内における生合成方法を用いると、非天然型アミノ酸を用いたタンパク質修飾が可能である。拡張遺伝コード（expanded genetic code（ＥＧＣ））技術により、遺伝的にコードされた非天然型アミノ酸を、真核生物（例えばSaccharomyces cerevisiae）に組込むこと（Chin et al., Science, 201:964-967, 2003）、及び原核生物（例えば大腸菌）に組込むこと（Wang, et al., Science 292:498, 2001; Doring et al., Sience 292:501-504, 2001）が可能になる。ＥＧＣ技術では、抑制因子ｔＲＮＡ－コドンの対と、非天然型アミノ酸が組込まれたアミノアシル－ｔＲＮＡ合成酵素（ａａＲＳ）が新たに生成される。新たなｔＲＮＡ及びａａＲＳは、クロスアミノアシル化を防止するために、細胞内に存在する内在性ｔＲＮＡ及びａａＲＳに対して直交性でなければならない。また、これらｔＲＮＡ及びａａＲＳは、翻訳装置に対して十分に機能する必要がある（Wang and Shultz, Chem. Comm. 1, 2002）。

【０１６６】

この技術を用いて、新規な機能性を有する１３以上の非天然型アミノ酸が大腸菌内にコードされた（Wang, ph. D. Thesis, UC Berkeley, 2002）。非天然型アミノ酸として例えば、多用途のケト基を有するｐ－アセチル－Ｌ－フェニルアラニンが挙げられる。この多用途のケト基は、ヒドラジン基を含む任意の成分を用いたその後の化学的修飾において、独特な化学的ハンドルとして働く（Wang et al., Proc. Nat. Ac. Sci. USA 100:56, 2003）。遺伝的にコードされたアミノアシル－ｔＲＮＡ合成酵素／ｔＲＮＡ対を用いたＥＧＣ法は、真核生物（Saccharomyces cerevisae）の細胞にも応用されている（Hughes, Funct. Integr. Genomics 2:199, 2002）。直交性対として、大腸菌由来のアンバー抑制因子チロシル－ｔＲＮＡ合成酵素(Tyr-RS)と$tRNA_{CUA}$の対が選択された。Tyr-RSと$tRNA_{CUA}$の両方がS. cerevisaeにコードされているとき、大腸菌Tyr-RSは大腸菌$tRNA_{CUA}$を効率的にアミノアシル化する。しかしながら、この対はS. cerevisaeの細胞質ｔＲＮＡをアミノアシル化しない。加えて、S. cerevisaeアミノアシル－ｔＲＮＡ合成酵素に対しては不十分な基質である。また、大腸菌チロシルｔＲＮＡ$_{CUA}$は、S. cerevisae内のタンパク質翻訳において効率的に機能する（Edwards, et al. Proc. Nat. Ac Sci. USA 88:1153, 1991）。更に、大腸菌は翻訳メカニズムを持たず、したがってｔＲＮＡに結合した非天然型アミノ酸を校正しない。直交性の大腸菌Tyr-RSアミノ酸の特異性を変化させて、このTyr-RSアミノ酸が大腸菌$tRNA_{CUA}$を所望の非天然型アミノ酸を用いてアミノアシル化するようにするために、例えば、ケト・ハンドルを有し、内在性アミノ酸Tys-RSを有さないｐ－アセチル－Ｌ－フェニルアラニンが、１ｍＭのｐ－アセチル－Ｌ－フェニルアラニン残基の存在下で、変異並びに成長を促された。結果として、天然型アミノ酸に対するよりも、ｐ－アセチル－Ｌ－フェニルアラニンに対して高い活性を有することから、変異体Tyr-RSが選択された。ナンセンスコドンTAGに応じて、ケト官能基を有するｐ－アセチル－Ｌ－フェニルアラニンを含む５つの非天然型アミノ酸が、高い忠実度で効率的にタンパク質内に組込まれた（Chin et al., Chem & Biol. 10:511-519, 2003; Chin et al., Science, 301:964-967, 2003）。

【０１６７】
本明細書中で説明するように非天然型アミノ酸をヌクレアーゼにコードすることにより、哺乳類細胞中で抗ウイルス性ヌクレアーゼに対して目的に適った変化を起こすことが可能になる。したがって、遺伝的に修飾されたヌクレアーゼの抗ウイルス特性、例えば、ヌクレアーゼ阻害物質の存在下におけるウイルス核酸に対する加水分解性が、生体内で直接的に機能できる。

【０１６８】
酵素の触媒活性に影響する重要な要素の一つは、酵素とその基質が離れた状態での酵素と基質の間の静電気的相互作用である。ヌクレアーゼの荷電アミノ酸残基とそのプロテイン阻害物質の間の、又はヌクレアーゼとその基質の荷電バックボーンの間のこのような相互作用は、物理的接触が起こる前に、又は荷電成分が何らかの立体障害のために物理的に互いに非接触状態であるときに開始する。「カチオン化された」ヒトデオキシリボヌクレアーゼＩ（＋５の電荷の変化を引き起こす変異を有する）のウイルスＤＮＡバックボーン上の負に帯電したリン酸塩に対する局所的な静電気的引力が増すと、遺伝的に修飾された酵素が、ウイルスＤＮＡへの結合において有効に作用するようになる。このような結合は、ウイルスＤＮＡの血中濃度又は感染細胞内における濃度が低い場合にも起きる。Ｂ型肝炎ウイルスなどの最も攻撃的に複製するウイルスの場合でさえも、例えば、最大ＤＮＡ濃度が10^{10}コピー／ｍＬに達するＢ型肝炎ウイルス（hepatitis B（ＨＢＶ））の場合も、６ｋｂのＨＢＶＤＮＡの重量濃度は３３ｎｇ／ｍＬ以下である。ＨＶＢＤＮＡの最大濃度は、人体における内在性細胞ＤＮＡの典型的な濃度の下限とほぼ等しく、２５ｎｇ／ｍＬ～２５０ｎｇ／ｍＬである（Pan, et al., J. Biol. Chem. 273, No 29: 18374-381, 1998）。大きなｄｓＤＮＡゲノム（１，２２９ｋｂｐ）を有するヒトサイトメガロウイルス（cytomegalovirus（ＣＭＶ））の場合、最大ＤＮＡ濃度は、１０５コピー／ｍＬを超えず、したがってＣＭＶのＤＮＡの重量濃度は１２ｐｇ／ｍＬ以下となる。

【０１６９】
本発明のいくつかの実施形態において、遺伝的に増強されたヌクレアーゼを含有する抗ウイルス性組成物を提供する。この抗ウイルス性組成物は、上記のごとく、生体内で遺伝子コード技術により及び／又は生体外で半合成により作り出される。修飾ヌクレアーゼは非天然型アミノ酸を含む。この非天然型アミノ酸として例えば、天然のレシンの側鎖よりも高い正の電荷を有する大型の側鎖を備える多価リジン（Bioorg. & Med. Che. 7:2985-2990, 1999）、及び／又はケト基を有する非天然型ｐ－アセチル－Ｌ－フェニルアラニン残基（後の化学的修飾において有用である）、及び／又はセレノシステイン、ホモアルギニン、及び／又は１若しくはそれ以上のＤ－アミノ酸などが挙げられる。

【０１７０】
グループＩのｄｓＤＮＡ特異的ヌクレアーゼの遺伝的に増強されたヌクレアーゼの例として、ヒトデオキシリボヌクレアーゼＩの置換物$Q11R/E12KU^{(2+)}/N74KU^{(2+)}/A114FU^{(keto)(+5)}$により得られる高活性アクチン抵抗性特殊変異体が挙げられる。この特殊変異体は、未変性のデオキシリボヌクレアーゼＩより５大きい正の電荷を有する。尚、式中$KU^{(2+)}$は正の電荷２の側鎖アミン基を有する非天然型アミノ酸を表し、$FU^{(keto)}$はケト基を有する非天然型ｐ－アセチル－Ｌ－フェニルアラニン残基を表す。

【０１７１】
遺伝的に増強されたグループＩＶのｓｓＲＮＡ特異的ヌクレアーゼの例として、ヒトリボヌクレアーゼＩの置換物$K1FU^{(keto)}/Q11A/N71A/E111A$により得られるリボヌクレアーゼ阻害物質（ribonuclease inhibitor（ＲＩ））抵抗性の非毒性特殊変異体、置換物$K1FU^{(keto)}/Q11A$により得られる切断型Ｓ－ペプチド（１～１５のアミノ酸残基からなる断片）からなるヒトリボヌクレアーゼ、及び置換物$N71A/G89FU^{(keto)}/E111A$により得られる切断型Ｓ－タンパク質（２１～１２４のアミノ酸残基からなる断片）からなるヒトリボヌクレアーゼが挙げられる。尚、式中$FU^{(keto)}$はケト基を有する非天然型ｐ－アセチル－Ｌ－フェニルアラニン残基を表す。

【０１７２】

本発明の他の実施形態において、抗ウイルス性ヌクレアーゼを化学的／遺伝的修飾した物質には、半合成ヌクレアーゼが含まれる。この半合成ヌクレアーゼは、自然な化学的連結によって、化学的に合成されたペプチドが別のペプチド又はタンパク質にＣ末端チオエステル残基及びＮ末端システイン残基を用いて連結されることにより（Dawson, et al., Science 266:776-779, 1994）、或いはインテインが仲介するタンパク質連結により得られる。インテインが仲介するタンパク質連結においては、連結部位にシステイン残基が必要とされ（Evans, et al. Protein Sci. 7, 2256-2264, 1998）、Ｃ末端チオエステルは、標的タンパク質とインテインからなる融合タンパク質がチオール試薬の存在下で切断されることにより作り出される（Arnold, et al., The Scientific World Journal 2: 1823-1827, 2002）。

【０１７３】

更に別の実施形態において、本発明は加水分解性合成オリゴペプチドを提供する。この加水分解性合成オリゴペプチドの例として、少なくとも１つの天然型アミノ酸残基が非天然型アミノ酸残基により置換されたジペプチド（Ser-His、His-Asp、Cys-His）、トリペプチド（Ser-His-Asp、Ser-His-Gly、Ser-His-His、His-Phe-Asp、His-Lys-His）、テトラペプチド（Glu-His-Asp-His）、ヘキサペプチド（Gly-Phe-Ser-Leu-His-Ala(SEQ ID NO:10）、Phe-Ser-Phe-Leu-His-Ala(SEQ ID NO:11)、Ser-Ser-Phe-Leu-His-Ala(SEQ ID NO:12))、オクタペプチド（Arg-Arg-Trp-His-Arg-Leu-Lys-Glu(SEQ ID NO: 13)）、ウンデカペプチド（Ser-Gly-Gly-His-Gly-Gly-Arg-Gly-Gly-His-Phe(SEQ ID NO: 14)、Ser-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-His-Phe(SEQ ID NO: 15)、Ser-Gly-Gly-Arg-Gly-Gly-His-Gly-Gly-His-Phe(SEQ ID NO:16）)が挙げられる。この置換として、Ser/L-Ser及びD-methyl-Asp/L-Asp、Phe/FU$^{(keto)}$ 及びその他の置換が挙げられる。このような置換の結果、オリゴペプチドのタンパク質分解性と経口での生物学的利用能が向上する。

【０１７４】

本発明の更に別の実施形態において、複数の未変性の又は修飾されたジペプチド／ポリペプチド、ヘキサペプチド、及びウンデカペプチドを提供する。これらの酵素は、感染細胞内の無防備なウイルス核酸を標的とする高分子量の高分子担体と共有結合している。このような酵素を備える抗ウイルス性複合体（antiviral complexes with enzymes（ＡＣＥ））は、治療効率が高いこと、タンパク質分解抵抗性が強いこと、半減期が長いこと、免疫原性が低いこと、及び細胞吸収量が大きいことを特徴とする。

【０１７５】

抗ウイルス性ヌクレアーゼは、高分子担体と、タンパク質化学の分野で既知の１若しくはそれ以上の複数のルートを介して結合可能である。本発明の高分子担体は、１つ若しくは複数の分子スカホールドを備え、１若しくはそれ以上の抗ウイルス性ヌクレアーゼと様々な標的成分をこの分子スカホールドに付着させることが可能である。高分子担体の例として、ポリ（エチレングリコール）（poly(ethylene glycol)（ＰＥＧ））、ＨＰＭＡ（ポリ－［Ｎ－２（２－ヒドロキシプロピル）メタクリルアミド］（Poly-[N-2(2-hydroxypropyl)methacrylamide]））、カルボキシメチルセルロース、デクストラン、ポリビニルアルコール、ポリ－１，３－ジオキソラン、ポリ－１，３，６－トリオキサン、ポリプロピレン・オキシド、ポリ（エチレン／プロピレン・グリコール）、エチレン／マレイン酸無水物共重合体、ポリプロピレン・オキシド／エチレン酸化物共重合体、ポリエチレン・グリコ／リンゴ酸共重合体、ＰＥＧ誘導体（例えばPEG-[NH2]$_n$）、PEG-[Lys]$_n$ 、PEI、PAMAM、PAMAM(EDA)などの共重合体、ポリ（リジン）デンドリマー、及びアミノ酸残基（例えば、ポリ（Lys-Glu）、ポリ（Lys-Ala-Glu-Tyr）など）の重合体や共重合体、及びタンパク質（例えばヒト血清アルブミンなど）、或いはこれらの任意の組み合わせが挙げられる。

【０１７６】

本発明の組成物に好適に使用可能な高分子担体は、分子量が２００ｋＤａ以下のPEG、PEG誘導体、PAMAMデンドリマー及びその誘導体、及びこれらの組み合わせである。PEG及びPEG誘導体に結合されたタンパク質は、タンパク質分解抵抗性が増強され、タンパク質重

合体の水力学的半径が増加した結果として循環半減期が顕著に向上され、抗原性、免疫原性、及び毒性が低減され、溶解度、熱安定性及び機械的安定性が向上されていることが分かっている（Chapman, Adv Drug Del Rev 54:531-545, 2002; Harris, Ed., Poly(Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, Plenum Press, NY, 1991）。

【０１７７】

タンパク質を高分子担体に付着する方法は、１若しくはそれ以上の基のε－アミノ基、ヒスチジンの環状アミン基、又はタンパク質のＮ末端残基のαアミノ酸基をアミド基に非選択的に変換することにより行われる。このアミド基はその後、正の電荷を失う（Abchovsky et al., J. Biol. Chem. 252: 3571-3581 & 3582-3586, 1977; Harris, Ed., Poly(Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, Plenum Press, NY, 1991; Zalipsky, Bioconj. Chem. 6:150-165, 1995; Francis et al., Int. J. Hematol. 68:1-18, 1998）。

【０１７８】

任意のタンパク質について潜在的付着部位が複数あると、修飾の度合が一定せず、タンパク質－重合体複合体内のタンパク質の生物活性は大きく低下する。例えば、スーパーオキシド・ジスムターゼとPEGの非選択的結合により、修飾された酵素のいくつかの分画を不活性化した（McGoff et al., ChemPharm. Bull. 36:3079-3091, 1988）。合成PEG2-IFNとε－アミノ基の枝分かれ状態のｍＰＥＢ２－ＮＨＳ（ω-N-hydroxysuccinimidyl ester）を介する複合体は、約ｐＨ９において、遊離型のインターフェロンの生体内における抗ウイルス活性の約７％のみを保った（Bailon, et al., Bioconj. Chem. 12:195-202,2001）。このε－アミノ基として、インターフェロンα－２ａ（interferon　α－２ａ（ＩＮＦ））の４つのアミノ基Lys^{31}、Lys^{121}、Lys^{131}、Lys^{134}のうちの１つが選択される。

【０１７９】

本発明において、重合体へのタンパク質の部位特異的結合、例えばシステインの部位特異的誘導体化による結合は、タンパク質－重合体の複合体におけるタンパク質の生物学的活性が、予測容易かつ一般的に高いレベルとなる。リジンに比べて、システインがタンパク質内に現れる頻度は低い。リジンがタンパク質内に現れる頻度が全ての残基の５．７％であるのに対して、システインが現れる頻度は１．７％である。多くの場合、システインは、二重スルフィド結合により制限される。部位特異的変異誘発によりタンパク質内に導入された１つのシステインは、マレイミドをベースとする或いはハロアセタミドをベースとするチオール特異的試薬により誘導体化されることができる（Goodson et al., Biotechnology 8, 343-346, 1990; Chikoti et al., Bioconjugate Chem. 5, 504-507, 1994; Messmore, et al. J. Am. Che. Soc. 117 (31):8057-8060, 1995）。

【０１８０】

他の手法では、ポリマーをタンパク質のＮ末端アミノ酸残基に付着させる。例えば、Ｎ末端セリン又はスレオニンを選択的に酸化させて、対応するアルデヒドとした後、ヒドラジン、アルコキシアミン、又はヒドラジド誘導体とカップリングする（Geoghegan and Strogh, Bioconjugate Shem. 3, 138-146, 1992）。最近では、１つのアルデヒド基を有するPEG（mPEG-CHO）が、組換えヒトG-CSF（造血性障害の治療に用いられるタンパク質）及びヒト白血球インターフェロンに結合された。ヒト白血球インターフェロンは一般的に、コンセンサス・インターフェロンIFN-conと呼ばれる（米国特許出願第２００３／００９６４００号　出願日：２００３年５月２２日　出願人：Kinstler））。この反応において、アルコキシル化条件を酸性度ｐＨ４．０に下げて、タンパク質のアミノ末端のαアミノ基を選択的に活性化する。６ｋｄａのPEGがＮ末端に結合してなるC-CSFは、生体内で６８％の活性を保つ。一方で、PEGがリジン及びＮ末端アミンの両方に対して非選択的に結合した同じタンパク質はその活性の２１％しか維持できない。Ｎ末端修飾の有利性は蛋白質ごとに異なり、１２ｋＤａのＰＥＧがそのＮ末端に結合してなるIFN-conは２０％の生体内活性しか維持できないことが示されている（米国特許出願第２００３／００９６４００号　出願日：２００３年５月２２日　出願人：Kinstler）。

【０１８１】
ヘテロ型二官能性PEG誘導体、例えばω－Ｎ－ヒドロキシサキニミジル・エステル－ＰＥＧ－プロピオンアルデヒド（ω-N-hydroxysuccinimidyl ester-PEG-propionaldehyde（NHS-PEG-CHO））及び多価高分子担体を、本発明の抗ウイルス性ヌクレアーゼを様々な薬剤輸送増強リガンドへ結合するために使用できる。例えば、弱アルカリ性条件下（約ｐＨ８．０）で、ＮＨＳ基をリジン末端リガンドのε－アミノ基に結合することができる。また、酸性度約ｐＨ５．０の条件下で、ＣＨＯ基をヌクレアーゼＮ末端のα－アミノ基に結合することができる。

【０１８２】
Ｃ末端の部位特異的ＰＥＧ誘導体化は従来、短い合成ペプチドを用いて行われてきた。βペプチド（β－アミロイド前駆体タンパク質の４０～４３のアミノ酸からなるタンパク質分解性断片）が、PAP Tenta-Gel（登録商標）の標準Ｆｍｏｃプロトコルにしたがって、３ｋＤａのＰＥＧと、そのＣ末端を介して結合されてきた（Burkoth et al., J. Am. Chem. Soc.120:7655-7656, 1998; Bayer and Rapp in Poly(Ethylen Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, M. Harris Rd, Plenum Press, NY pp. 325-345, 1992）。固相戦略及び液相戦略のそれぞれを用いて、ヒト成長ホルモン放出因子（human growth hormone-releasing factor（ｈＧＲＦ））類似体が、Ｃ末端においてペグ化された。それぞれのペプチドは、$(Gly)_2$-Cys-NH_2スペーサ（固有の生物学的活性を変化させないことが分かっている）を用いて伸長され、Ｘ試薬及びジチオピリジル－ＰＥＧ試薬を用いてＣ末端においてペグ化された（Campbell, et al., J. Pept. Res. 49:527-537,1997）。

【０１８３】
本発明の一実施形態において、Ｃ末端に$(Gly)_n$-Cys延長を有する遺伝的に修飾されたヌクレアーゼのＣ末端修飾が、Ｓ－シアノシステイン（S-cyanocysteine）(Cys-CN)変換化学を用いて行われた。Ｃ末端にペプチド$(Gly)_m$-Cys（ｍは２から４の数）が付加された遺伝的修飾ヒトデオキシリボヌクレアーゼＩが、固体樹脂上で固定化されたアミノ基末端ＰＥＧに共有結合された。重合体を有するこのアミノ基は、複数アームの分枝状R-[PEG-NH_2]$_n$、[PEG-Lys]$_n$、NH_2末端デンドリマー、PEI-PEG共重合体、及びその他の重合体を備えることができる。この反応において、Ｃ末端のシステイン残基の切断が起きる。タンパク質内の遊離システイン残基のＳ－シアノシステイン（S-cyanocysteine(Cys-CN)）残基への変換は、２－ニトロ－５－チオシアン安息香酸試薬を用いて、穏やかな条件下で行われる（NTCB; Takenawa, et al. J. Biochem. 123:1137-1144, 1998; Jacobson, et al., J. Biol. Chem. 248(19):6583-6591, 1973; Degani and Patchornik, J. Org. Chem. 36:2727, 1971）。

【０１８４】
本発明の関連する実施形態は、遺伝的に修飾されたヌクレアーゼを提供する。このヌクレアーゼは、そのＮ末端又は／及びＣ末端がヒトアルブミンと融合されたヒトアルブミン融合抗ウイルス性ヌクレアーゼである。ヒトアルブミン融合抗ウイルス性ヌクレアーゼは、抗ウイルス性ヌクレアーゼをＨＡの内部領域に挿入することによっても生み出されることが可能である。抗ウイルス性ヌクレアーゼ（例えば、ヒトデオキシリボヌクレアーゼＩ，デオキシリボヌクレアーゼα、デオキシリボヌクレアーゼβ、デオキシリボヌクレアーゼγ、ヒトリボヌクレアーゼＩ，ヒトリボヌクレアーゼＩＩＩなど）の融合は、米国特許出願第２００３０１７１２６７号（出願日：２００３年１１月１１日　出願人：Rosen, et al.）の方法を用いて実行できる。この文献の内容は全て参照により本明細書中に組込まれる。この方法は、様々なヒトアルブミン融合タンパク質に対して使用できる。ヒトアルブミン融合タンパク質として、米国特許出願第２００３０１７１２６７号の表Ｉに挙げられた治療用タンパク質、例えば、ヒトインターフェロン、成長ホルモン、インターロイキン－２、カルシトニンなどを例示できる。

【０１８５】
本発明の更に別の実施形態において、本発明により提供される抗ウイルス性組成物は、

未変性の抗ウイルス性ヌクレアーゼ及び／又は化学的／遺伝的に増強された抗ウイルス性ヌクレアーゼである。これらの抗ウイルス性組成物は、ヘテロ型二官能性高分子化合物と共有結合される。ヘテロ型二官能性重合体は、直接に又は多価の分枝スカホールド（例えばデンドリマ又は星型重合体）を介して、様々な機能を有する複数の標的リガンドと結合される。

【０１８６】

本発明の他の実施形態は、多価の分子スカホールドからなる「シェル・コア」複合体と、このような複合体の製造方法を提供する。多価分子「シェル」スカホールドの末端基（例えばPAMAMデンドリマ）は、部位特異的オリゴヌクレオチドを含むように化学的に修飾される。この部位特異的オリゴヌクレオチドは、ワトソン・クリック・ハイブリダイゼーションを受けた後、相補的ヌクレオチドと共有結合を形成する。相補的ヌクレオチドは、同様に修飾された「コア」デンドリマーに結合される。

【０１８７】

オリゴ・デオキシヌクレオチド又はポリ・デオキシヌクレオチドそれぞれの相補的塩基対を形成する共有結合は、二官能性試薬を用いて行うことができる。二官能性試薬の例として、ヘテロ型二官能性ポリアルキル化剤であるＮ，Ｎ，Ｎ’－トリ－（β－クロロエチル）－Ｎ’－（ｐ－ホルミルフェニル）プロピレンジアミン－１，３が挙げられる。この試薬は、オリゴ・デオキシヌクレオチド又はポリ・デオキシヌクレオチドに、高反応性脂肪族βクロロエチルアミノ基を介して結合される。潜在的に活性な芳香族アルキル化基の反応性は、隣接するホルミル基により抑制される。芳香族アルキル化基は、オリゴヌクレオチドの塩基対形成の後必要なときに活性化される。この活性化は、水素化ホウ素ナトリウムを用いてホルミル基を還元することにより行われる。オリゴヌクレオチドの好適な例として、ヌクレアーゼ抵抗性かつ非毒性のロックされた核酸（Locked Nucleic Acids（LNA））が挙げられるが、任意の修飾されたヌクレアーゼ抵抗性アンチセンス・オリゴヌクレオチドをこの目的で使用可能である。ＬＮＡは、２’－酸素及び４’炭素原子間のメチレン架橋により、糖－リン酸塩バックボーン内のリボース分子が構造的に制限された二環性ＲＮＡ類似体である（Koshkin, et al;. Tetrahedron 54) 3607-3630, 1998; Koshkin, et al. J. Am. Chem. Soc. 120: 13252-13253, 1998）。

【０１８８】

標的化リガンドは、ウイルス核酸の標的配列に対して部位特異的に修飾されたオリゴマーを含むことができる。標的化リガンドは更に、以下のうち１若しくはそれ以上を含むことができる。すなわち、ｂｓ－ＰＮＡを含むペプチド核酸（peptide nucleic acids（ＰＮＡ））、一本鎖及び二本鎖のＤＮＡ及びＲＮＡと安定した二本鎖を形成可能なロック又は架橋された核酸（Locked or bridged nucleic acids（ＬＮＡ／ＢＮＡ））、二本鎖及び一本鎖ウイルスＤＮＡ及びウイルスＲＮＡと部位特異的に結合するホスホロアミデート・オリゴヌクレオチド、ホスホロアミデート基によりに互いに結合されたモルフォリノ・ヌクレオチドを有するとともにｓｓＲＮＡと安定した部位特異的複合体を形成したモルフォリノ・オリゴヌクレオチド、Ｓ－ＤＮＡ（ホスホロチオエート）、相補的ｓｓＲＮＡ及びｓｓＤＮＡに対して非常に高い親和性を有するとともにＤＮＡ及びその他のオリゴマーと比べてＲＮＡに動力学的結合特異性を示すピロリジン・アミド・オリゴヌクレオチド模倣薬ＰＯＭ、ヘアピン・ポリアミド、一本鎖及び二本鎖ウイルス核酸に対する結合親和性を有するジンクフィンガー・ペプチド（Koizumi et al., Nucleic Acids Res. 31, 3267-3273, 2003; Hickman, et al., Chem Commun. 32:2251-2252, 2000）、及び新規な種類の修飾ペプチド核酸（例えば、ヒドロキシプロリン・ペプチド核酸（hydroxyproline peptide nucleic acids（HypNA））、セリン・ペプチド核酸（serine peptide nucleic acids（SerNA））オリゴヌクレオチド類似体の単量体、ホモ二量体、及びヘテロ二量体、並びにこれらのホモ重合体及びヘテロ重合体、及びその他のオリゴヌクレオチド類似体、例えば米国特許出願第２００３／００５９７８９号（出願日：２００３年３月２７日、Efimov, et al.）が挙げられる。

【０１８９】

リボース、デオキシリボース、２’－４’－環状リボース、ペントースのその他の誘導体、或いはこれらに類するものと結合された標準的塩基（例えば、アデニン、チミン、ウラシル、シトシン、グアニンなど）、リボース、デオキシリボース、２’－４’－環状リボース、ペントースのその他の誘導体、或いはこれらに類するものと結合された天然及び合成の微量塩基（例えばジヒドロウラシル、４－チオウラシル、擬ウラシル（pseudouracil）、ヒポキサンチン、ワイブトシン、５’－ウラシル、５－メチルグアニン、５－メチルシトシン、５－メチルアデニン、２’－Ｏ－メチルシトシン、１－Ｎ－メチルアデノシン、２，２－Ｎ－ジメチルグアニン、７－メチルグアニン、及びこれらに類するもの）を用いてヌクレオチドを形成することができる。ヌクレオチドを形成するとき、これらはリン酸化される。ペントース２－Ｏ－４’－Ｃ－メチレン架橋を含むヌクレオチドからなるオリゴ・ヌクレオチド及びポリ・ヌクレオチドは、ロックされた核酸（locked nucleic acid（ＬＮＡ））又は架橋された核酸（bridged nucleic acid（ＢＮＡ））を形成する（Petersen and Wengel, Trends in Bioche. 21, 74-81, 2003）。２－Ｏ－４’－Ｃ－エチレン架橋核酸（ethylene-bridged nucleic acids（ＥＮＡ））は、ＲＮＡ及びＤＮＡの相補的ヌクレオチド配列に対して特に強く塩基対化される（Koizumi et al., Nucleic Acids Res. 31, 3267-3273, 2003）。ＰＮＡ、ＬＮＡ／ＢＮＡ、ＥＮＡ、ホスホロチオエート及びホスホラミデート・オリゴ・ヌクレオチド、並びにホスホロチオエート及びホスホラミデート・ポリ・ヌクレオチドはヌクレアーゼ抵抗性である。一本鎖及び二本鎖ウイルスＤＮＡ及びＲＮＡの選択されたヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列を有するヌクレアーゼ抵抗性オリゴヌクレオチドを含む標的化リガンドは、組成物中で標的化作用を発揮する。すなわち、このような標的リガンドは、ヌクレアーゼ複合体又はヌクレアーゼ重合体複合体を、ウイルス感染細胞内のウイルス核酸に作用させることができる。

【０１９０】

ヌクレアーゼによる標的ウイルス核酸の加水分解のための標的化リガンドとしての役割に加えて、配列特異的オリゴマーは様々な経路を介して独自の抗ウイルス作用を示す。例えば、これには限らないが、ホスホロチオエート／２’－Ｏ－メチル・バックボーンを有するアンチセンス・オリゴヌクレオチドが挙げられる。リボースを２’－位置においてメチル化すると、毒性の副作用を大幅に低減し、抗ウイルス性効力を高めることができる。例えば、ｇｐ１２０とＣＤ４の間の相互作用をブロックすることにより（Kuwasaki, et al., J. Antimicrob. Chemo. 51:813-819, 2003; Stein, et al., J. AIDS 4: 686-93, 1991）、或いは、内在性リボヌクレアーゼＨによる標的核酸配列の分解を引き起こすことにより（Mishra, et al., Bioche. Pharm. 61:467-76, 2001）、ヒト免疫不全ウイルス１（human immunodeficiency virus 1（ＨＩＶ－１））が抑制される。

【０１９１】

ＲＮＡ－ＤＮＡ複合体形成による翻訳段階の阻害に加えて、アンチセンス・ホスホロチオエート・オリゴヌクレオチドは、非部位特異的方法で急性感染細胞内のＨＩＶ－１の増殖を阻止することが分かっている（Matsukura, et al., Proc. Nat. Ac. Sci., USA 84: 7706-10, 1987）。この非部位特異的な増殖阻止は、逆転写酵素（reverse trascriptase（ＲＴ））の阻害により行われる（Bioziau, et al., Proc. Nat. Ac. Sci., USA 89:768-72, 1992; Majumdar et al, Biochem. 28:1340-6, 1989）。ホスホロチオエート含有オリゴヌクレオチドは、トリ骨髄芽球症ウイルス（avian myeloblastosis virus（ＡＭＶ））ＲＴ、ＰｏｌＩ（クレノウ断片）、ヒトポリメラーゼα、β、及びγ（Marshall, et al., Proc. Nat. Ac. Sci., USA 89:6265-6269, 1992; Gao, et al., J. Biol. Chem. 264: 11521-11526, 1989）、及びヒトＤＮＡポリメラーゼ並びにリボヌクレアーゼＨ（Gao, et al., Mol. Pharmc. 41:223-229, 1992）。グアニンに富んだ短いオリゴヌクレオチドは、ｇｐ１２０／ＣＤ４相互作用又はＨＩＶ組込み酵素活性を妨げる（Jing Expert Opin. Investigate. Drugs 9: 1777-1785, 2000）。これらのオリゴマーはグアニンの環状四量体（G-quartetes）により安定化された四量体を形成し、抗ＨＩＶ－１活性を発揮する（Jing, et al., J. Biol. Chem. 275, 3421-30, 2000）。

【０１９２】

本発明の抗ウイルス性ヌクレアーゼ由来組成物の例として、膜透過型ペプチド（membrane permeating peptide（ＭＰＰ））が挙げられる。ＭＰＰは、巨大分子ヌクレアーゼと、ヌクレアーゼと重合体の複合体の細胞内輸送を促進する。ポリ（アルギニン）ベースのＭＰＰが様々な化合物の上皮細胞（例えば、皮膚、消化管、肺上皮、及びこれらに類するもの）上での輸送を促進する薬剤担体として提案されてきた（米国特許出願第２００３／００８３２５６号（出願日：２００３年５月、出願人：Rothbard, et al.））。ＭＰＰは、様々な外来性分子の細胞内輸送のための担体分子として用いられてきた。外来性分子としては、例えば、膜透過性の低い小さな生体活性分子（例えば、シクロスポリンＡ（Rothbard et al., Nat. Med. 6:1253-1257, 2000）及びオリゴＤＮＡ（Astriab-Fisher et al., Biochem. Pharmacal. 60:83-90, 2000）、及び分子量１２０ｋＤａ以下のタンパク質（Schwarz, et al., Science, 285:1569-1572, 1999）、直径４５ｎｍの磁気ビーズ（Lewin, et al. Nat. Biotechno. 18:410414, 2000）、及び直径２００ｎｍのリポソーム（Torchilin, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98:8786-8791, 2001）を例示できる。ＭＭＰの例としては、これには限らないが、ポリ（Arg/Lys）ペプチド、ＮＩＶ－ＴＡＴ由来のアルギニン・リッチ・ペプチド、アンテナペディア、ＥＴＡ、核局在シグナル（nuclear localization signals）、核外輸送シグナル（nuclear export signals）が挙げられる。核局在シグナル、核外輸送シグナルの例としては、HIV TAT_{47-57}: YGRKKRPQRRR (SEQ ID NO: 17)、ショウジョウバエ・アンテナペディア（ANTp16）:RQIKIWFQNRRMKK(SEQ ID NO: 18)、W/R: RRWRRWWRRWWRRWRR (SEQ ID NO. 19)、AlkCWK_{18}: CWK_{18}(SEQ ID NO. 20)、Di-CWK_{18}: K_{18}WCCWK_{18}(SEQ ID NO. 21)、トランスポルタン（transportan）: WTLNSAGYLLGKINLKALAALLAKKIL (SEQ ID NO. 22)、DipaLytic: GLFEALEELWEAK (SEQ ID NO:23)、K_{16}RGD: K_{16}GGCRGDMFGCAK_{16}RGD (SEQ ID NO. 24)、P1: K_{16}GGCMFGCGG (SEQ ID NO. 25)、P2: K_{16}ICRRARGDNPDDRCT (SEQ ID NO. 26)、P3: KKWKMRRNQFWVKVQRbAK(B)bA (SEQ ID NO. 27)、P3a: VAYISRGGVSTYYSDTVKGRFTRQKYNKRA (SEQ ID NO: 28)、P9.3: IGRIDPANGKTKYAPKFQDKATRSNYYGNSPS (SEQ ID NO. 29)、Pep-1: KETWWETWWTEWSQPKKKRKV (SEQ ID NO: 30)、Plae: PLAEIDGIELTY (SEQ ID NO: 31)、Kplae: K_{16}GGPLAEIDGIELGA (SEQ ID NO: 32)、cKplae: K_{16}GGPLAEIDGIELCA (SEQ ID NO: 33)、MGP: GALFLGFLGGAAGSTMGAWSQPKSKRKV (SEQ ID NO: 34)、HA2: WEAK(LAKA)$_2$LAKH(LAKA) $_2$LAKC (SEQ ID NO: 35)、LARL4_6: (LARL) $_6$NHCH_3) (SEQ ID NO: 36)、Hel-11-7: KLLKLLLKLWLLKLLL (SEQ ID NO: 37)、KK: (KKKK)$_2$GGC (SEQ ID NO: 38)、KWK: (KWKK)$_2$GCC (SEQ ID NO: 39)、RWR: (RWRR)$_2$GGC (SEQ ID NO: 40)、SV40NLS7: PKKKRKV (SEQ ID NO: 41)、NLS12: PEVKKKRKPEYP (SEQ ID NO: 42)、NLS12a: TPPKKKRKVEDP (SEQ ID NO: 43)、
SV40 NLS13: GGGGPKKKRKVGG (SEQ ID NO: 44)、AV NLS13: GGGFSTSLRARKA (SEQ ID NO: 45)、AV RME NLS17: CKKKKKKSEDEYPYVPN (SEQ ID NO: 46)、AV FP NLS28: CKKKKKKKSEDEYPYVPNFSTSLRARKA (SEQ ID NO: 47)、SV40 N1 NLS24: LVRKKRKTEEESPLKDKDAKKSKQE (SEQ ID NO: 48)、及びLoligomer: K $_9$$K_2$$K_4$$G_8GK_5$ (SEQ ID NO: 49)が挙げられる。ＭＰＰの特性ついては、Futaki et al, J. Mol. Recognit. 16:260-264, 2003、 Fischer, et al., J. Biol. Chem, 279(13): 12625-12635, 2004、 Wedia and Dowdy, Curr. Protein Pept. Sci. 4: 97-104, 2003、及びProchiantz, Curr. Opin. Cell. Biol. 12: 400-406, 2000、Schwartz and Zhang, Curr. Opin. Mol. Therap. 2(2): 162-167, 2000に概説されている。

【０１９３】

ＰＮＡ－ＰＥＧ複合体であるＰＮＡ－ＰＥＧ－Ｒ８、ＰＮＡ－ＰＥＧ－D_{SH}、及びＰＮＡ－ＰＥＧ－ＤＳＰＥを用意し、細胞培養液に直接添加することにより、ヒト細胞への取り込みを試験する。カバーガラス上で成長したＨｅＬａ細胞を、それぞれのＰＮＡ－ＰＥＧ複合体５μＭを用いて無血清培地で一晩培養した後固定し、蛍光顕微鏡で検査する。３つの化合物ＰＮＡ－ＰＥＧ－D_{SH}、ＰＮＡ－ＰＥＧ－Ｒ８、及びＰＮＡ－ＰＥＧ－ＤＳＰＥの全てが、核内ではなく細胞質内に分布していることが示された。これらの結果は、Ｒ８といったＭＰＰを含む複合体の細胞内への取り込みにエンドサイトーシスの経路が使用されることを示す。これらのデータは、細胞透過性ペプチドと、細胞透過性ペプチド

とペプチド核酸の複合体の細胞内移行にエンドサイトーシスが関与していることを示す（Richard et al., J. Biol. Chem. 278(1):585-590, 2003、 Console, et al., J. biol., Chem., 278(37): 35109-35114, 2003、及びDrin, et al., J. Biol. Chem., 278(33): 31192-31201, 2003）。

【０１９４】

本発明の抗ウイルス性ヌクレアーゼ由来組成物に対する標的化リガンドは更に、細胞表面レセプター認識リガンド（Ｔ－ＣＳＲ）を含むことができる。細胞表面レセプター認識リガンドは特定のウイルスの宿主細胞により発現された宿主細胞表面レセプター（cell surface receptors（ＣＳＲ））に対して高い結合親和力を示すリガンドを認識する。Ｔ－ＣＳＲの例として、８つのアミノ酸からなるＴペプチド（ASTTTNYT; SEQ ID NO: 1）及びその他の短い合成ペプチドが挙げられる。短い合成ペプチドは、ＨＩＶ－Ｉのエンベロープタンパク質ｇｐ１２０及びその他のウイルス蛋白質由来の合成ペプチドで、ＨＩＶｇｐ１２０断片（残基４１４－４３４）に対して部分的なアミノ酸配列相同性を有し、ＣＤ４レセプターを含む一次宿主Ｔ細胞を標的とする（Chersi et. al., Viral. Immunol. 12(4):547-554, 2000; Pert, et al., Proc. Nat. Acad. Sci., USA 83:9254-9258, 1986）。ウイルス特異的Ｔ－ＣＳＲの別の例として、ヒトパピローマウイルス型１６カプシドタンパク質中の正の電荷を有する配列を含むペプチドが挙げられる。ヘパリン及びＤＮＡ結合配列を含むように合成されたこのようなペプチドは、トランスフェクション剤として、ヘパラン硫酸レセプターを介する標的細胞の細胞質内へ薬剤輸送の役割を果たす。このようなペプチドは、一度細胞の核内に入ると、核局在因子（nuclear localization factor（NLS））として働く（Bousarghin, et al., J. Gen. Virol. 84:157-164, 2003）。

【０１９５】

本発明の複合体に有用なＴＣＲの更に別の例として、カチオン非依存性のマンノース－リン酸塩レセプター（mannose-phosphate receptors）を標的とするマンノース－６－リン酸塩（mannose-6-phosphate（Ｍ－６－Ｐ）が挙げられる。２つのＭ－６－Ｐレセプター、すなわち４６ｋＤａのカチオン依存性ＭＰＲ（Cation-dependent MPR（ＣＤ－ＭＰＲ））と、３００ｋＤａのカチオン非依存性Ｍ－６－Ｐ／インスリン様成長因子ＩＩ（insulin-like growth factor-II（ＩＧＦ－ＩＩ））レセプター（ＣＩ－ＭＰＲ）は内在性膜糖タンパク質である。ＣＩ－ＭＰＲ細胞質外ドメインは、２つの別個のＭ－６－Ｐ結合部位と、１つのＩＧＦ－ＩＩ結合部位を含む。一方でＣＤ－ＭＰＲは１つのＭ－６－Ｐ結合部位を含み、ＩＧＦ－ＩＩと結合しない（Ghosh, et al., Nature 4:202-212, 2003）。両方のレセプターは、細胞膜上に非共有結合二量体として存在する。これらの二量体により、Ｍ－６－Ｐ残基に対して多価であるリガンドの高親和性結合が可能になる（Byrd, et al., J. Biol. Chem. 275:18638-18656, 2000）。単純ヘルペスウイルスは、マンノース－６－リン酸塩により修飾された糖タンパク質Ｄ（glycoprotein D（ｇＤ））を含む。このｇＤは、ＣＩ－ＭＰＲとＣＤ－ＭＰＲの両方に活発に結合する。ＨＳＶは、異なる複数の細胞表面レセプターを順番に用いて細胞に入る。ＨＳＶは最初、細胞膜上に多く存在する成分であるヘパラン硫酸のグリコサミノグリカン（glycosaminoglycan（ＧＡＧ））とコンドロイチン硫酸のグリコサミノグリカンに吸収される。（Shieh, et al., J. Cell. Biol. 116:1273-1281, 1992; Leduc, et al., Abstract C-90 of the 18th Intern. Herpes Workshop, 1993）。その後ＨＳＶは、ＭＰＲなどの他のレセプターと相互作用する（Brunetti, et al., J. Virol. 69(6): 3517-3528, 1995）。ＭＰＲはＨＳＶの細胞内への侵入を助ける。細胞表面においてほぼ例外なくクラスリン被覆小窩に見られるＭＰＲもまた、ヒトデオキシリボヌクレアーゼＩに加えて、細胞外のリソソーム酵素と結合し、これらの酵素をエンドソームとリソソームに作用させることが示されている（Oliveri, et al., Eur. J. Immunol. 34:273-279, 2004; Ghosh, et al., Nature 4:202-212,2003）。

【０１９６】

Ｔ－ＣＳＲの更に別の例として、葉酸標的葉酸塩レセプター－α（folate receptor-α（ＦＲ－α））が挙げられる。このレセプターは、ｓｓＲＮＡフィロウイルス（例えば、マールブルグ（Marburg（ＭＢＧ））及びエボラ（ebola（ＥＢＯ））の細胞内侵入にお

ける重要な補助因子であると特定されている（Chan, et al., Cell 106:117-126, 2001）。Ｔ－ＣＳＲの更に別の例は、インフルエンザウイルス感染において生じる。インフルエンザウイルス感染は、ウイルスの赤血球凝集素タンパク質とシアル酸含有細胞レセプターの間の相互作用により開始される（Mochalova, et al. virology 313(2):473-480, 2003）。シアル酸結合配列を含む合成ペプチドは、標的化リガンドとして働いて、抗ウイルス性ヌクレアーゼをウイルス宿主細胞に作用させることができる。この相互作用は、他の多くの結合システムと少なくとも同程度、或いはそれより高い程度の炭水化物－タンパク質特異性を有する。例えば、治療薬の標的化導入のための炭水化物リガンドについては、例えばDavis et al., Curr. Opin. Drug. Disc. & Dev. 5(2): 279-288, 2002、Rihova, Adv. Drug Deliv. Rev. 29: 273-289, 1998、及びYamazaki, et al., Adv. Drug Deliv Rev. 43:225-244, 2000に概説されている。このような相互作用には、タンパク質とポリペプチドの両方（Opanasopit, et al. Am J. Physiol Gastrointest Liver Physiol 280:G879-G889, 2001）及び他の小分子を含むＨＰＭＡのような非天然型ポリマ（Julyan, et al., J. Control Release 57:281-290, 1999）が関与している。

【０１９７】

高分子担体により輸送される標的化リガンドは、感染細胞の膜上で発現したウイルス糖タンパク質に対して特異的な結合親和力を有する１若しくはそれ以上の様々な細胞表面レセプター（cell surface receptors）自体も備える。この細胞表面レセプターの例として、Ｔ４細胞レセプターＣＤ４、コレセプタＣＣＲ５及びＣＸＣＲ４が挙げられる。ＣＣＲ５及びＣＸＣＲ４は、ＨＩＶ糖タンパク質ｇｐ１２０ＣＳＲに対して親和性を有し、ＨＩＶ感染細胞膜及びその他のウイルスに感染した細胞の膜上で発現する。葉酸塩レセプター（folate receptor α（ＦＲα））を、マールブルグ（Marburg（ＭＢＧ））ウイルス又はエボラ（Ebola（ＥＢＯ））ウイルスに感染した細胞を標的化するために用いることができる。

【０１９８】

現存する有用な抗ウイルス剤は比較的少数であり、これら薬剤に作用されやすいウイルスも少数である。ウイルス複製サイクルの特定の面に作用する有効な抗ウイルス剤の開発は、耐性ウイルス株の急速な進化により深刻に妨げられている。ウイルスの耐性により、抗ウイルス治療が失敗する頻度が増すだけでなく、その後の治療の有効性も制限される。更に、薬剤耐性に対抗しようという試みから、複雑で且つ効果と毒性の強い薬剤の投与が行われるようになっている。抗ウイルス剤への耐性は、ＨＩＶに限られた問題ではなく、抗ウイルス剤が開発されてきた全てのウイルス（例えばヘルペスウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス、Ｃ型肝炎ウイルス、インフルエンザウイルスなど）について見られる問題である。

【０１９９】

試験管レベルでは、全てのウイルスの全ての既存の治療剤に対する耐性を当業者に既知の簡単な方法で観察可能である。すなわち、それぞれの抗ウイルス剤について、徐々に高濃度の薬剤を用いた培地でウイルスを増殖させることにより観察可能である。抗ウイルス性治療剤に対するウイルスの耐性は、治療を受けた患者と新たに感染した患者のいずれからも単離されている。ウイルス耐性のメカニズムとして、点突然変異、組換え、遺伝子増幅が挙げられる。ウイルスＲＮＡゲノムにおける突然変異は、ＤＮＡウイルスのゲノムにおける突然変異と比べて高い頻度で発生する。これは、ＲＮＡポリメラーゼが、ＤＮＡポリメラーゼと異なり、校正メカニズムを有さないからである。例えば、ＨＩＶ－Ｉの逆転写酵素は１０００のコピーされた塩基中、平均で１つのエラーを生じる。よって、１つの感染個体において、１日あたり約１００億の単一点突然変異体ウイルスＲＮＡが生み出される。他にも、異なる株のウイルスのゲノムが組み替えられることにより、遺伝的変異が生み出される。これは、異なる株の２つのウイルスが同時に同じ細胞に感染して、これらウイルスの転写遺伝子のセグメントが、子孫ウイルスのゲノムに組み替えられるときに起きる。

【０２００】

１つの薬剤に対する高いレベルの耐性は、単一の突然変異が原因と考えられる。例えば

、ＨＩＶ－Ｉ感染個体に対してラミブジン又はネビラピンを用いて単剤療法を行うと、１ヶ月程度の治療で高いレベルの耐性が生まれる。その他のいくつかの抗ウイルス剤の場合、耐性の発生には、２つ又は３つの突然変異が重なるというより複雑な条件が必要である。このような例として例えば、抗ＨＩＶ薬剤（例えばジドブジン及びいくつかのプロテアーゼ阻害剤）を用いて単剤治療を行うと、６ヶ月又はそれ以上が経過後に耐性が発生する。いくつかの場合、１つの薬剤に対する耐性を発生させる突然変異は、そのウイルスを他の抗ウイルス剤に感作されるウイルスに変えることがある。例えば、ＨＩＶ－ＩＲＮＡのＲＴ位置１８４での突然変異は、ラミノブジンに対する高いレベルの耐性を生じさせるが、同時にそのウイルスをジブドジンに感作されるウイルスに変える。このことは、ジドブジンとラミブジンを組み合わせた治療の基礎となっている。ＨＩＶに関する初期の研究により、ジドブジン耐性ＨＩＶは複製能力が低下しており、薬剤の影響を受けない野生種のウイルス株と比べて感染力が低いことが示されている。それ以来、薬剤耐性ＨＩＶの感染は、性的な垂直感染で非経口の経路での感染が観察されている。薬剤耐性変異ウイルスは、ＨＩＶ抗体陽転直後の個体においても観察されている。

【０２０１】

ヌクレアーゼ・ベースの抗ウイルス製剤の最も際立った特徴は、変異により、用いられる薬剤に対する耐性に関与するウイルスＤＮＡ又はウイルスＲＮＡ内のヌクレオチドの順序が変わっても、ヌクレアーゼの抗ウイルス活性に影響を及ぼさないことである。ヌクレアーゼは、保護されていないウイルス核酸を損傷することによりウイルスを殺す。ウイルス核酸の損傷は、ウイルスＤＮＡ及びウイルスＲＮＡ分子のヌクレオチド間のリン酸ジエステル結合を切断することにより行われる。ウイルス核酸内におけるリン酸ジエステル結合とヌクレアーゼ抵抗性結合の置換には、ウイルス核酸の合成に関与する数十種類のウイルス酵素と細胞酵素の両方の性質に大きな変化が必要である。抗ウイルス性ヌクレアーゼを従来の単剤療法の処方計画に用いると、薬剤耐性変異体の発生を引き起こすか、或いはこれらの薬剤耐性変異体の生存及び／又は感染の機会を低減する。一方で、単剤療法で抗ウイルス性ヌクレアーゼを用いると、２若しくは３種の従来の抗ウイルス性薬剤を用いる併用療法と比べて毒性が低い。

【０２０２】

本発明はまた、ヒト及び非ヒト動物、昆虫、及び植物のウイルス性疾患を治療するための方法を提供する。この方法において、ウイルス・グループに特異的なヌクレアーゼ由来の抗ウイルス性組成物が、従来の単剤療法の投与薬剤と組み合わせて投与される。この方法は、薬剤耐性変異体の発生を完全に防止し、又は薬剤耐性変異体の生存及び／又は感染の機会を低減する。一方で、このような治療方法は、２若しくは３種の抗ウイルス性薬剤を用いる従来の併用療法と比べて毒性が低い。

【０２０３】

本発明はまた、ヒト及び非ヒト動物、昆虫、及び植物のウイルス性疾患を治療するための方法を提供する。この方法において、ウイルス・グループに特異的な「カクテル」が投与される。このカクテルは、本発明のヌクレアーゼ由来の抗ウイルス性組成物の混合物を含む。抗ウイルス性カクテルのそれぞれは、複製、すなわち標的となるウイルスのライフサイクルの間に生じる１若しくはそれ以上の様々な中間複製形態のウイルス核酸に対する加水分解活性を有する。

【０２０４】

本発明の一実施形態は、グループＩのｄｓＤＮＡウイルス、グループＩＩのｓｓＤＮＡウイルスが引き起こすウイルス性疾患の予防及び治療のための方法を提供する。予防及び治療は、グループＩのｄｓＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＩのｓｓＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＶのｓｓＲＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＶＩの非特異的ヌクレアーゼ、及びグループＶＩＩの人工ヌクレアーゼからなるヌクレアーゼの群から選択される抗ウイルス性ヌクレアーゼを投与することにより行われる。ヌクレアーゼのグループは、本明細書中に説明されるヌクレアーゼ分類法にしたがって定められる。

【０２０５】

本発明の別の実施形態は、グループＩＩＩのｄｓＲＮＡウイルス又はグループＩＶのｓｓ（＋）ＲＮＡウイルスが引き起こすウイルス性疾患を予防及び治療するための方法を提供する。この方法において、グループＩＩのｓｓＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＩのｄｓＲＮＡ特異的なヌクレアーゼ、グループＩＶのｓｓＲＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＶＩの非特異的ヌクレアーゼ、及びグループＶＩＩ人工ヌクレアーゼからなるヌクレアーゼの群から選択される抗ウイルス性ヌクレアーゼが投与される。ヌクレアーゼのグループは、本明細書中に説明されるヌクレアーゼの分類法にしたがって定められる。

【０２０６】

本発明の更に別の実施形態は、グループＶのｓｓ（－）ＲＮＡウイルスが引き起こすウイルス性疾患の予防及び治療のための方法を提供する。この方法において、グループＩＩＩのｄｓＲＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＶのｓｓＲＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＶの非特異的ヌクレアーゼ、及びグループＶＩＩの人工ヌクレアーゼからなるヌクレアーゼの群から選択される抗ウイルス性ヌクレアーゼが投与される。ヌクレアーゼのグループは、本明細書中に説明されるヌクレアーゼの分類法にしたがって定められる。

【０２０７】

本発明の別の実施形態は、グループＶｉｓｓ（－）ＲＮＡ　ＲＴウイルスが引き起こすウイルス性疾患を予防及び治療するための方法を提供する。この方法において、グループＩのｄｓＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＩのｓｓＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＶのｓｓＲＮＡ特異的ヌクレアーゼ、及びグループＶのハイブリッド特異的ヌクレアーゼ、グループＶＩの非特異的ヌクレアーゼ、及びグループＶＩＩの人工ヌクレアーゼからなるヌクレアーゼの群から選択される抗ウイルス性ヌクレアーゼが投与される。ヌクレアーゼのグループは、本明細書中で説明するヌクレアーゼの分類法にしたがって定められる。

【０２０８】

本発明の更に別の実施形態は、グループＶＩＩｄｓＤＮＡ　ＲＴウイルスが引き起こすウイルス性疾患を予防及び治療するための方法を提供する。この方法において、グループＩのｄｓＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＩのｓｓＤＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＩＩのｄｓＲＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＩＶのｓｓＲＮＡ特異的ヌクレアーゼ、グループＶのハイブリッド特異的ヌクレアーゼ、グループＶＩの非特異的ヌクレアーゼ、及びグループＶＩＩの人工ヌクレアーゼからなるヌクレアーゼの群から選択される抗ウイルス性ヌクレアーゼが投与される。ヌクレアーゼのグループは、本明細書中に説明されるヌクレアーゼの分類法にしたがって定められる。

【０２０９】

上記した抗ウイルス性組成物は、非経口投与（皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与）される。例えば、この抗ウイルス性組成物は、吸入用のエアロゾルとして投与、鼻腔内投与、或いは点眼薬として投与されたり、局所的に皮膚のウイルス病変部に対して、例えば肛門及び膣を介して用いられる。経口投与の場合、この例の抗ウイルス性複合体は、当該分野で既知の方法により修飾されることも可能である（例えば、米国特許第５，６９８，５１５号（権利者：Pate, et al.　登録日：１９９７年１２月１６日）、米国特許出願第２００３／００８７８０８号（出願人：Soletero, et al.　出願日：２００３年５月８日）を参照）。

【０２１０】

（医薬品組成物）

本発明の様々な実施形態において、治療上有効な量の本明細書中で説明する抗ウイルス性ヌクレアーゼを含有する組成物を含む医薬品組成物が提供される。本明細書中で説明する全ての医薬品組成物を、組成物の徐放、局所的な運搬、全身への運搬のための薬剤又はデバイスを備えるように、或いは備えないように処方することができる。これらの医薬品組成物に、薬学的に許容可能な担体又は賦形剤を添加することができる。このような担体として、これには限らないが、生理食塩水、ブドウ糖、水、グリセロール、エタノール、及びこれらの組み合わせが挙げられる。配合は投与形態に応じて選択される。本明細書中

において、「有効量（effective amount）」とは、治療剤の量或いは複数の治療剤を組合せた薬剤の量について、認められる医療上の目的、この場合すなわちウイルス感染の症状の緩和を達成するのに十分な量のことをいう。本明細書中で説明するように、有効量は、経験のある当業者が定まった方法にしたがって関連するパラメータを測定することにより、経験的に決定可能である。

【０２１１】

本明細書中で説明する組成物は更に、湿潤剤又は乳化剤、或いはｐＨ緩衝剤を含むことができる。この組成物は、溶液、懸濁液、乳液、錠剤、丸剤、カプセル、徐放性製剤、或いは散剤のいずれであってもよい。これらの組成物は、トリグリセリドなどの伝統的な結合剤及び担体を用いて、座薬として処方されることができる。経口投与のための製剤は、マンニトール、ラクトース、デンプン、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準的な担体を含むことができる。様々な既知の輸送システムを、本発明の組成物の投与のために用いることができる。この輸送システムとして、例えば、リポソーム、微粒子、マイクロカプセル内への封入、及びこれに類するものが挙げられる。

【０２１２】

本発明の一実施形態において、本発明の組成物は、常法に従って、例えば人への皮下投与に適した医薬組成物として製剤化される。典型的には、皮下投与のための組成物は、無菌且つ等張の水性緩衝液である。必要な場合、本発明の組成物は、可溶化剤と、注射する部位の痛みを緩和する局所麻酔薬を含むことができる。一般的に、組成物の成分は、個別に又は１回の単位投与量に混合した状態で用意される。この投与形態としては、凍結乾燥粉末又は密閉容器（例えばアンプル又は小袋（sachette））に格納された水分を含まない濃縮物が挙げられる。この密閉容器は、例えば活性物質の量を表示する。組成物が注入により投与される場合、組成物は、無菌の製薬等級純水、緩衝液、又は生理食塩水が入った注入ビン（infusion bottle）を用いて調剤される。組成物が注射により投与される場合、注射用の無菌水又は生理食塩水のアンプルを用意して、投与前に成分を混合する。本発明の組成物は、その成分を様々に変えることができるが、活性成分を重量で約０．５％～１０％含む座薬として、又は活性成分を重量で１０％～９５％含む経口製剤として調製されることができる。１日の服用量は一回で服用されても、少量の投与量ごとに複数に分けて、１日に数回投与されてもよい。

【０２１３】

本明細書中において、投与スケジュール（dosing schedule）とは、任意の組成物を投与する手順を示す。この組成物は例えば、本明細書で説明する１若しくはそれ以上の生体内プロテアソーム阻害剤を有効な用量含む。組成物は一回で投与されるか、或いは適切な間隔を開けて、例えば１回の投与から次の投与まで一日以内に投与される。またこの組成物は、複数の組成物を組み合わせた製剤として投与されるか、或いは個別に投与される。投与スケジュールとは更に、単位時間あたり、例えば１日あたりに輸送される組成物の量と、それぞれの組成物が投与される時間の長さ又は期間を表す。

【０２１４】

本発明の一実施形態において、ウイルス感染を予防或いは治療する方法が提供される。この方法において、この予防又は治療方法を必要とする被験者に、本明細書中で説明する少なくとも１種のヌクレアーゼ含有組成物を含む組成物を投与する段階を備える。それぞれの組成物は感染ユニットの数を低減するのに十分な量含まれる。またこの方法は、ウイルス特異的核酸または感染ユニットの量、或いはウイルス特異的タンパク質含有量を決定する段階を備える。有効な抗ウイルス活性の量の決定は、ウイルス学の専門家に既知であるように、組織検の標本又は培養標本中の細胞の細胞蛍光、組織標本又は細胞標本のＳＤＳゲル上のタンパク質バンドの蛍光、ウイルスがコードするタンパク質の機能の測定により行われる。本明細書中で説明する組成物を投与することにより、この組成物の投与前に測定されるウイルス負荷と比べて、被験者のウイルス負荷が低減される。例えば、この組成物の投与により、組成物の投与前に測定されるウイルス負荷と比べて約５０％、又は７０％のウイルス負荷が低減される。

【０２１５】
本発明の組成物は、中和物又は塩の形態に調製可能である。薬学的に許容可能な塩としては、遊離アミノ基を含む塩が挙げられる。遊離アミノ基としては、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来のものが挙げられる。また薬学的に許容可能な塩として更に、遊離カルボキシル基を含む塩が挙げられる。遊離カルボキシル基としては、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、２－エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来のものが挙げられる。

【０２１６】
特定のウイルスに関する治療に有効な本発明の治療剤の量は、ウイルスの性質に基づいて、標準的な臨床技術により決定される。製剤中に用いられる正確な用量は、投与経路と疾患又は障害の程度に基づいて、医療術者の判断とそれぞれの患者の環境にしたがって決定されるべきである。当業者であれば、プロテアソーム活性のサンプル・レベルを常法により決定することができる。薬理学の当業者であれば、試験管レベルの試験系、動物又は動物モデルの試験系から導かれる服用量－反応曲線から有効な用量を推測可能である。被験者に投与される組成物の投与量は、種間の既知の差異に合わせて調節される。この調節には、吸収、分配、循環中の半減期キネティクス、代謝、排泄、及び本明細書中で説明する実施形態の組成物が有する毒性についての基準を含む標準的データを用いる。通常の適切な投与量は、それぞれの活性化合物について、体重１キログラム１日当たり約０．０１マイクログラム～約１０，０００マイクログラムである。体重１キログラム１日当たりの投与量を、例えば、約０．０１マイクログラム／ｋｇ～約１マイクログラム／ｋｇ、約０．１マイクログラム／ｋｇ～約１０マイクログラム／ｋｇ、約１マイクログラム／ｋｇ～約５００マイクログラム／ｋｇ、或いは約１０マイクログラム／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇとする。したがって一般的に適切な投与量は、体重１ｋｇ１日当たり約０．０１マイクログラム／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの範囲である。

【０２１７】
本発明の他の実施形態は、医薬品のパック又はキットを提供する。この医薬品のパック又はキットは、１若しくはそれ以上の容器を備え、この容器は１若しくはそれ以上の成分からなる本発明の医薬組成物により満たされる。このようなパック又はキット内には、本発明のヌクレアーゼ組成物の単位投与量が入った容器が配される。このような容器に、例えば、使用説明書、或いは医薬品又は生物学的製剤の製造、使用、又は販売を規制する行政機関により規定された書式の注意書などの資料を組み合わせることができる。この注意書には、ヒトへの投与を目的とする製造、使用、販売を、この行政機関が認可していることが示される。投与形態としては静脈注入が好ましいため、単位投与量の薬剤は、注入ボトル又はバッグに予めパックされる。

【０２１８】
別途記載のない限り、本明細書中で使用する全ての技術用語及び科学用語は、本発明の技術分野の当業者が一般的に理解するのと同じ意味を持つものとする。本発明の実施に際して本明細書中に説明するのと同様の或いは同等の方法及び材料を用いることができる。本発明の様々な実施形態を十分に説明したが、別の実施形態を以下の実施例及び請求の範囲に例示する。これらの実施形態は、本発明の範囲を更に限定するものではない。全ての引用文献の内容は全て、参照により本明細書中に組込まれる。

【０２１９】
（実施例１）
（抗ウイルス性ヌクレアーゼを搬送するヘテロ型二官能性ポリマー、標的オリゴマー及び膜透過型ペプチドからなる抗ウイルス性組成物）
本実施例では、抗ウイルス性組成物$Nuc\text{-}P^{f}{}_{n}\text{-}(T^{b})_{r}$の準備について説明する。ここでb,k=1,2であり、r=1である。また、Nは、本明細書中で示されたヌクレアーゼの分類中のグループのうち１つから選択されたヌクレアーゼであり、標的ウイルスの遺伝子核酸若しくは中間核酸に対して優先的に作用する加水分解活性を備える。ヌクレアーゼの一例としては

、組み換え型ウシデオキシリボヌクレアーゼ（TURBO DNase（登録商標）；TDNase）を挙げることができる。この組み換え型ウシデオキシリボヌクレアーゼ（TURBO DNase（登録商標）；TDNase）は、Ambion社（カタログ番号：２２３９）から入手可能である。この組み換え型ウシデオキシリボヌクレアーゼは遺伝的に修飾され、ウイルスdsDNAへの親和力並びにウイルスdsDNAへの加水分解活性が高められている。尚、dsDNAに対して優先的に作用する加水分解活性を備える他の天然型ヌクレアーゼ或いは人工的ヌクレアーゼが本実施例に用いられてもよい。

【０２２０】

ヌクレアーゼは、親水性を有するヘテロ型のトリファンクショナル分岐ポリマー$P^f{}_n$ (f=2)の一の末端に共有結合する。この分岐ポリマー$P^f{}_n$は、多数のモノマーnを備え、n=1-2000である。また、２つの標的リガンドT^1及びT^2 が分岐の枝に共有結合する。

【０２２１】

親水性の高分子担体$P^f{}_n$は、内因性プロテアーゼによるヌクレアーゼのタンパク質分解を防ぐ。また、溶解度及び半減期を増大させるとともに抗ウイルス性複合体の細胞及び核の吸収性を増大させる。このような作用を生じせしめることのできる親水性ポリマーは、ポリエチレングリコール（PEG: polyethylene glycol）及び他のポリアルキレンオキサイド、ポリ（NH-2-(ヒドロキシプロピル)グルタミン）（PHEG: poly (NH-2-(hydroxypropyl)glutamine)、ポリ（n-2-ヒドロキシプロピル）メタクリルアミド(HPMA: poly(n-2-hydoroxypropyl)methacrylamide)及びその他のものを含む。

【０２２２】

ポリマーは、加水分解可能なリンケージを備えてもよい。これにより、細胞内での加水分解が可能となり、活性化合物の放出が促進される。好適な加水分解可能なリンケージは、例えば、カルボン酸塩エステル及びリン酸塩エステル、アセタール、イミン、オーソエステル、エノールエーテル、ジケタンアセタール（diketane acetal）、ケタール、無水物などを含む。このようなポリマー内のリンケージの形成は、本技術分野で当業者が実行する所定の有機合成技術を用いてなされる。親水性を有するヘテロ型のトリファンクショナルポリマP_nを例示すると、分岐型の2×20kDa PEG_2を挙げることができる。分岐型の2×20kDa PEG_2は、「胴体部」の末端にアルデヒド基を有し、分岐部末端にサクシニルアミド基(NHS)及びマレイミド基(MAL)を備える（$CHO\text{-}PEG_2\text{-}(NHS;MAL)$）。変更形態として、MALの代わりに、より安定したビニルサルホン（VS: vinylsulfone）を用いることも出来る。

ヘテロ型のトリファンクショナル分岐型の2×20 kDaの(ブチルアルデヒド)-PEG_2-(N-ヒドロキシ-サクシニミジル-エステル;マレイミド)：$CHO\text{-}PEG_2\text{-}(NHS;MAL)$は、サンバイオ社（米国カリフォルニア州オリンダ）で特別注文して合成することにより入手することができる。

【０２２３】

T^1は、膜透過型ペプチド（MPP: membrane penetrating peptide）の群から選択される。膜透過型ペプチドには、限定するものではないが、Dアルギニン残基やLアルギニン残基や$HIV\text{-}TAT_{43-49}$由来の高アルギニンペプチド、アンテナペディア$_{43-48}$(Antennapedia$_{43-48}$)、トランスポータン(transportan)、ペネトレイチン(penetratin)などを含む塩基性ペプチドが含まれる。これらは、抗ウイルス性複合物の高い細胞吸収性をもたらす。膜透過型ペプチドT^1として、リジン-末端ポリ-Argナノペプチド Lys-Arg8 (K-R8)を例示することができる。

【０２２４】

T^2は、標的ウイルス核酸に対する配列特異的結合親和力を備えるオリゴマーの群から選択される。標的ウイルス核酸として、限定するものではないが、PNA、LNA、ホスホロチオ、モルホリノ、ポリアミド及び感染細胞内部の一の位置でのウイルス核酸の標的化された加水分解性の分解をもたらすことのできる他のヌクレアーゼ耐性オリゴマーを挙げることができる。

【０２２５】

配列特異的オリゴマーT^2として、ワクシニアウイルスに対して相補的な陽イオン性bis-

PNAを例示することができる。この陽イオン性bis-PNAは、ヌクレオチド含有複合体をウイルスdsDNAへ向け、最大限の加水分解性の分解をもたらすように設計される。ワクシニアウイルス（VV: vaccinia virus）は、ゲノムのウイルスdsDNAを匿うものであり、標的ウイルスとして例示的に用いられるが、他のウイルスが本実施例の組成物により不活性化されてもよい。本実施例の組成物は、適切なヌクレアーゼ及び標的化されたウイルス核酸の領域に対して相補的なヌクレオチド配列を備えるオリゴマーを搬送する。

相補的なオリゴマーbis-PNAは、J-擬似シトシン（J-pseudocytosine）を用いて、標準的な技術で修飾される（Synthesis, Properties and Potential Applications, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1996, 4, 5-23; Kuhn et al., Nucl. Acids Res. 26: 582-587, 1998）。また、相補的なオリゴマーbis-PNAは、逆層HPLCによって純化される。また、相補的なオリゴマーbis-PNAは、MALDI-TOF質量分析により特徴付けられる（Egholm et al.,Nucl. Acid Res. 23: 217-222, 1995）。Cys末端修飾陽イオン性bis-PNA（f-Cys-$JT_2J_2T_5$-$(Lys\text{-}aha)_2$-Lys-$T_5C_2T_2C$-LysNH_2（SEQ ID NO:50）　ここで、Jは擬似シトシンである）は、ワクシニアウイルスのdsDNAのTK遺伝子の領域を伴う安定した複合体を形成するように設計される。例えば、bis-PNAは、10-merのホモプリン鎖$GA_2G_2A_5$（SEQ ID NO:51）に対して相補的な配列を備える。このホモプリン鎖$GA_2G_2A_5$は、ワクシニアウイルスTK遺伝子の公表された配列に従うものである（GenBank No. J02425; Hruby, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:3411-3415,1983）。

bis-PNAの第１の鎖において、「C」で示されるシトシンは、「J」で示される擬似シトシンにより置換され、生理学的pHでのdsDNAへのbis-PNAの結合親和力が高められる(Kuhn, et al., J. Mol. Biol. 286:1337-1345, 1999)。

正の電荷を付加されたフレキシブルリンカは、２つのリジン-6-アミノヘキサン酸複合体を含み、この複合体は、$(Lys\text{-}aha)_2$で示される。このフレキシブルリンカの導入により、生理学的な塩濃度でのウイルスDNAに対する陽イオン性bis-PNAの結合親和力が高められる（Kuhn, et al., Nucleic Acids Res..26:582-587,1998）。

陽イオン性のbis-PNAのN末端も蛍光及びシステインアミノ酸残基を含み、これは、「f-Cys」で表される。複合体のウイルス感染細胞内への浸透を後押しするために、蛍光Cy3（Amersham Pharmacia #PA23001）は、システインのアミノ基と結合する。蛍光付加のために、5μgのCys-bis-PNAが0.1Mの炭酸ナトリウム（pH 9.0 体積：35μL）内で希釈される。1 mgのCy3蛍光が30μLのH_2O内で溶解される。15μLの蛍光がCys-bis-PNA溶解液に添加され、混合物が室温暗室中でインキュベートされる。

【０２２６】

第１の結合段階の間、CHO-PEG-(NHS;MAL)のNHS基は、若干塩基性pH（例えば、約pH 7.5）において、リジン-末端オクタ-アルギニン・膜透過型ペプチドK-R8のεアミノ基と反応する。この結果、CHO-PEG-(R8, VS)の情報となる。その後、遊離MAL基は、中性pHにおいて、Cys末端bis-PNAのSH基と選択的に反応する。CHO-PEG-(R8,bis-PNA)のブチルアルデヒドCHO基は、酸性pH（例えば、約pH 5.0）において、N末端αアミノ基と反応し、結果物として、TDNase-PEG-R8, bis-PNA複合体を生ずる。酸性pHは、ブチルアルデヒドとN末端アミノ基との反応を促進する。ブチルアルデヒドが選択された理由は、ブチルアルデヒドが、プロピオンアルデヒドと比べて、軽い酸性状態の下で選択可能であり、アセトアルデヒドよりも塩基性媒体内で高い安定性を備えるからである(米国特許第５，９３２，４６２号を参照　権利者　Harris, et al.　登録日：１９９９年８月３日)。

【０２２７】

その後、結果として生じた75kDaの複合体（TDNase(31kDa)-PEG(40KDa)-R8(1.5kDa)-bis-PNA(2.5KDa)）が分離され、断片化される。そして酵素活性及び他の特定の特性が化学分析される。回収された断片内のヌクレアーゼの濃度は、１．３４の減衰係数を用いて280nmでの吸光度により評価される。複合体は更に、例えば、7.5 % SDS-PAGE上での電気泳動法により更に解析され、クマシーブルーを用いて染色され、純度を決定される。

【０２２８】

75 kDaの抗ワクシニアウイルス複合体は細胞により回収され、細胞質に局在するものと

なる。細胞質において、ワクシニアウイルスの複製が生ずる。細胞核内への拡散は、75 kDaの抗ウイルス性複合体の大きな流体力学半径により抑制若しくは低減される。大きな総分子量及びこれに伴う大きな流体力学半径を備えるヌクレアーゼ-ポリマー複合体が同様に準備される。これら組成物の均等物も本発明の技術的範囲に属するものである。大きなポリマー複合体は、リボヌクレアーゼ様ヌクレアーゼ（RNase-like nuclease）とともに有用である。なぜなら、ほとんど全てのRNAを含有するウイルス（インフルエンザウイルスを除く）は、細胞質内部で複製するからである。加えて、ポリマー複合体は、抗ウイルス性化合物を細胞核内へ浸透させることができるデオキシリボヌクレアーゼ様ヌクレアーゼ（DNase-like nuclease）を伴って有用である。本明細書にて示されるが如く、デオキシリボヌクレアーゼ含有化合物の核内蓄積を更に促進するために、MPPに代えて若しくはMPPに付加して、核局在因子（NLS）が標的成分として、多価構造体内で用いることができる。

【０２２９】

（実施例２）

（多数の核酸分解性ジペプチド・トリペプチド、標的オリゴマー及び膜透過型ペプチドを搬送するヘテロ型二官能性ポリマーを備える抗ウイルス性組成物）

本実施例に関連して、化学式$(Nuc^a)_q$-P_n-$(T^b)_r$で表される抗ウイルス性組成物の準備について説明する。ここで、a，b，q，r = 1-8である。尚、多数のヌクレアーゼN及び膜透過型ペプチドTは、ヘテロ型二官能性高分子担体P_n (n = 1-2000)に共有結合する。末端Dアミノ酸D-Ser-His-D-Aspを含有するトリペプチドSer-His-Aspの非天然型同族体がヌクレアーゼとして例示される。このヌクレアーゼは、DNA及びRNAに対する核酸分解活性を備える（Li et al., Bioorg.Medic. Chem 8: 2675-2680, 2000）。

組成物の標的オリゴマーTは、例えば、15-merのペプチド核酸（PNA_{15}）（Cys-3'-TCCCAGGCTCAGATC-5' (SEQ ID NO:52)）とすることができる。この標的オリゴマーは、HIV-IウイルスssRNAのヌクレオチド配列中のTAR(trans-activation-response：トランス活性応答)のヘアピン成分と特に混成するように設計されたヌクレオチド配列を有する。PNA_{15}は、更に、3'末端に対応する配列端部で単一のCysアミノ酸残基を有するように設計される。PNA_{15}は、TATプロテインとTARの相互作用を遮断し、生体外でのウイルス複製を中断した（Mayhood, et al. Biochemistry 39: 11532-11539, 2000; Kashik et al., J. Virology 76: 3881-3891, 2002）。

P_nにおいて、nは例えば、684であり、複合体は30kDaの８本のアームを有するヘテロ型二官能性PEG（VS-PEG-$[NH_2]_8$-VS）である。

【０２３０】

核酸分解トリペプチドD-Ser-His-D-Asp（一文字アミノ酸コードではSHD）の高分子担体のアミノ基への化学結合が行われ、D-Aspのカルボキシル基を介して、ペプチドが既知の活性方向で結合することを確かなものとする。

ジペプチドSer-His及びトリペプチドSer-His-Aspが同様の核酸分解活性を示すので、トリペプチドのAsp残基のC末端を担体に接続することは、核酸分解活性に影響を与えないものと考えられる。

２つのDアミノ酸を含有するとともにN末端t-Bocを保護するトリペプチド（t-Boc-D-Ser-His-D-Asp）は、Invitrogen Corporation（米国カリフォルニア州カールスバド）により特別注文で合成させることにより入手することができる。30kDaの８本のアームを有するヘテロ型二官能性PEG（VS-PEG-$[NH_2]_8$）は、Nektar Therapeutics社（米国アラバマ州バーミンガム）により特別注文で合成することにより入手可能である。

ビオチニル化トリペプチドと高分子担体VS-PEG-$[NH_2]_8$のアミノ基との比率は5:1とすることができる。カップリング試薬はEDAC(1-Ehyl-3-(3-dimethyl-amino-propyl)carbodiimide hydrochloride)（1-エチル-3-3-ジメチル-アミノ-プロピル）カルボジイミド塩酸塩）である。EDACは、Uptima社から入手可能である（Uptima@interchim.com）。EDACは、D-Asp残基の２つのカルボキシル基に対する活性化剤であり、８本のアームを有するPEGの１級アミンとアミド結合を形成する。

【０２３１】
結果物として得られる複合体PNA_{15}-PEG-$[SHD]_8$-R8は８つのトリペプチドSHDを含有する。このトリペプチドは、ゲノムのssRNA、中間RNA-DNAハイブリッド及び基質としてのdsDNAを伴って、加水分解性のヌクレアーゼ活性を備える。また、複合体PNA_{15}-PEG-$[SHD]_8$-R8は、２つの標的リガンドCys-末端PNA_{15}を備える。この標的リガンドCys-末端PNA_{15}は、宿主細胞内部のHIV RNAのTAR成分に対して高い結合親和力を備える。更に、複合体PNA_{15}-PEG-$[SHD]_8$-R8は、膜透過型ペプチドCys-R8を備え、抗ウイルス性複合体の細胞吸収性を高める。両標的リガンド内の末端Cys残基のSH基は、８本のアームを有する二官能性PEGの２つの末端VS基と加水分解的に安定した結合を形成するために用いられる。
PEGのような親水性のポリマーは、抗ウイルス性ヌクレアーゼを、内因性プロテアーゼによるタンパク質分解から保護する。また、細胞及びヌクレアーゼの吸収性、溶解性及び抗ウイルス性複合体の半減期を増加させる。
【０２３２】
（実施例３）
（抗ウイルス性ヌクレアーゼを含有するとともに多数のアームを備える複合体内で使用するためのヘテロ型二官能性標的「アーム構造」の準備）
本実施例において、「アーム構造」$(Nuc^a)_q$-P_n-Rと$(T^b)_r$-P_n-$L_{(+)}$の合成について説明される。ここで、P_nに関して、用語「n」は１から約２０００までの整数を意味する。ポリマーP_nは直線状若しくは分岐したヘテロ型二官能性PEG(bi-PEG)である。「R」は、配列特異的な化学的に修飾されたオリゴヌクレオチド$L_{(+)}$であり、ワトソン・クリックのハイブリダイゼーションを受け、多価分子スカホールド上で、相補的オリゴヌクレオチド$L_{(-)}$と共有結合することとなる。そして、$(Nuc^a)_q$-P_n-Rと$(T^b)_r$-P_n-$L_{(+)}$とのアーム構造及び修飾デンドリマーD-$L_{(-)}$を用いる多数のアームを有する共有結合抗ウイルス性複合体が形成される。修飾デンドリマーD-$L_{(-)}$に関しては、以下の実施例７にて詳述される。
【０２３３】
関連する実施例において、「R」は反応性を有する結合成分である。限定するものではないが、このような結合成分として、アルデヒド(CHO)、マレイミド（MAL）、ビニルスルホン(VS)、ヒドラジン（HZ）、サクシネート(NHS)及びカルボン酸（COOH）基を挙げることができ、これらは、N-P(n) RとT^i-P(n)-Rの構造及び化学的に修飾されたデンドリマー（以下、実施例６において詳述される）を用いた多数のアームを有する共有結合抗ウイルス性複合体を形成する。
【０２３４】
他の実施形態において、「R」は、疎水性成分Hである。そして、$(Nuc^a)_q$-P_n-Hと$(T^b)_r$-P_n-H構造体及び疎水性コア・デンドリマーG0(C_{12})を用いた非共有結合の多数のアームを備える抗ウイルス性組成物が形成される（このことに関しては、実施例５で説明される）。ここで、用語$(T^b)_r$に関して、「b」並びに「r」は１から約８の数であり、$(T^b)_r$は、標的ウイルス核酸の特異的ヌクレオチド配列に対して相補的な修飾オリゴヌクレオチドのような標的成分を表す。標的成分Tは、修飾PNAのような類似体や塩基性アルギニンペプチド、塩基性高リジンペプチド、核局在シグナルや核外輸送シグナル（NLS又はNES）、宿主細胞表面レセプター(CSR)に対する特異的親和性を備える標的リガンドT-CSR、オリゴサッカリド及びポリサッカリド、リン脂質などから作り出すことができる。本実施例において説明された標的bi-PEG複合体は、以下に示す種類の標的リガンドを備える。
【０２３５】
修飾された配列特異的オリゴヌクレオチドが準備される。各修飾された配列特異的オリゴヌクレオチドは、標的ウイルス核酸の領域に対して相補的なヌクレオチド配列を備える。ヘテロ型の二官能性PEG複合体は、配列特異的オリゴマーに共有結合する１つの末端を有する。配列特異的オリゴマーはウイルスDNA及びRNAを標的化する。更に、ヘテロ型の二官能性PEG複合体は、抗ウイルス性デンドリマーを備え、この抗ウイルス性デンドリマーは、ポリマーの第２末端に共有結合する。
【０２３６】

この実施例は、ワクシニアウイルスのTK遺伝子に対して相補的なbis-PNAを特色とする。しかしながら、以下に示す種類の修飾ヌクレオチドのいずれもが、本発明の技術的範囲の中で使用することができる。これら修飾ヌクレオチドには、ペプチド核酸(PNA)、ウイルスssDNA及びssRNAに安定した二本鎖を形成するLocked Nucleic Acids (LNA)（登録商標）並びに架橋化核酸（BNA）、ウイルスdsDNAやdsRNAのプリン鎖と安定した複合体を形成する陽イオン性のホモピリミジンbis-PNA、ハイドロキシプロリン-PNA(HypNA: hydroxyproline-PNA)などの新規なPNA類似体、セリン-PNA(SerNA: serine-PNA)（セリン-PNAには、米国特許出願2003/0059789（出願日：２００３年３月２７日　出願人：Efimov et al.）に開示されるそれらのモノマー、二量体、ポリマーが含まれる）、ウイルスdsDNAのマイナ・グルーブを標的化する配列特異的ヘアピン・ポリアミド、ウイルスssRNAを標的化するモルホリノ・オリゴ(Summerton and Weller, Anti-sense & Nucleic Acid Drug Development 7: 187-195, 1997)、ホスホロチオエート（PS）オリゴ、ssRNAのssDNA上の動力学的に選択的な結合を備えるピロリジンアミド・オリゴヌクレオチド・ミミック（POM:pyrrolidine-amide oligonucleotide mimic）、DNA若しくはRNA特異性を有するジンクフィンガー（Friesen et al., Nature Structural Biology Vol.5, No7: 543-546, 1998）及びウイルス核酸と安定した配列特異的複合体を形成する能力を有する他の修飾オリゴマーが含まれる。

【０２３７】

同数の塩基を備える従来のオリゴヌクレオチドと比べて、PNA分子は、相補的なRNA及びDNAに対して５０～１００倍高い親和性を有する（Nilesen et al., Science 254: 1497-1500, 1991; Hanvey et al., Science: 258: 1481-1485, 1992）。修飾された陽イオン性bis-PNAは、鎖置換複合体の形成を介して、生理学的状態において、二本鎖核酸の結合に関して、高い結合効率を備える。ここで、鎖置換複合体は、内部のbis-PNA-DNA螺旋状及び実質的に一本鎖状（非相補的）のDNA鎖を備える（Egholm, et al. Nucleic Acid Res. 23:, 217-222,1995; Griffith et al. J. Am. Chem. Soc. 117:831-832,1995）。ワクシニアウイルスのTK遺伝子に対して標的化された陽イオン性のbis-PNAは以下の如くして準備される。

【０２３８】

膜透過型ペプチド(MPP: membrane penetrating peptide)を備えるヘテロ型二官能性PEG複合体が合成される。膜透過型ペプチドは、細胞質内へ及び上皮組織を横切って／内部へ大きなタンパク質を搬送する。この実施例は、MPP組成物に特徴付けられ、MPP組成物は、ポリ（D-Arg）８量体R8 (poly(D-Arg)octamer R8)、アンテナペディア$_{43-48}$ (AP$_{43-48}$: Antennapedia$_{43-48}$)及びHIV TAT$_{49-57}$を備える。しかしながら、アルギニン残基或いは類似体、トランスポータンなどの高アルギニンペプチド及びタンパク質、ペネトラチン（penetratin）及びこれらに類するものを含有する他の塩基性ペプチドも本発明の技術的範囲に含まれる。

【０２３９】

システイン末端膜透過型ペプチドC-R8は、１つのＬシステイン及び９つのDアルギニン残基、アンテナペディア$_{43-48}$及びTAT$_{49-57}$ペプチドからなる。システイン末端膜透過型ペプチドC-R8は、米国特許出願2002/012719810（出願人Rothbard, et al）に説明されるような標準的な固相のFmoc化学反応を用いて自動ペプチド合成装置ABI433により合成される。

アンテナペディア$_{43-48}$は、pH7.0で、5kDaのMAL-PEG-DSPEのMAL基に共有結合する。結果として生ずる３つの搬送性向上トランスポータR8-PEG-DSPE、TAT$_{43-49}$-PEG-DSPE及びアンテナペディア$_{43-48}$-PEG-DSPEの細胞の膜透過率は、Jurkat細胞（ヒトT細胞）及び米国特許出願2002/012719810（出願人：Rothbard, et al）に説明されるマリンB細胞（CH27）を用いて細胞アッセイにより比較される。

R8-PEG-DSPEは、アンテナペディア$_{43-48}$-PEG-DSPEと比較して、約５０倍速く細胞内に侵入し、TAT$_{43-49}$-PEG-DSPEと比較して、約１００倍速く細胞内に侵入する。

【０２４０】

核局在シグナルは、いくつかの未変性のウイルス蛋白質内に見出される自然に生ずるペプチド配列である。核局在シグナルは、細胞質から細胞核への大きなタンパク質の搬送を仲介する。NLS（核局在シグナル）の典型的なペプチド配列は、いくつかの塩基性アミノ酸を含む。本実施例で特徴付けられるNLSは７つのアミノ酸のペプチドPKKKRKV (SEQ ID NO:41)である。このNLSは、SV40ラージT抗原からのモノパータイト（monopartite）である。

しかしながら、多くの他の機能性NLS配列を本発明に使用することは可能であり、このようなNLS配列も本発明の技術的範囲に属するものである。このようなNLS配列として、１２個のアミノ酸のペプチドPEVKKKRKPEYP(SEQ ID NO:42　米国特許第6,312,956号（権利者：Lane）　本特許の内容は、本明細書に参照として組み込まれる)、SV40ラージT抗原の１３個のアミノ酸のペプチドGGGGPKKKRKVGG (SEQ ID NO:44)（Lanford, Cell 37:801-813, 1984）、アデノウイルスNLSの１３個のアミノ酸のペプチドGGGFSTSLRARKA (SEQ ID NO: 45)、アデノウイルスレセプタ仲介エンドサイトーシス（RME: receptor mediate endocytosis）タンパク質の１７個のアミノ酸のペプチドCKKKKKKSEDEYPYVPN (SEQ ID NO: 46)、アデノウイルス繊維タンパク質の２８個のアミノ酸のペプチドCKKKKKKKSEDEYPYVPNFSTSLRARKA (SEQ ID NO 47)（Tkachenko, et al., J. Am. Chem Soc. 125: 4700-4701 (2003)）、SV40 N1タンパク質からのバイパータイトNLSの２４個のアミノ酸のペプチドLVRKKRKTEEESPLKDKDAKKSKQE (SEQ ID NO:48) (Dingwall et al., Trends Biochem. Sci. 16(12):478-81 (1991))、ヌクレオプラスミン、ポリオマウイルスラージT抗原、ヒストン、c-myc（米国特許第5,115,096号（権利者：Shoyab et al）　本特許の内容は、本明細書に参照として組み込まれる）及びMAX(米国特許第5,115,096号　（権利者：Brent et al）　本特許の内容は、本明細書に参照として組み込まれる)を挙げることができる。

【０２４１】

NLSをR8-PEG-NHSに結合するために、余ったリジンがN末端に付加される（Chan and White, Fmoc solid phase peptide synthesis. A Practical Approach, Oxford University Press, 2000）。２つの複合体R8-PEG-NLS及びR8-PEG-DSPEが実施例１及び実施例２の如く合成される。そして、これらは、細胞培養物に添加された後、細胞吸収性及び核吸収性両方について試験される。

カバースリップ上で成長したＨｅＬａ細胞が5μMの各複合体とともに、血清が存しない培地内で一晩中培養され、蛍光顕微鏡検査により固定化されるとともに試験される。

R8-PEG-DSPEは細胞質内で分散し、核に存在しないことが判明する。一方で、R8-PEG-NLSは主に核内で蓄積する。

【０２４２】

宿主細胞に対して高い結合親和力を発揮するT-CSR標的リガンドが準備される。

HIV-Iの外膜タンパク質から由来する配列を備えるペプチドT（ASTTNYT: SEQ ID NO: 1）がT-CSRとして合成される。このT-CSRは、CD4レセプターを含有するHIV主要宿主細胞を標的とする。ペプチドTは、C末端にて追加のリジン或いはシステイン残基を介してbi-PEGに結合される。そして、必要とされる反応基（NH_2アミノ基、εアミノ基、SHチオール基）をもたらす。

ウイルス特異的T-CSRの他のもう１つの例として、ヒトパピローマウイルス型の１６カプシドタンパク質L1及びL2の正の電荷を付加された配列から由来する合成ペプチドを挙げることができる。この合成ペプチドは、ヘパラン硫酸レセプター（例えば、HPV31 L1 Cta: GYRARPKFKAGKR (SEQ ID NO:53)、HPV 45 L1 Ctb: RPAKRVRIRSKK (SEQ ID NO: 54)、hpv-16l1 Cta: SSTSTTAKRKKRKL (SEQ ID NO: 55)、HPV-16 L2 Ct: MLRKRRKRL (SEQ ID NO:56)、HPV-16 L2 Nt: MRHKRSAKRTKRA (SEQ ID NO:57)など）に対して高い結合親和力を発揮する（Bousarghin, et al. J.Gen. Virol. 84: 157-164, 2003）。

【０２４３】

本発明の技術的範囲に含まれるT-CSRの他のもう１つの例として、葉酸或いはプテロイルグルタミン酸、パラアミノ安息香酸成分に対してメチレン橋により結合するプテリジン環を備えるビタミンを挙げることができる。このビタミンは、アミド結合を介してグルタ

ミン酸残基に結合する。

葉酸は、真核性細胞の生存並びに成長に必要とされる。細胞葉酸の吸収は、少なくとも２つの独立した輸送メカニズムにより仲介される（Weitman et al., Cancer Res. 52:3396-3401, 1992; Ross et al., Cancer , 1994 73(9), 2432-2443, 1994）。低減された葉酸は、低い親和性（K_m値は1-10μMの範囲である）の担体アニオン輸送システムを介して内在化する。この担体アニオン輸送システムは、略全ての細胞内で観察することができる。葉酸及び5-メチルテトラハイドロフォレート（5-methyl tetrahydrofolate）は、高い結合性（K_d値は、10-100nMの範囲である）を備える膜結合型葉酸結合タンパク質を介して細胞内に侵入可能である。この葉酸結合タンパク質は、グリコシル・ホスファチジル・イノシトール（glycosyl-phosphatidyl-inositol）成分を介して細胞膜に固定される。多くの細胞において、葉酸の獲得は、葉酸レセプター（FR-α）を介してなされ、38-39KDaのグリコシル・ホスファチジル・イノシトール（GPI: glycosyl-phosphatidyl-inositol）に結合した葉酸結合タンパク質（FBP: folate binding protein）が発現する。この葉酸結合タンパク質は、生理学的量の葉酸に結合する。葉酸は、ナノモル範囲の高い親和性を備える（Antony, Annu Rev Nutr 16:501-521, 1996）。

【０２４４】

葉酸レセプターα（FR-α: folate receptor-alpha）が、フィルウイルス（例えば、マールブルグ(MGB: Marburg)ウイルス及びエボラ（EBO: Ebola）ウイルス）による細胞侵入の有意な共因子であることが示された。このようなフィロウイルスは死をもたらす出血熱を生じせしめる（Chan et al., J. Virol. 74: 4933-4937, 2000）。MGB及びEBOウイルスに感染した細胞は、FR-αレセプターを発現する細胞に確実に感染するだけでなく、感染細胞内で発現したFR-αレセプターも、MBG及びEBOウイルスの糖タンパク質（GP: glycoprotein）に誘引される細胞間の融合若しくは融合細胞形成を促進する。

更には、FR-α及び溶解可能なFBPが、これらのメンブレン上にMBG若しくはEBO GPを発現させる感染細胞に結合することが判明している。また、葉酸並びにウシFBPは、FR-αを発現する細胞内にフィロウイルスが侵入することを抑制可能であることが判明している（Chan, et al., Cell 106: 117-126, 2001）。外因性分子の細胞吸収は、このような分子と葉酸の結合により高められる（Wedeking, et al.による米国特許出願（２００１年）及び米国特許第6,280,991（権利者：Raines）（２００１年）参照）。

【０２４５】

本明細書に示される複合体に対する有益なT-CSRの他のもう１つは、マンノース-6-リン酸塩（M-6-P: mannose-6-phosphate）残基である。この残基は、カチオン非依存性マンノース-リン酸塩レセプター（MPR）を標的化する。２つのM-6-Pレセプターは、カチオン依存性CD-MPRとカチオン非依存性CI-MPRである。非共有結合二量体が、M-6-P残基に対して多価であるリガンドの高い結合親和性を可能とするにつれて、これらカチオン依存性CD-MPRとカチオン非依存性CI-MPRは、細胞膜上に現れる（Byrd, et al., J. Biol. Chem. 275: 18638-18656, 2000）。

本明細書に示される複合体に対するT-CSRの他のもう１つの例として、マクロファージ、内皮細胞のサブセット、平滑筋細胞、網膜色素上皮、腎臓メサンギウム細胞、骨髄性細胞、カポジ肉腫細胞などに発現するマンノースレセプタを標的化するマンノースを挙げることができる（Stahl & Ezekovits, Curr Opin Immunol. 10:50-55,1998参照）。Man-PEI-PEG及び（M-6-P）-PEI-PEG複合体は、マンノース-ポリリジン複合体に対して説明される方法（Erbacher, et al., Hum. Gene Ther 7:721-729, 1996）及びマンノース-PEI複合体に対して説明される方法（Diebold, et al. J. Biol Chem 274(27): 19087-19094, 1999）と同様の方法で合成可能である。NH_2-PEG-MALにより終端化された分岐PEIを備えるヘテロ型二官能性・ジブロックPEI-PEG-MAL共重合体の合成は、文献（Petersen et al., J. Am. Chem Soc., 277(44):41613-41623, 2002）内で説明されるマクロストッパ・ルート（macrostopper route）を介して実行された。カップリング剤としてマンノピラノシルフェニル・イソチオシアネートを用いて、フェニルイソチオシアネートのブリッジ（itc）を介して、ヘテロ型二官能性共重合体分岐PEI-PEG-MALの遊離アミノ基に結合したマンノー

ス又はマンノース-6-リン酸塩を有する。そして、Man-itc-PEG若しくは(Man-6-P)-its-PEGを得る。

ヘテロ型二官能性分岐（$(NH_2)_k$－PEG-MAL（kは整数８である）は、単一の終端マレイミド（MAL: maleimide）又はビニルスルホン（VS:vinylsulfone）基及び多数の終端遊離アミノ基NH_2を備える。このヘテロ型二官能性分岐（$(NH_2)_k$－PEG-MALは、Nektar Therapeutics, Incから入手可能である。

0.33 mLの水に溶解した25 mgの$(NH_2)_8$-PEG-MALを0.2 mLのジメチルスルホキシドに溶解した25mLのマンノピラノシルフェニルと２４時間反応させ、その後、4mLの水で希釈し、0.5Mの塩化ナトリウムで調製し、サンプルをカチオン交換クロマトグラフィ（Bio-Rad Macroprep High S, 塩勾配0.5から3 M NaCl）にかけ、150mMのNaClに対して透析をすることにより、結合がなされる。複合体は、ニンヒドリンアッセイを用いることにより、PEGの内容について解析される（Cotton, et al., Current protocols in Human Genetics, pp. 12.3.1-12.3.33, John Wiley and Sons, NY, 1996）。また、レゾルシノール硫酸法を用いてマンノースの内容がアッセイされる（Diesla, et al., Anal. Biochem. 175:525-530, 1988）。

【０２４６】

細胞表面レセプター（CSR: cell surface receptor）は、高分子担体により搬送され結合された標的リガンドに対して設計され、ウイルス糖タンパク質に対して特異的結合親和力を備える様々な細胞表面レセプター（CSR: cell surface receptor）を有することができる。ウイルス糖タンパク質は、感染した細胞のメンブレン上に発現する。様々な細胞表面レセプターとして、例えば、T4細胞レセプターCD4、HIV感染細胞のメンブレン上に発現するHIV糖タンパク質gp120/CSXに対して親和性を備えるコレセプタCCR5及びCXCR4及び他の宿主細胞レセプターを挙げることができる。

他の例として挙げることのできるCSRは、葉酸レセプターα（FR-α:folate receptor-α）のペプチド誘導体を含み、このペプチド誘導体は、マールブルグ(MGB: Marburg)ウイルス又はエボラ（EBO: Ebola）ウイルスに感染した細胞を標的化することができる。

更に他の例として挙げることのできるCSRは、ウイルス糖タンパク質に対して高い親和性を備えるCI-MPRのいくつかのペプチド誘導体を含む。

【０２４７】

共有結合した標的成分$(T^b)_r$を備えるbi-PEG複合体は、１若しくはそれ以上の抗ウイルス性ヌクレアーゼを含有する多価複合体をウイルス感染細胞に向けるために用いられる。

【０２４８】

（実施例４）

（抗ウイルス性ヌクレアーゼ並びに疎水性成分を搬送するヘテロ型二官能性ポリマーを備える標的リガンドの共有結合複合体の準備）

本実施例において、組成物Nuc-P_n-H及び$(T^b)_r$-P_n-Hの準備について説明する。ここで、Nucは抗ウイルス性ヌクレアーゼであり、T^bは実施例３で説明された標的リガンドである。また、P_nはヘテロ型二官能性親水性ポリマーであり、Hは、疎水性成分である。この疎水性成分は、実施例５にて説明される疎水性コア・デンドリマーDと結合する。

【０２４９】

ヌクレアーゼの抗ウイルス活性は、内因性プロテアーゼに起因するタンパク質分解から抗ウイルス性ヌクレアーゼを保護するように作用するポリマーを備える複合体により高められる。このポリマーは、溶解性、細胞吸収性並びに半減期を増大させる。多くの親水性ポリマーが、これら機能を発揮する能力を備えるが、このような親水性ポリマーとして、ポリエチレングリコール（PEG: polyethylene glycol）及び他のポリアルキレンオキサイド、ポリ（NH-2-(ヒドロキシプロピル)グルタミン（PHEG: poly(NH-2(hydroxypropyl)glutamine)、ポリ（n-2-ヒドロキシ-プロピル）メタクリルアミド（HPMA: poly(n-2-hydroxy-propyl)methacrylamid）などを挙げることができる。

【０２５０】

ポリマーは加水分解性のリンケージを含有し、細胞内で加水分解可能である。これによ

り、活性化合物が放出されることとなる。適切な加水分解性のリンケージは、例えば、カルボン酸塩及びリン酸塩エステル、アセタール、イミン、オーソエステル、アミン、エノールエーテル、ジケタンアセタール（diketane acetal）、ケタール、無水物などを含む。ポリマー内でのこのようなリンケージの形成は、本技術分野で既知である所定の有機合成技術を用いることによりなされる。

本実施例では、ヘテロ型二官能性PEGを備えるヌクレアーゼの共有結合構造体の準備について説明するが、同一の方法を、ウイルス核酸を標的化する特別に修飾された配列特異的オリゴマー、膜透過型ペプチド及び他の標的成分を備えるbi-PEGの共有結合複合体の準備に適用することができる。

【０２５１】

野生型ウシ膵臓RNase Aにより例示されるヌクレアーゼは、Ambion社（米国テキサス州オースチン）から入手可能である。RNaseは、一本鎖ウイルスRNAを優先的に分解する。同様の方式でポリマーと結合する他のヌクレアーゼは、人、動物、バクテリア、植物及び人工由来の野生型、組み換え型或いは化学的に修飾されたヌクレアーゼを含む。

選択されたポリマーは、２つのアームを備える2×10 kDaの分岐状ヘテロ型二官能性PEGであり、このヘテロ型二官能性PEGは、一のアーム上に1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ3-ホスファチジルエタノールアミン（DSPE: 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero 3-phosphatidyl ethanolamine）を備え、他のアーム上にプロピニルアルデヒドのCHO基を備える。このようにして得られるポリマーは、略式で、DSPE-PEG-CHOで現わすことができ、これは、Nektar Corpより入手可能である。様々な種類の脂肪酸のうち、DSPEのラウリル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、オレオイル及びリネオイル（lineoyl）類似体を用いることができる。

【０２５２】

CHO試薬は、酸性のpH 5.0-6.0の環境下で、RNase AのLys(K)1のN末端アミノ基と反応する。DSPE-PEG-CHO試薬とRNase Aの比率を1:1とし、pH 5.0の環境下で反応が行われる。これらの状態は、高い分子量の付加化合物を備えるタンパク質よりもむしろ、タンパク質に対して単一のPEGを有するタンパク質の再生に最適なものである。非修飾プロテインは、再利用することもできる。複合体は、断片化され、断片は、酵素活性及び他の特性の調査のためにアッセイされる。最終生成物の濃度は、減衰係数1.34を用いて、近紫外線吸収により評価される。また、7.5 %のSDS-PAGE上の電気泳動により、複合体は解析され、クマシーブルーで染色され、純度が決定される。$(T^i)_r$-P(n)-H複合体が同様の方法で得られる。N-P(n)-H複合体及び$(T^i)_r$-P(n)-H複合体はともに、長く形成された疎水性コア・デンドリマーを備える非共有結合複合体内で用いられる。

【０２５３】

（実施例５）

（多価疎水性コア・デンドリマーと非共有結合する多数のヘテロ型二官能性構造体を備える抗ウイルス性組成物）

本実施例において、多数のアームを備える抗ウイルス性複合体／多価抗ウイルス性複合体$[(Nuc^a)_q - P^f_n\text{-}H]_i\text{-}D\text{-}[H\text{-} P^f_m \text{-}(T^b)_r]_k$の準備について説明される。ここで、「i」及び「k」は、１から８の整数である。

複合体は、「アーム構造体」Nuc - P_n-H及びT- P_n Hは、「核」となる多価分子スカホールドDを備える。「アーム構造体」は、ヘテロ型二官能性親水性ポリマーP^f_n及びP^f_mを備える。この親水性ポリマーは、実施例１で説明したように、「PEG」により表される。ここで、「n」及び「m」は、１から２０００の整数である。ポリマーP^f_n及びP^f_mの一端部は、ヌクレアーゼNuc又は標的リガンドT（例えば、実施例４で示すようなPNA、MPP、NLS、T-CSR又はCSRである）のいずれかに共有結合する。その一方で、ポリマーの他端部は、疎水性の「結合」成分Hに共有結合する。この結合成分Hとして、ジパルミトイル-sn-グリセロ 3-ホスファチジルエタノールアミン（DSPE: dipalmitoyl-sn-glycero 3-phosphatidyl ethanolamine）などのリン脂質を例示できる。このリン脂質は、粘着性を有する疎水性脂肪酸を備えるDSPEのラウリル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、オレオ

イル及びリネオイル（lineoyl）類似体を備えることができる。

疎水性成分Hの存在により、多数のアームを備える抗ウイルス性組成物／多価抗ウイルス性組成物の形成が仲介される。

各構造体Nuc - P_n-H又はT- P_n Hは、疎水性相互作用を介して、疎水性の分子スカホールドDに結合する。多価分子スカホールドDは、本実施例において、長く形成されたコアPAMAMデンドリマー$G_0(C_{12})$として例示される（Watkins, et al., Langmuir 13: 3136-3141, 1997）。

【０２５４】

疎水基Hを含有する「アーム構造体」は、両親媒性である。なぜなら、アーム構造体が、水中での溶解度に関して略異なる２つの部分を有するからである。親水性の部分A-PEGは、極性頭部である一方、この極性頭部の反対側の尾部（DSPE）は疎水性であり、この尾部は脂肪酸の非極性鎖により形成される。この脂肪酸は、脂質親和体である。

両親媒性複合体が、複合体の親水性A-PEGと疎水性DSPEの部分の量により、相対的貢献度において十分に相違するものであってもよい。親水性・親油性バランス（HLB: hydrophile-lipophile balance）として示されるパラメータは、便利な手段であり、これらの界面作用の面からこれらの貢献をランク付け可能となる（Adamson, Physical Chemistry of Surface: 505-507, 1976, 3rd Ed., John Wiley and Sons, New York）。

【０２５５】

様々な複合体の両親媒性は、これら複合体の免疫原性に影響する。両親媒性化合物のHLBは、化合物を投与された被験者の免疫反応に影響する。２０を超える高いHBLを有する両親媒性複合体は、非常に低い免疫反応を生じせしめることが判明している（Waltrous-Peltier, et al. Pharm. Res. 9: 1177-1183, 1992）。その一方で、２より下の低いHBLを備える複合体は、炎症細胞、とりわけマクロファージの蓄積を引き起こす（Hunter, et al. AIDS Res. Hum. Retrovir. 10, S95-S98, 1994）。水性溶液中において、DSPE分子の非極性アルキル基は、互いに接着する（Finney, 「Hydration Processes in Biology」, ed. M.C. Bellissent-Funel, IOS Prss, 115-124, 1999）。

【０２５６】

実施例３で説明したような親水性ポリマーP_nを備える複合体は、結果として、内因性プロテアーゼによるタンパク質分解から抗ウイルス性ヌクレアーゼを保護するとともに、溶解性、細胞吸収性及び半減期を増加させる。$(Nuc^a)_q$ - $P^f{}_n$-H及びH- $P^f{}_m$ -$(T^b)_r$構造体の両親媒性特性は、細胞膜への抗ウイルス性組成物の浸透を調節する。また、$(Nuc^a)_q$ - $P^f{}_n$-H及びH- $P^f{}_m$ -$(T^b)_r$構造体は、プロテアーゼに対する追加的な保護をもたらす。

ヌクレアーゼとして、ウシ膵臓RNase Aを例示することができ、このウシ膵臓RNase Aは、優先的に一本鎖ウイルスRNAに対して作用する加水分解活性を備える。しかしながら、人、動物、バクテリア、植物及び人工由来の野生型、組み換え型若しくは化学的に修飾されたヌクレアーゼが同様の方法でポリマーと結合する形態も採用可能である。好適なポリマーとして、一のアーム上に1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ 3-ホスファチジルエタノールアミン（DSPE: 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero 3-phosphatidyl ethanolamine）を備えるとともに、他のアーム上に、プロピニルアルデヒドのCHO基、MAL基又はNHS基を備えるヘテロ型二官能性PEGを挙げることができる。このポリマーは、DSPE-PEG-CHO, DSPE-PEG-MAL, DSPE-PEG-NHSの略称で示すことができ、このポリマーは、Nektar Corporation, Inc.より供給される。

CHO基は、酸性pH環境下において、ヌクレアーゼ-細胞標的ペプチドのN末端と選択的に反応する。NHS基は、K-R8のリジンのε-アミノ基と反応する。またMALは、実施例１で説明したように、中性若しくは弱塩基性のpH環境下において、PNA又は細胞標的リガンド（T-CSF）のSH基と反応する。

【０２５７】

複数の$(Nuc^a)_q$ -PEG-DSPEと$(T^b)_r$ -PEG-DSPE構造体の混合体は、活性成分を備える。活性成分として、ヌクレアーゼNuc^aや標的リガンドT^bを例示できる。ここで、「q」及び「r」は、１から８の整数である。

この混合体は、同時に、DSPEを備える水性溶液中に導入され、疎水性コア・デンドリマーとともに疎水性会合を形成する。この結果、多価アーム－コア構造体の混合物が得られる。この多価アーム－コア構造体は、組成物の不規則な分布及び不規則な頭部基の量を備える。

本実施例は、後に生ずる結合手順について説明する。この手順は、フェーズ・マトリックスを備えるとともに、多価組成物を作り出す。多価組成物は、４つの異なる活性成分（単一のヌクレアーゼ-ウシDNase I、３つの標的リガンド-PNA、R8及び長く形成された疎水性コア・ポリ（アミドアミン）デンドリマー$G_0(C_{12})$により代表されるDと疎水性結合中の葉酸）を備える。656 Daのデンドリマー$G_0(C_{12})$は、４つの活性表面NH_2及び$12CH_2$基を含有する。この４つの活性表面NH_2及び$12CH_2$基は、内部にメチレンを主要成分とする疎水性コアを備える。このような656 Daのデンドリマー$G_0(C_{12})$は、Dendritech, Inc（米国ミシガン州ミッドランド）から入手可能である。

【０２５８】

5 kDaのDSPE-PEG-CHOとDSPE-PEG-NHSの複合体は、それぞれ、A活性成分と共有結合し、結果として、$(Nuc^a)_q$ -PEG-DSPEと$(T^b)_r$ -PEG-DSPEの複合体が得られる。ここで、Nuc^1はDNase I若しくは他のヌクレアーゼであり、は、T^1はK-PNAであり、T^2はK-R8であり、T^3はK葉酸（FA: folic acid）である。

DSPE-PEG-NHSのNHS末端は、リジン修飾活性成分の終端リジン基と反応する。$G_0(C_{12})$疎水性コア・デンドリマーは、その後、2 kDaのPEGリンカを介して、固相の「シード」マトリックス（seed matrix）と共有結合する。「シード」マトリックスは、化学的に不活性なPEGを主成分とする親水基を備える（Grotli, et al., J.Combin. Chem. 2000, 108-119, 2000; Buchardt and Meldal, Chemically Inert Hydrophilic Resin for Solid Phase Organic Synthesis. Tetrahedron Lett. 39: 8695-8698, 1998）。

その後、「-PEG-DSPE」複合体が、追加され、疎水性DSPE尾部の$G_0(C_{12})$デンドリマーの疎水性コアとの非共有結合が可能となる。$G_0(C_{12})$デンドリマーは、親水性の固相マトリックスに共有結合している。

$(Nuc^a)_q$ -PEG-DSPEと$(T^b)_r$ -PEG-DSPEの複合体それぞれが、固定化されたデンドリマーの濃度との濃度比が１：１となるように導入される。複合体のうち１つが、核固定化されたデンドリマーのうち１つの平均適量で疎水的に結合すると、非結合状態のままの複合体は洗い流される。この手順が繰り返され、順次、疎水性相互作用により、異なる若しくは類似の機能の複合体を結合する。最後に、「シード」デンドリマー及びPEGを主体としたマトリックスは、標準的な技術により開裂される。疎水性コア・デンドリマーに結合する活性成分の量が、4-6を超えないときに上記の技術は使用に適するものといえる。他の方法では、反応時間が非常に長くなる。

【０２５９】

（実施例６）

（多価デンドリマーと共有結合する多数のヘテロ型二官能性構造体を備える抗ウイルス性組成物）

本実施例は、多数の構造体$(Nuc^a)_q$ -PEG-Rと$(T^b)_r$ -PEG-Rについて説明する。ここでa=2であり、q=1であり、r=1である。また「b」は約３の整数である。多数の構造体$(Nuc^a)_q$ -PEG-Rと$(T^b)_r$ -PEG-Rは、化学的に修飾されたデンドリマーD_{SH}に共有結合する。ここで、Nuc^1は組み換え型ヒトDNase Iであり、Nuc^2はヒトRNase IのSペプチド（Sp: S-peptide）又は組み換え型Sプロテイン誘導体（SP）のいずれかである。T^1はHIV-1のREV遺伝子に対して標的化されたbis-PNAであり、T^2はR8膜透過型ペプチドであり、T^3は実施例３で説明されたMan-6-PのようなT-CSRである。ここで、「R」はビニルスルホン基（VS: vinylsulfone group）であり、デンドリマーは、G-2 PAMAMデンドリマーD_{SH}であり、このデンドリマーは化学的に修飾され、反応性の末端SH基を含有する。

Sp-DNase-PEG-VS、SP-PEG-VS、bis-PNA-PEG-VS及びR8-PEG-VS構造体は、実施例１乃至３に説明したようにして準備される。チオール修飾されたD_{SH}を得るために、NH_2末端PAMAM G-2デンドリマーが、窒素でパージングされた５mMのイミノチオランHCl及びPBS中の1

mMのEDTAで処理され、デンドリマー表面アミンをスルフヒドリル基に変換する。60分間のインキュベーションを窒素パージング下で行い、PBSに対して反応混合物が透析される。

【０２６０】

SH修飾されたデンドリマーD_{SH}は、その後、2 kDaのPEGリンカを介して固相の「シード」マトリックスに固定化される。「シード」マトリックスは、実施例４で述べた如く、化学的に不活性なPEGを主体とした親水基である。

(Nuc^1, T^b)-PEG-VS複合体は、順次添加され、親水性固相マトリックス上で固定化されたデンドリマーのSH末端基とのVS基の共有結合を可能とする。(Nuc^a, T^b)-PEG-VS複合体それぞれは、固定化されたデンドリマーの濃度に対して、１：１の濃度比率で導入された。(Nuc^a, T^b)-PEG-VS複合体のうち１つが、各固定化されたデンドリマーに対して１つに平均的な量で共有結合し、結合しない複合体は洗い流される。この手順が繰り返され、後の手順で３つの複合体全てが共有結合する。最後に固定化デンドリマーとPEGを主体とするマトリックスの間の共有結合が標準的な技術で開裂される。デンドリマーに結合する活性成分の量が約４又は５を超えないときに、上記の技術の使用は適したものといえる。他の方法では、反応時間が長すぎるものとなる。

【０２６１】

Dow Chemical and Dendritech, Incにより供給されるPAMAMデンドリマーに加えて、他の抗ウイルス性デンドリマーも本発明の技術的範囲に含まれ、本発明に使用可能である。また、このようなデンドリマーの均等物として、スルホン酸含有成分又はトリメチルアンモニウム含有成分と結合するポリアミドアミン又はポリリジンデンドリマー（米国特許第6,190,650号　権利者：Matthews及びHolan, 2003）及びSPL-2999のようなStarpharma Ltd.により提供されるポリ（リジン）Starburst（登録商標）を挙げることができる。SPL-2999は、化学式BHAlys15lys16(NHCSNHNaphth-3,6-diSO3Na)32(BHA:benzhydrylamine（ベンズヒドリルアミン）及び分子量16,615 Daを備え、ヘルペス単純ウイルスHSVに対して活性を示す（Gong et al, Antiviral Research 55:319-329,2002）。更には、上記デンドリマーの均等物として、SPL-7013を挙げることができる。SPL-7013は、HIVに対して活性を示す。加えて、上記デンドリマーの均等物として、デンドリマー様星形ポリマーなどを挙げることができる（Trollsas et al., Polymer Preprints 41(1): 258-259, 2000）。

PAMAM、PAMAM(EDA)及びポリ（リジン）デンドリマーは、多様なウイルスに対して、生体外活性を示す。多様なウイルスには、ヘルペス単純ウイルス（Bourne, et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44(9): 2471-2474, 2000）、インフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス（RSV: respiratory syncytial virus）（Barnard, et al, Antivir. Res. 34: A88, 1997）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV: human immunodeficiency virus) (Witrouw, et al., Antiviral Research 41: A25, 1999)などが含まれる。

本実施例の抗ウイルス性組成物は、Sペプチド、Sp-DNase-PEG-D-PEG-$(T^b)_r$及びSタンパク質、SP-PEG-D-PEG-$(T^b)_r$を備える。本実施例の抗ウイルス性組成物は、RNase核酸分解活性及びDNase核酸分解活性を備える非共有複合体$(T^b)_r$ -PEG-D-PEG-(RNase S)-DNase-PEG-D-PEG-$(T^b)_r$を形成してもよい。これにより、HIVの遺伝子ssRNA及び中間dsDNAの両方、HIVの遺伝子dsDNA及び中間ssRNA並びにいくつかの他のRT依存性ウイルスを標的化する目的において、本実施例の抗ウイルス性組成物は魅力的なものとなる。

【０２６２】

（実施例７）

（多数のオリゴヌクレオチドを搬送する「コア」デンドリマーの準備）

本実施例は、化学的に修飾された「コア」デンドリマーの準備について説明する。このコア・デンドリマーは、多数の配列特異的オリゴヌクレオチド$L_{(-)}$を含有する。このような$L_{(-)}$修飾デンドリマーは、更に、ワトソン・クリックのハイブリダイゼーション及び多数の(Nuc^a,T^b)-P_n-$L_{(+)}$、k=1-8の直線状構造体若しくはモノファンクショナルの「シェル」デンドリマー(Nuc^a,T^b)-P_n-D_S-$L_{(+)}$のいずれかと共有結合を形成する。これらそれぞれは、上述のコア・デンドリマーの$L_{(-)}$オリゴヌクレオチドのうち１つの相補的なオリゴヌ

クレオチド$L_{(+)}$を備える。

Dendritech, Inc. (米国ミシガン州ミッドランド)から入手されたG-4 PAMAMデンドリマの0.1 Mの水性溶液が、窒素パージされた5 mMの2-イミノチオランHCl（MW=138 Da）又はPierce社（米国イリノイ州ロックフォード）から入手されたTraut's Reagent (TR)及び、PBS中の1 mM EDTAで、pH=8.0の環境下で処理され、デンドリマ・アミン末端でスルフヒドリル基を導入する。代わりに、SPDP（MW=312Da、N-サクシニミジル 3-[2-ピリジルジチオ]プロピオネート）（N-succinimidyl 3-[2-pyridyldithio]propionate）が同一の目的で用いられてもよい（米国特許出願2002/0187198　出願人：Lee）。結果として、SH修飾された「コア」デンドリマー$D_{SH}=D_c$-NH-C-$(CH_2)_3$-SHとなる。

デンドリマーD_{SH}は、2 kDaのPEGリンカを介して、固相の「シード」マトリックスに固定化される。このシードマトリックスは、実施例４で説明したように、化学的に不活性なPEGを主体とする親水基を備える。$L_{(-)}$-PEG-VS複合体は、順次添加され、親水性の固相マトリックス上に固定されたデンドリマーのSH末端基とのVS基の共有結合を可能とする。$L_{(-)}$-PEG-VS複合体それぞれは、固定化されたデンドリマーの濃度に対して１：１の濃度比で導入される。$L_{(-)}$-PEG-VS複合体のうち１つは、各固定化されたデンドリマーに対して１つの平均的な量で共有結合し、結合しない複合体は洗い流される。この手順が繰り返され、順次３つの複合体が共有結合する。最後に、固定化されたデンドリマーとPEGを主体とするマトリックスとの間の共有結合が標準的な技術を用いて開裂される。

【０２６３】

（実施例８）

（多数のアームを備えるモノファンクショナル「シェル」デンドリマーの準備）

多数のアームを有するモノファンクショナル「シェル」デンドリマーの準備が、多数のモノファンクショナル$(Nuc^a)_q$-PEG-$L_{(+)}$又は$(T^b)_r$-PEG- $L_{(+)}$アーム構造体をPAMAM G-2デンドリマーに結合することによりなされる。結合されたアーム構造体それぞれは、配列特異的オリゴヌクレオチド$L_{(+)}$を備える。この配列特異的オリゴヌクレオチド$L_{(+)}$は、Locked Nucleic Acid（登録商標）オリゴヌクレオチド$LNA_{(+)}$により例示される。このLocked Nucleic Acid（登録商標）オリゴヌクレオチド$LNA_{(+)}$は、G-2デンドリマーに共有結合した多数の配列特異的オリゴヌクレオチド$LNA_{(-)}$のうち１つに相補的である。G-2 PAMAMデンドリマーは、Dendritech, Inc.（米国ミシガン州ミッドランド）から入手可能である。G-2 PAMAMデンドリマーは修飾され、実施例７で説明したような末端$L^a{}_{(-)}$及び$L^x{}_{(+)}$オリゴヌクレオチドを含有する。各モノファンクショナルG-2「シェル」デンドリマーD_sは、少なくとも１つの$L^x{}_{(+)}$を備え、この$L^x{}_{(+)}$は、実施例７で説明したようなG-3「コア」デンドリマーに共有結合した多数の$L^x{}_{(-)}$オリゴヌクレオチドのうち１つに相補的である。それから多数の$(Nuc^a)_q$-PEG-$L_{(+)}$及び$(T^b)_r$-PEG- $L_{(+)}$構造体は対応する相補的$L^{a,b}{}_{(-)}$とワトソン・クリックのハイブリダイゼーションを受け、モノファンクショナル[$(Nuc^a)_q$-PEG-$L^a{}_{(+)}$-$L_{(-)}]_z$-Ds- $L^x{}_{(+)}$となる。

【０２６４】

４種類のモノファンクショナル「シェル」G2デンドリマーが合成される。１つは、[$(N^a)_q$-PEG-$L^a{}_{(-)}]_4$- $L^a{}_{(+)}$-D_s- $L^x{}_{(+)}$であり（a=1, q=8）、他の４つは、[$(T^b)_r$-PEG- $L^b{}_{(+)}]_4$-$L^b{}_{(-)}$-D_s-$L^x{}_{(+)}$である（b=1-4）。これらそれぞれは、特有の$L^x{}_{(+)}$を備える（x=1-5）。x=1-5それぞれについて、以下のデンドリマーが合成される。

（１）核酸分解デンドリマー[$(SHD)_8$-PEG)]$_4$-D^1-$LNA_{(3'-5')}$。このデンドリマーは、４つの「重合アーム」を運搬し、この重合アームそれぞれは、８つの核酸分解トリペプチドSer-His-Aspを運搬する。

（２）ウイルス核酸標的デンドリマー（PNA-PEG）$_4$-D_s-$L_{(3'-5')}$。このデンドリマーは、４つの「重合アーム」を運搬する。４つの重合アームそれぞれは、標的化されたウイルス核酸のヌクレオチド配列に相補的なPNAを運搬する。

（３）膜透過型デンドリマー（R8）$_4$-D^4-$LNA_{(3'-5')}$。このデンドリマーは、４つの「重合アーム」を運搬する。４つの重合アームそれぞれは、単一の膜透過型ペプチドR8を運搬する。

（４）核局在デンドリマー。このデンドリマーは、８つの「重合アーム」を運搬する。８つの重合アームそれぞれは、核局在シグナル（NLS: nuclear localization signal）を運搬する。
（５）宿主標的デンドリマー（T-CSR）$_4$-D^5-LNA$_{(3'-5')}$。このデンドリマーは、４つの「重合アーム」を運搬する。４つの重合アームそれぞれは、単一のマンノース-6-リン酸塩残基を運搬する。
【０２６５】
実施例５において説明された好適な実施形態において、各モノファンクショナル「シェル」デンドリマーが、独自の特徴的なLNA$_{(3'-5')}$を備える。このLNA$_{(3'-5')}$は、コア「G-3」デンドリマーに結合した多数のLNA$_{(5'-3')}$^{k}のうち１つと相補的である。ここで、「K」は１から約５の整数である。相補的なLNA$_{(3'-5')}$とLNA$_{(5'-3')}$の対は、ワトソン・クリックのハイブリダイゼーションを受け、次の実施例９で説明されるように、LNA$_{(5'-3')}$に結合した「休止した」基（dormant group）が活性化するとき、共有結合が形成される。
【０２６６】
（実施例９）
（ハイブリダイゼーション後の２つの相補的オリゴマーのその後の共有結合）
本実施例は、２つのオリゴ又はポリヌクレオチド又はオリゴ様又はポリヌクレオチド様分子の共有結合のための方法を説明する。この共有結合のための方法は、ワトソン・クリックのハイブリダイゼーションの後に行われる。この方法により、活性抗ウイルス性成分を運搬する多数の多アーム型「シェル」デンドリマーと「コア」デンドリマーの共有結合がもたらされる。
各シェル・デンドリマーは、１若しくはそれ以上の修飾されたオリゴマーを備える。この修飾されたオリゴマーは、LNA（Locked Nucleic Acid（登録商標））、BNA（架橋化核酸：Bridged Nucleic Acid）、PNA (ペプチド核酸: Peptid Nucleic Acid:)などを備える。これらは、コア・デンドリマーに共有結合した多数のオリゴマーのうち１つに相補的である。コア・デンドリマーにおける相補的オリゴマーは、多官能性試薬を用いて、化学的に修飾され、ハイブリダイゼーションの後の２つの相補的オリゴマーの間の共有結合の形成が可能となる。
【０２６７】
多官能性試薬は、２若しくはそれ以上の高反応性化学基を含む。化学基のうち１つは、活性化するまで、非活性若しくは休止した状態を保つ。他の化学基は、永続的に活性を示す。この活性を有する基は、コア・デンドリマーに結合した相補的オリゴマーに試薬を結合するために用いられる。コア及び相補的シェルオリゴマーの間でワトソン・クリックのハイブリダイゼーションが行われた後、コア・オリゴマー上の休止した活性基が活性化し、結果として、２つの相補的オリゴマー間で共有結合を生ずる。
本実施例において、多官能性試薬N,N,N'-tri-(β-クロロエチル)-N-(p-ホルミルフェニル)プロピレンジアミン-1,3(TFP)が用いられ、提案される技術が実行される。
２つの高い反応性を有する脂肪族の（β-クロロエチル）アミノ基が用いられ、コア・デンドリマーの相補的オリゴマーのうち１つに試薬を結合する。第３の休止状態の若しくは潜在的に活性を有する芳香族の（β-クロロエチル）アミノ基の反応度が、隣接するホルミル基により強く抑制される。修飾コア・オリゴマーとその相補的シェルオリゴマーの間のハイブリダイゼーションが行われた後、コア・オリゴマー上の休止した状態にある反応基が、水素化ホウ素ナトリウムを用いて低減することにより活性化する。この結果、相補的コア・オリゴマーとシェルオリゴマーの共有結合がなされる。
【０２６８】
２つの脂肪族の基を用いてのコア・オリゴマーへの多官能性試薬の結合は、50%メタノール／5 mMトリス塩酸内（pH 7.5 室温で10-15分間）で行われる。反応混合物は、0.8 mMのTFPと1 mL当たり50-100μgのオリゴ／ポリヌクレオチドを含有する。修飾されたオリゴ／ポリヌクレオチドは、エタノールを用いて沈殿され（20℃で、2時間）、遠心分離機にかけられる。ペレットが10 mMのトリス塩酸（pH 7.5）内で溶解される。非結合状態の試

薬を除去する為に、反応物からのオリゴ／ポリヌクレオチド溶液が、平衡されたセファロースG-50カラムに供給され、10 mMのトリス塩酸を用いて溶離される。TFP処理されたオリゴ／ポリヌクレオチド内の修飾されたオリゴヌクレオチドのパーセンテージを見積もるために、後者がサンプルとして加水分解される（１MのNaOH, 18時間, 37℃）。そして、修飾されたヌクレオチド及び修飾されていないヌクレオチドがペーパ・クロマトグラフィにより解析される。修飾された相補的オリゴマー及び非修飾の相補的オリゴマーがその後、実施例５で説明したように、それぞれに対応するコア・デンドリマー及びシェル・デンドリマーに共有結合する。修飾されたコア・オリゴマーと非修飾の相補的シェルオリゴマーのハイブリダイゼーションの後、休止状態のクロロエチル基が、水素化ホウ素ナトリウムを最終濃度が10 mMになるまで溶液に添加することにより活性化する。そして、混合物は、４時間４０℃でインキュベートされる。この手順により得られた共有結合したシェル－コア・デンドリマーは、多価基盤（多価プラットフォーム）として、本発明の抗ウイルス性ヌクレアーゼ及びリガンドの搬送に用いられる。

【０２６９】

（実施例１０）

（多価コア－シェル共有結合複合体を形成するための自己相補型修飾LNAを搬送するコア及びシェル・デンドリマーの準備）

本実施例は、多数のシェル・デンドリマーD_sと単一のコア・デンドリマーD_cの間の共有結合複合体について説明する。これらデンドリマーは修飾され、これらの末端基において相補的なオリゴヌクレオチドを含む。

【０２７０】

各シェル・デンドリマーは、特異的ヌクレオチドD_s-$L^{a,b}_{(+)}$の単一の配列を運搬する。この特異的ヌクレオチドD_s-$L^{a,b}_{(+)}$は、多数のオリゴヌクレオチド$L^{a,b}_{(-)}$-D_sのうち１つと相補的である。この多数のオリゴヌクレオチド$L^{a,b}_{(-)}$-D_sは、コア・デンドリマーD_cに結合する。結合数nは約５個である。各シェル・デンドリマーの相補的ヌクレオチド$L_{(+)}$は、コア・デンドリマーの対応する相補的ヌクレオチド$L_{(-)}$と、ワトソン・クリックのハイブリダイゼーションを受ける。コア・デンドリマーの相補的ヌクレオチド$L_{(-)}$は、化学的に修飾され、追加の休止状態の基を含有する。この追加の休止状態の基は、化学的に活性化され、２つのハイブリダイゼーションされたオリゴヌクレオチドの間に共有結合を形成することを可能とする。

【０２７１】

相補的ヌクレオチド$L_{(+)}$と$L_{(-)}$の化学的組成物は、例えば、Locked Nucleic Acid（登録商標）（LNA）である。LNAは、核酸類似体の新規な分類であり、構造的にRNAヌクレオチドに類似する。「locked nucleic acid」との用語は、メチレンリンカの存在によるフラノース環の構造的制約を強調するために作り出されたものである。メチレンリンカは、2'-O部位を4''-C部位に結合し構造的に標準的RNAモノマーを摸倣させるものである。LNAオリゴマーは、ワトソン・クリックの塩基対合則に従い、相補的LNA及び相補的DNA及びRNAに混成する。この相補的LNA及び相補的DNA及びRNAは、十分な熱安定性と選択性を備える。相補的LNA/LNAの二本鎖は、他の核酸二本鎖よりも高い安定性を示す（Koshkin, et al. J. Am. Chem. Soc., 120: 13252-13260, 1998）。

自己相補型システイン末端LNA 12-mersがProligo, LLC（米国コロラド州ボルダ）により合成される。このProligo, LLCは、以下の構造を備える。

$LNA_{(+)}$: 5'-Cys-TAATACGACTCA-3'(SEQ ID NO: 58)及び$LNA_{(-)}$: 3'-ATTATGCTGAGTCys-5'(SEQ ID NO: 59)である。

自己相補型システイン末端LNA 12 mersと異なるヌクレオチド配列の５つの対が合成され、コア及びシェル・デンドリマーに結合される。

【０２７２】

デンドリマーは、ナノスケールの高分子共有結合コア－シェル集合体であり、規則正しく配置された原子、繰り返し分岐ユニット（モノマー）及び末端官能基を備える。末端官能基は、焦点又はコアの官能基を取り囲む（Tomalia et al, Pure Appl. Chem., 72(12):

2343-2358, 2000）。この構造のため、デンドリマーは、機能的モジュールとして作用し、正確に設計された治療薬に対する障害を構築する。

第３世代ポリアミドアミン（PAMAM: polyamidoamine）G-3デンドリマーは、３２個の表面第１級アミン基を含有する。第３世代ポリアミドアミン（PAMAM: polyamidoamine）G-3デンドリマーは、コア・デンドリマーとして選択される。

５つの第１世代PAMAM G-1デンドリマーそれぞれは、８つの表面第１級アミン基を含有する。５つの第１世代PAMAM G-1デンドリマーは、シェル・デンドリマーとして用いられる（Tomalia et al., Pure andApplied Chemistry 72, 2343-2358, 2000）。コア・デンドリマーは、固体の親水基に束縛される（Grotli, et al. J. Combi. Chem. 2000, 108-119, 2000）; Buchardt, et al. Tetrahedron Lett. 39: 8695-8698, 1998)。

NH_2末端G3デンドリマーの表面第１級アミンは、実施例７で説明したように、Traut's試薬を用いて修飾され、３２個のSH基を有するD_{SH}を得る。

【０２７３】

2kDaのPEG誘導体LNA^k-PEG-MALそれぞれは、特徴的なLNA^kを備える（kは５の値を有する）。2kDaのPEG誘導体LNA^k-PEG-MALは、以下の手法で束縛されたコア・デンドリマーD_{MAL}の遊離SH基に結合される。

1:1の濃度比で添加された第１の$LNA^1{}_{(+)}$の結合は18℃の温度で最初の15分間行われる。その一方で、５つのLNA全ての結合が18℃の温度で2時間行われる。しかしながら、後のLNAオリゴマーの添加は、60-64時間後のヘプタ／オクタデンドリマ複合体の混合物の形成に伴い、漸近的にゆっくりとなる。

【０２７４】

多数のシェル・デンドリマーと単一のコア・デンドリマーの間のハイブリダイゼーション並びにその後の共有結合形成は、５つのモノファンクショナルPAMAM G-2デンドリマーD_s^kを用いて行われる。各シェル・デンドリマーは、$LNA^k{}_{(-)}$の単一の複製を搬送する。$LNA^k{}_{(-)}$の単一の複製は、ヌクレオチド配列を備え、このヌクレオチド配列は５つの$LNA^k{}_{(+)}$のうち１つと相補的である（kは1-5の値を有する）。５つの$LNA^k{}_{(+)}$は、コアPAMAM G-3デンドリマーD_cと共有結合する。

【０２７５】

（実施例１１）

（RNaseの制御された放出をもたらす抗ウイルス性組成物mPEG-RNase I）

溶解並びに分解可能なメトキシ-ポリエチレン・グリコールサクシニルコハク酸エステル(mPEG-SS: methoxy-polyethylene glycol succinyl succinate)のヒトRNase Iへの結合は、溶解液中への結合ヌクレアーゼの制御可能な放出をもたらすとともにタンパク質分解への耐性及びRNaseの細胞取込み率を増大させる。

【０２７６】

分解可能なPEG誘導体は、加水分解性の不安定な基を備える。分解可能なPEG誘導体は、例えば、サクシニミジルコハク酸エステル（mPEG-SS）である。mPEG-SS活性エステルは、タンパク質のアミノ基と急速に反応し、アミド結合（-CO-NH-）を形成する。この結合は、急速な加水分解並びにヌクレアーゼからのmPEGの分離を受ける。急速すぎる加水分解を避けるために、mPEGサクシニミジル炭酸塩が用いられる（J. M. Harris, 米国特許出願2001/0021763 A1を参照）。

【０２７７】

野生型の組換ヒトRNase Iが25 mg/mLの濃度で、蒸留水内に溶解され、セファデックスG-25カラム（1.6×14.0 cm）内の10 mMの$CaCl_2$に供給される。溶離の間、2.0-2.2 mLの少量が回収され、280 nmの波長で光学的密度が計測される。280 nmでの高い光学的濃度を備える少量の液が結合される。溶液中のタンパク質濃度は、約6.5 mg/mLである。

1.4 mLのゲル濾過により精製された10 mMの$CaCl_2$中の0.8 mgのRNase Iに、136.8mLの0.25Mのリン酸塩カリウム緩衝液（PPB: phosphate potassium buffer）及び0.6 mLの蒸留水中のpH 8.0及び127.4 mLのプロテアーゼ阻害剤PMSF（0.8 mg/mL）の混合液が添加され、最終体積 2mLを得る。溶液は、遠心分離機にかけられ、浄化される。

【０２７８】
浄化されたRNase Iに対して、64 mgのmPEG-SS（２つの部分中）が添加される。混合物が５分間かき混ぜられ、室温で１５分間ゆっくりと振動が与えられる。その後、溶液は、セファデックスG-75カラム（1.6×3.0 cm）に供給される。サンプルは、5 mMの$CaCl_2$を用いて溶離される。そして、2.0-2.4mLの少量の溶液が回収される。タンパク質量が、280 nmの波長で、分光光度法を用いて検知される。
【０２７９】
回収された少量の溶液は、氷浴にさらされ、ペグ化されたRNase I (5-15 mg)を備える一定分量のサンプルが、1.5 mLのPPB及びアセトン（0.3 mg/mL）中の0.5 mLのフルオレスカミンの混合液中に希釈される。混合液の蛍光度が、475 nmの励起波長で計測される。タンパク質中の第１級アミノ基の量はタンジェント角に比例する。RNase Iのペグ化の比率の蛍光度による計測は、ほんの1-2のリジン残基がペグ化（pegylation）され、空間的障害因子が、残存するリジン残基に対するタンパク質構造により作られることを示す。ヒトRNase Iのペグ化は、ssRNAコロナウイルスに対する抗ウイルス性効果を向上させる。
【０２８０】
（実施例１２）
（ヒトDNase Iの多価(mc: multiple-charged)組換変異体のdsDNAに対する向上された加水分解活性）
本実施例は、高分子量のsalmon DNA（Sigma Corp社：米国ミズーリ州セントルイス）の分解を示す。高分子量のsalmon DNAは、アミノ酸置換物を有する、多価（mc: multi-charged）mcDNase Iの以下に示す組換形態それぞれを備える。
（１）mcDNase (+2)。これは置換物E13R/N74Kを備え、置換物E13R/N74Kは、２つの追加の電荷を与える。
（２）mcDNase (+3)。これは、置換物E13R/N74K/T205Kを備え、置換物E13R/N74K/T205Kは、３つの追加の電荷を与える。
（３）mcDNase (+5)。これは、５つの置換物E13R/T14K/H44R/N74K/T205Kを備える。これら置換物は、５つの追加的な電荷を与える。
（４）DNase Iの抗アクチン形態（本明細書中、「arDNase」(+1)と称する）。これは、１つの追加の電荷を与える置換物A114Rを備え、アクチンの阻害効果に対する抗性を与える。
（５）mc/arDNase (+6)の高活性／抗アクチン形態。これは、置換物E13R/T14K/H44R/N74K/T205K/A114Rを備え、これらは、６つの追加の電荷を与える。
【０２８１】
リン酸塩緩衝液（ph 7.5、DNA濃度5 ng/mL）中の標的dsDNAは、生体内における感染細胞中のウイルス性DNAのピーク濃度に近似している。この濃度は、血清(約25-250 ng/mL)中の内因性宿主DNAの典型的な濃度よりも低い水準である（Pan, et al., J. Biol. Chem. 273, No 29: 18374-18381, 1998）。
DNase活性の標準的なアッセイは、酸不溶性のDNAポリマー（冷却された2.25mol/Lの過塩素酸により沈殿可能である）の非沈殿製酸化可溶性断片への変換に基づく。この断片は、λ=260 nmでの分光光度法による計測において20 bp若しくはそれ以下の長さである（Dewez, et al., Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 31, 793-797, 1993）。
5 kbpのdsDNA(500μg/mL)の50%可溶化に必要とされる代表時間の３倍の時間をかけて、mc及びmc/ar-DNase (+1から+6)の正電荷変異体それぞれにより実行された結果が、野生型ヒトDNase Iにより分解された同一の5kbp dsDNAの50%可溶化時間と比較される。
【０２８２】
正の電荷を付加されたアミノ酸による中性アミノ酸の置換物を有する多価組換型ヒトmcDNase Iの様々な形態が、野生型DNase Iと比較して、ヒトの血清の存在下において、dsDNAに対する高い加水分解活性を有することを表１のデータは示している。更に、DNase Iにアクチン抗性をもたらす置換物A114Rは、DNase I加水分解活性を増加させる。このことは、ヒトの血清中のGアクチンの存在に起因するものと推測される。

【０２８３】
（表１）
（未変性DNase I、多価（mc: multi-charged）DNase I及びDNase Iのアクチン抗性(ar: actin-resistant)形態によるヒトの血清中のdsDNAの加水分解）

DNase I変異体	時間 T_{50}（分） 50% DNA加水分解	平均 T_{50}（分） 50% DNA加水分解
DNase I	26; 28; 30	28
mcDNase (+3)	10; 11; 12	11
mcDNase (+5)	5; 6; 7	6
arDNase (+1)	2; 3; 4	3
Mc/arDNase (+6)	0.5; 1; 1.5	1

【０２８４】
（実施例１３）
（フェントン様反応（Fenton-like reaction）を介して、DNA及びRNAを標的化する化学的ヌクレアーゼが核酸を開裂する）
多くの遷移金属複合体が、酸化的損傷を被ることが可能であり、フェントン様反応を介してDNA及びRNAを開裂できる。H_2O_2及びアスコルビン酸といった電子供与体の存在下において、化学的ヌクレアーゼFe(III)-BABEは、大量のヒドロキシルラジカルを作り出し、ウイルスDNA及びRNAの酸化的加水分解をもたらす。DNA及びRNAに対する同様の効果は、Fe(II)-EDTA及びCu(II)グルタチオン又はグリシン-グリシン-リジン複合体に対しても観察できる。これら複合体のいくつかは、もしウイルス核酸を標的化するならば、効果的な抗ウイルス性薬剤として作用する。
【０２８５】
FE(II)-EDTA、過酸化水素並びに電子供与体としてのアスコルビン酸（Fe-HP-AA）の相互作用により誘発されたフェントン様反応を介して発生した反応性酸素種によるDNA及びRNAの分解が表２Aに示される。RNA及びDNAの加水分解は、トリス塩酸緩衝液（pH 7.2）、0.1 mMのFe(II)-EDTA、0.25 mM及び0.1 mMのアスコルビン酸内で、３０分間３７℃の温度で決定される（このことは、Dewez, et al., Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 31, 793-797, 1993で述べられているものと同様である）。Fe(II)複合体の抗ウイルス活性は表２Bに示される。TCD_{50}/mL内で発現したウイルス複製は、実施例１４で説明される如くアッセイされる。
【０２８６】
（表２A）

基質	加水分解（%） コントロール	加水分解（%） Fe-HP-AA
Yeast RNA	3	64
Salmon DNA	2	72

【０２８７】
（表２B）

ウイルス	コントロール	Fe-HP-AA
ヘルペス単純ウイルス	6.2; 6.4; 6.0	4.3; 4.2; 4.1
インフルエンザウイルス	7.4; 7.2; 7.5	5.2; 5.3; 5.4

【０２８８】
（実施例１４）

（DNase-PEGと比較したDNase-PEG-PNAの高い抗ウイルス活性）

相補的ヌクレオチド配列と水素結合を形成することができるヌクレアーゼ耐性PNA分子及びプロテアーゼ耐性PNA分子の生成は、様々なリガンドを標的ウイルスDNA及びRNA分子に向けるメカニズムをもたらす。遺伝子DNAに相補的なPNA及び病原性ウイルスを複製する中間RNAの形態は、本明細書において、ヌクレアーゼを標的DNA及びRNA分子に搬送するために用いられる。これにより、これら核酸の加水分解並びに病原性ウイルスの複製の抑制がなされる。

相互作用に立体的に利用可能なワクシニアウイルス（VV: vaccinia virus）DNAの４つの異なるヌクレオチド配列と相補的な18-merのbis-PNAのN末端リジン残基を備える分子が、実施例１で示す如く、分岐した2×20 kDaのPEGとヒトDNase I (DNase)と結合する。

【０２８９】

VVに対して標的化されたこれら構造体の抗ウイルス活性は、非修飾の野生型ヒトDNase I及びPEGと結合したDNase Iの抗ウイルス活性と比較される。PNAの標的作用は表３に示すデータにより示される。VV複製に対する修飾DNase Iの効果をアッセイするために、１０％の不活性のウシ胎仔血清（FBS: fetal bovine serum）を備える199/Eagle's培地（45% + 45%）内で宿主細胞が成長される。成長培地199は細胞を維持するために用いられる。ウイルス複製速度に対する酵素の抗ウイルス活性は、100 TCD_{50}/0.1 mLのサイトメガロウイルス(CMV: cytomegalovirus)を接種された細胞培養物に投与される酵素の影響により決定される。DNaseは、500 KuU/mLの量で投与される。CMV接種細胞は、mcDNase及びnbDNaseで処理され、３７℃で４８時間インキュベートされる。その後、細胞は冷凍され、滴定濃度が決定されるとともにlog TCD/0.1 mLで表される。

【０２９０】

（表３）

（サイトメガロウイルスに対する修飾DNase Iの抗ウイルス活性）

ヌクレアーゼ[500 UA/mL]	ウイルス滴定濃度 [logTCD_{50}/0.1mL]	平均滴定濃度 [logTCD_{50}/0.1mL]
コントロール	7.3, 7.6, 7.4	7.4
DNase	6.3, 6.4, 6.5	6.5
PEG-DNase	3.2, 3.4, 3.5	3.4
$(PNA)_2$-PEG-DNase	0.2, 0.3, 0.4	0.3

データは、DNaseが効果的である一方で、非修飾DNaseと比較して、PEG-DNaseがより一層効果的であり、$(PNA)_2$-PEG-DNaseが更に効果的であることを示している。

【０２９１】

（実施例１５）

（R8-PEG-DNaseがワクシニアウイルス（VV: vaccinia virus）に対する増大した抗ウイルス活性を生じせしめる）

ウシDNase I(DNase)、DNase-PEG及びDNase-PEG-R8複合体の細胞吸収性がHepG2細胞株（ヒト肝細胞癌細胞ATCC, No-HB-8065）を用いて評価される。HepG2細胞は、５６℃で３０分間熱不活性化された１０％のウシ胎仔血清（FBS: fetal bovine serum）を備える199/Eagle's培地（45 % + 45 %）内で、３７℃の温度で成長された。製造者指示書（Pierce, Inc. 米国イリノイ州ロックフォード）にしたがって、蛍光ローダミン(*)を用いて標識化される。*DNase-PEG-K-R8のHepG2細胞内への浸透が、３７℃でのDMEM内におけるHepG2細胞の３０分間のインキュベーションの後の*DNase及び*DNase-PEGの浸透と比較される。

【０２９２】

蛍光光度計を用いての細胞浸透走査により、DNase-PEG-R8のHepG2細胞内への吸収が、DNase-PEG及びDNase単独の場合の吸収よりも有意に高いことが示される（表４A）。修飾DNaseのVV複製への影響を調べるために、１０％の不活性のウシ胎仔血清（FBS: fetal bovine serum）を備える199/Eagle's培地（45% + 45%）内で細胞が成長される。細胞を維持す

るために、成長培地199が用いられる。

【０２９３】

DNase由来の組成物の抗ウイルス活性は、細胞培養物内に投与された酵素が与える100 TCD_{50}/0.1mLのVVを接種されたウイルス細胞の複製速度への影響を解析することにより決定される。DNaseは、500KuU/mLの量、投与される。VVを接種した細胞は、DNase及びDNase複合体で処理され、３７℃の温度で４８時間インキュベートされる。その後、細胞は冷凍され、VVの滴定濃度が決定され、log TCD/0.1 mLで表される。DNase複合体の抗ウイルス活性は、表４Bに示される。

【０２９４】

（表４Ａ）

（HepG2無傷細胞並びにワクシニアウイルスVVに感染したHepG2細胞内へのローダミン標識化*DNase, PEG-*DNase及びPEG-*DNase-R8複合体の細胞吸収）

標識化された修飾*DNase	OD (430 nm)	標識化された修飾*DNase	OD (430 nm)
HepG2無傷細胞		HepG2 VV感染細胞	
*DNase	37	*DNase	48
*DNase-PEG	45	*DNase-PEG	55
*DNase-R8	87	*DNase-R8	95
*DNase-PEG-R8	105	*DNase-PEG-R8	130

【０２９５】

（表４Ｂ）

（DNase, PEG-DNase及びPEG-DNase-R8複合体のHepG2細胞内でのワクシニアウイルスの複製に対する抗ウイルス活性）

修飾DNase	Log TCD_{50}	平均Log TCD_{50}
HepG2無傷細胞		
コントロール	6.8; 6.6; 6.6	6.6
DNase	4.6; 4.8; 4.8	4.7
DNase-PEG	4.0; 4.0; 3.8	3.9
DNase-R8	3.0; 3.2; 3.2	3.1
DNase-PEG-R8	2.3; 2.4; 2.2	2.3

【０２９６】

（実施例１６）

（R8-PNA-PEG-DNaseとR8-PNA-PEG-RNaseを組み合わせて投与することに起因するワクシニアウイルス（VV: vaccinia virus）の複製に対する相乗的抑制作用）

ウイルスRNAの中間形態がVV DNAの複製の間現れるので、MPP-PEG-PNA-DNaseとMPP-PEG-PNA-RNaseの組み合わせた効果は、これら調剤を別個に与えるときよりも、VVの複製に対して一層強い抑制作用をもたらす。

MPP-PEG-PNA-RNase及びMPP-PNA-PEG-DNase複合体は、実施例１にて説明したように準備される。複製の間のワクシニアウイルス(VV: vaccinia virus)は、中間mRNA分子を形成する。この中間mRNA分子は、ウイルス蛋白質をコード化する。

修飾DNase Ｉ（これは、ウイルス遺伝子DNAを分解する）及び修飾RNase（これは、中間ウイルスRNAを分解する）の組み合わせは、表５に示す如く、VVに対するDNaseの抗ウイルス活性を有意に向上させる。

【０２９７】

（表５）

（DNase-PEG-PNA-R8及びRNase-PEG-PNA-R8を組み合わせて投与することに起因するワクシニアウイルス(vv: vaccinia virus)の複製への抗ウイルス作用）

ヌクレアーゼ	VVの滴定濃度 log TCD/0.1 mL	VVの平均滴定濃度
コントロール	7.4; 7.0; 7.2	7.2
DNase-PEG-PNA-R8	4.7; 5.0; 5.2	4.9
RNase-PEG-PNA-R8	6.5; 6.7; 6.5	6.56
DNase-PEG-PNA-R8 + RNase -PEG-PNA+R8	2.4;2.2;2.0	2.2

【０２９８】
（実施例１７）
（HIV複製に対する複合ヒトデオキシリボヌクレアーゼI、ヒトリボヌクレアーゼI及びヒトリボヌクレアーゼHの合成阻害作用）
HIV複製は、ウイルス性ゲノムRNAの逆転写酵素によって起こる。そしてHIVの複製は、RNA/DNAハイブリッドを形成する。RNAは、リボヌクレアーゼHにより分解されやすい。１本鎖DNAは複製される。そして２本鎖DNAは宿主ゲノムへと統合される。この１本鎖DNA及び２本鎖DNAは、DNA依存性RNAポリメラーゼにより転写される。新しく出現したmRNAは翻訳され、逆転写酵素（RT）及びカプシドタンパク質を形成する。したがって、RNA/DNAハイブリッド分子内に存在するRNAを分解するためのリボヌクレアーゼH、RNA/DNAハイブリッド内にありRNAの加水分解後に残る１本鎖DNAを分解するためのセリン・ヒスチジン・アスパラギン酸などの１本鎖デオキシリボヌクレアーゼ、２本鎖DNAを分解することができるデオキシリボヌクレアーゼI及びRNAを分解するためのリボヌクレアーゼの複合体は、共に作用して強力な抗HIV複合体を作り出す。
【０２９９】
本明細書中に記載されている実施形態は、前記抗HIV複合体の有効性を証明している。MT-4細胞が９６ウェルのマイクロプレート内で培養される。この培養は１０パーセントの加熱不活性化したFBS、３００μg/mLのL-グルタミン及び１００μg/mLのストレプトマイシンが添加されたイーグル培地で行われる。さらにMT-４細胞は、細胞懸濁液（２×１０^{6} cells per mL）をウイルス懸濁液と混合させることにより感染する。感染の多重度（MOI）は０．２である。この混合物は、ウイルス吸着のために１時間摂氏３７度で培養される。感染細胞はその後、新たな完全培地を追加することで１ミリリットル当たり濃度５×１０^{5} 細胞まで薄められる。さらにこの感染細胞は、５パーセントの二酸化炭素空気内において摂氏３７度で培養される。この培養は、９６ウェルマイクロプレート中のヌクレアーゼの各種化合物がある場合又はない場合とで行われる。この実験はそれぞれの濃度で３回ずつ行われる。コントロール細胞も同様の状況下で培養される。
【０３００】
（表６）
（修飾ヌクレアーゼの化合物が有する抗HIV活性）

ヌクレアーゼ[UA/mL]	平均ＲＴ活性[％]	p24[％]
非感染細胞MT-４：		
デオキシリボヌクレアーゼPEG[0;10; 100;500]	不検出	不検出
HIV感染細胞MT-４		
デオキシリボヌクレアーゼPEG[0;10; 100;500]	[100;47;27;15]	[100;27;19;11]
リボヌクレアーゼPEG[0;10; 100;500]	[100;54;41;21]	[100;37;22;15]
リボヌクレアーゼH-PEG[0;10; 100;500]	[100;41;23;12]	[100;31;22;18]
(デオキシリボヌクレアーゼ＋リボヌクレアーゼ)-PEG[0;10; 100;500]	[100;26;15;10]	[100;12;8;5]
(デオキシリボヌクレアーゼ＋リボヌクレアーゼ＋リボヌクレアーゼH)-PEG[0;10; 100;500]	[100;12;5;2]	[100;7;4;1]

【０３０１】

（実施例１８）

（HIVはヌクレアーゼによる治療に対する耐性を形成しない）

エイズ患者治療に使用される薬に対する耐性を有するHIV臨床分離株の発現は、エイズ治療において極めて重要な問題のうちの一つである。AZTから発生するヌクレオチド類似体、非ヌクレオチド逆転写酵素阻害剤（NNRT）並びにHIVプロテアーゼ阻害剤は、最終的にHIV耐性を誘発し、これらの治療活性を低減させる。一般的に、薬剤耐性は遺伝子のヌクレオチド配列を変更する変異体に起因して増大する。この遺伝子のヌクレオチド配列は、HIV構造をコード化する。HIV構造とは、例えば抗HIV薬を対象とする逆転写酵素（RT）又はHIVプロテアーゼである。

【０３０２】

阻害薬と対照的にヌクレアーゼは、ウイルス核酸を分解する。またヌクレアーゼはリン酸ジエステル結合を分裂させる。このリン酸ジエステル結合は、ウイルスゲノムのヌクレオチド配列内での突然変異変更に関わらずヌクレオチド間で起こる。ヌクレオチド結合内部の化学的性質の変化は、ヌクレアーゼに対する耐性を有するそのような結合を必要とするが、突然変異によっては不可能である。複製するために、ウイルス核酸は、保護タンパク質から分離する。したがってウイルス核酸は、ヌクレアーゼの加水分解作用に影響されやすい。そして、配列変化を伴う突然変異体が生存する可能性はほとんどない。本実施例における実施形態は、この考えを証明するために行われる。

【０３０３】

感染したMT-４細胞は野生型HIV-1(HXB2)に感染する。感染したMT-4細胞はその後、低濃度のAZT又は本発明における核酸分解組成物RDPにさらされる。このRDPはヒトリボヌクレアーゼPEG-PNA-R8+ヒトデオキシリボヌクレアーゼPEG-PNA-R8+合成核分散トリペプチドD-Ser-His-Asp(P)から形成される。実施例１で述べたようにヌクレアーゼは、PRG、Ｒ８及びPNAと共有結合している。子孫ウイルスが回収され、AZTあるいはRDPのいずれかの濃度が増加させながらMT細胞内で連続的に継代された。各継代後に回収したウイルスのAZT又はRDPに対する感受性が、$CD4^+$ ＨｅＬａ細胞内で行われたプラーク減少分析により測定された。

【０３０４】

後に続く継代中に徐々にウイルスが増殖することから明らかなように、耐性ウイルスの出現がAZT処理細胞内で観測される。AZT処理MT４細胞内のHIV-1第４継代までに、IC_{50}値は５０μMを上回る。より高濃度のAZTで試験すると、ウイルスの第６継代におけるIC_{50}値

は２５０μMを上回り、1000倍以上の感受性を示す。対照的に、RDPに対する耐性の増加は、第１０継代においても観測されない。ここで示されたデータは、ヌクレアーゼに対する耐性は長期間の治療後でさえ増大しないという考えを立証している。

【０３０５】

投与された薬によるHIV-1の阻害を研究のために、細胞が、感染多重度（MOI）0.1 $TCID_{50}$ per cellで接種される。また細胞は、2倍に連続希釈した薬を含む９６ウェルプレート（10^4 cells per well）の3つのウェルに分配される。MTT染色還元法により測定されるように、薬物処理されない細胞は7日目に完全に消滅する。表7に示すごとく継代を重ねるごとにAZTに対するウイルスの脆弱性は顕著に低下する一方で、各継代後のウイルスが依然としてRDPに感染しやすいことを示している。

【０３０６】

プラーク減少アッセイで使用する$CD4^+$を発現したＨｅＬａ細胞としては（Larder et al., Lancet 243, 1731-1734, 1989）に説明されるのと同様のものを用いる。すなわち、単層細胞を含む２４ウェルの培養皿に、培地内で様々な濃度の抗ウイルス薬中のウイルスを接種する。１つの希釈度につき２つのウェルが準備される。そしてプラーク減少の割合は、薬剤を使用しないコントロールの値に基づいて決定される。IC_{50}はメディアン効果プロットを用いて計算される。表７に示されるように、HIV-1感染細胞培地は、AZT及びRDPの濃度を増加させながら連続的に継代される。薬物濃度は、前の継代のウイルス複製の程度に基づいて決定される。表は、AZTを用いた培養ではAZT耐性HIV-1が出現するが、RDPを用いた培養では耐性ウイルスが出現しないことを示している。

【０３０７】

（表７）

（試験管内においてHIV-1のAZTに対する耐性が段階的に増大するが、RDPに対する耐性は増大しない）

継代	HIV-1の感染力[$log_{10}TCID_{50}$/mL]			
継代数	-AZT	＋AZT	-RDP	＋RDP
0	6.5	2.8	6.7	2.3
1	6.1	2.6	6.5	2.4
2	6.3	3.8	6.6	2.3
5	6.4	4.7	6.4	2.2
15	6.2	5.9	6.3	2.1

【０３０８】

（実施例１９）

（HIVタンパク質gp120と相互作用するCD４表面レセプターを結合させると、HIVに対するPEG-デオキシリボヌクレアーゼ複合体のウイルス活性が活発になる）

エンベロープウイルスにより標的化された宿主細胞の多くは、細胞表面レセプターを示す。宿主細胞は、特定のウイルスエンベロープリポタンパク質に対する高い結合親和力を有する。この特定のウイルスエンベロープリポタンパク質は、ウイルス融合に関連している。細胞表面レセプターは、感染細胞の細胞膜上に発現される。Ｔ４リンパ球のCD4表面レセプターはHIVタンパク質gp120に強い親和性を有する。本実施例では、ウシデオキシリボヌクレアーゼPEG-CD4複合体が、HIV感染細胞内の化合物をより高い濃度にすることを表している。また本実施例では、ウシデオキシリボヌクレアーゼPEG-CD4複合体が、デオキシリボヌクレアーゼPEGと比較してより強力な抗HIV活性を有することも示している。表８のデータは、デオキシリボヌクレアーゼPEG-CD4治療が、デオキシリボヌクレアーゼPEG治療と比較して、２つのHIV生成物、すなわちRT及びp24の量の減少につながることを示している。

【０３０９】

（表８）

（デオキシリボヌクレアーゼPEG複合体へのCD4 CSRの結合は、抗HIV活性を増大させる

)

ヌクレアーゼ[UA/ml]	平均ＲＴ活性[％]	P24[％]
非感染MT-4細胞		
デオキシリボヌクレアーゼPEG[0,100;500]	不検出	不検出
デオキシリボヌクレアーゼ-PEG-CD4[0,100;500]	不検出	不検出
HIV感染MT-4細胞		
デオキシリボヌクレアーゼPEG[0,100;500]	[100;27;15]	[100;19;11]
デオキシリボヌクレアーゼ-PEG-CD4[0,100;500]	[100;11;4]	[100;6.5;2.3]

【０３１０】

（実施例２０）

（鼻腔内、経口又はその他の経口でのヌクレアーゼ投与によるエイズ又はその他のウイルス性疾患の予防）

抗ウイルス性ヌクレアーゼは、胃腸プロテアーゼに対する耐性を有するように修飾される。この抗ウイルス性ヌクレアーゼは、経口、鼻腔内又はその他の経口経路で投与される。内因性プロテアーゼに対するヌクレアーゼの耐性は、PEG及び疎水性物質の結合により得られる。疎水性物質とは、例えばDSPE及び／又はプロテアーゼ阻害剤などである。私たちは、ペグ化されたベンゾナーゼのエアロゾル吸入が、RNAパラ・インフルエンザウイルス及びDNAアデノウイルスのそれぞれに感染した子牛内の感染拡大を阻止あるいは軽減することを証明する。ベンゾナーゼとは、デオキシリボヌクレアーゼ活性及びリボヌクレアーゼ活性を有する酵素のことである。また、ヒトデオキシリボヌクレアーゼPEG-DSPE＋ヒトリボヌクレアーゼPEG-DSPEの組成物は、被験者たちが呼吸器系疾患を発症しないようにすることも証明している。この呼吸器系疾患は、DNAアデノウイルス及びRNAインフルエンザウイルスの感染に起因している。RNA及びDNAの両方を分解する他の酵素の組成物が、例えば錠剤などの経口投与によるエイズ予防のために使用することができる。この組成物は、例えば(D-Ser-His-D-Asp)-PEG-DSPEなどで、PEG及び疎水性物質を結合させることにより胃腸プロテアーゼに対する耐性を有するように修飾されている。この疎水性物質とは、例えばDSPE及び／又はプロテアーゼ阻害剤などである。薬投与の別の手段は、ヌクレアーゼのエアロゾル吸入である。この手段は、上述している通り内因性プロテアーゼに対する耐性のために処方されている。

【０３１１】

（実施例２１）

（インフルエンザウイルスに感染したマウス内の修正リボヌクレアーゼAの抗ウイルス活性）

マウスの肺内の複製に適したインフルエンザウイルスA/Aichi/2/68/H3N2が、本実施例の実施形態において使用される。ウイルス力価は、5.0 log LD_{50}である。マウス（体重１５グラムから１７グラム）が、各グループ２０体ずつに分けられ、0.05 mL中10 LD_{50}のウイルスを鼻腔内投与により摂取される。感染後マウスは、2000UA/g重量のウシリボヌクレアーゼA（リボヌクレアーゼ）、リボヌクレアーゼ-PEG又はリボヌクレアーゼ-PEG-R8を腹腔内投与あるいは鼻腔内投与により治療される。感染後第１日目、第3日目、及び第5日目に、リボヌクレアーゼ調合液が投与される。そして15日間に渡ってマウスが観察される。同様の方法で、コントロールマウスにハンクス液が投与される。実施例１３で示されている通り、生存マウス及び生存マウス肺内のインフルエンザウイルス力価が、測定される。

【０３１２】

表９で示されているように、生存マウス及びマウス肺内のインフルエンザウイルス力価

が、治療効果の基準として使用される。リボヌクレアーゼPEG及びリボヌクレアーゼPEG-R8は、ウイルス力価の低下及び生存率の増加に効果的だった。これは最も効果的な薬であるリボヌクレアーゼPEG-R8を用いた場合だった。

【０３１３】

（表９）

（腹腔内経路（i.p.）又は鼻腔内経路（i.n.）で投与されたインフルエンザウイルスを接種されたマウス内の修飾ヌクレアーゼの抗ウイルス活性）

治療i.p.	生存マウス	肺の力価[log TCD_{50}]
コントロール	20/1	6.6;6.4;6.7
リボヌクレアーゼ	20/11	4.7;5.0;4.5
リボヌクレアーゼPEG	20/16	3.2;3.4;3.1
リボヌクレアーゼPEG-R8	20/20	1.8;2.0;1.9
治療i.n.		
リボヌクレアーゼ	20/13	4.5;4.0;4.3
リボヌクレアーゼPEG	20/19	3.0;3.1;3.1
リボヌクレアーゼPEG-R8	20/20	1.4;1.0;1.4

【０３１４】

（実施例２２）

（遺伝子組み換えプロテアーゼ耐性（pr）ヒトリボヌクレアーゼIに対するPEG、RNA及びR８の結合は、西ナイルウイルス（WNV）へのヌクレアーゼ抗ウイルス活性を向上させる。）

組み換えヒトリボヌクレアーゼI（RNase）、遺伝子組み換えプロテーゼ耐性を有するprリボヌクレアーゼ、prリボヌクレアーゼ-PEG、prリボヌクレアーゼ-PEG-R8及び一本鎖RNA西ナイルウイルスに対する耐性を有するprリボヌクレアーゼ-PEG-PNA-R8が研究されている。R８及びPNAはそれぞれ合成によって作られていた。R８及びPNAは、一本鎖RNA西ナイルウイルスゲノムの選択部位にあるヌクレオチド配列に対して相補的な配列を備える。そしてR8およびPNAは、実施例１で述べられているように、PEGに結合された。

【０３１５】

一本鎖RNA WNVに対する耐性のあるリボヌクレアーゼ、prリボヌクレアーゼ、PEG-prリボヌクレアーゼ、MPP-PEG-rリボヌクレアーゼ及びMPP-PEG-rリボヌクレアーゼ-PNAのウイルス活性が研究されている。アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションによりWNV及び新生ラビットの腎細胞（RKC）の単層培養地が、入手された。細胞培地は0.5ラクトアルブミン加水分解物及びハンクス培地（45%+45%）並びに10パーセントのFBSから構成されている。維持培地はFBSを含まない。リボヌクレアーゼ、prリボヌクレアーゼ、PEG-prリボヌクレアーゼ、MPP-PEG-rリボヌクレアーゼ及びPNA-prリボヌクレアーゼ-PEG-PEG-rリボヌクレアーゼ-PNAは一本鎖RNA WNVに対する耐性を有している。またこれらの抗ウイルス効果が比較されている。表1の実験データは、prリボヌクレアーゼ-PEG-PNA-R8複合体が西ナイルウイルスへの最も高い抗ウイルス活性を有していることを示している。抗ウイルス複合体の投与は、リボヌクレアーゼ活性単位（Unit of RNase Activity）において発現される。全ての値は4回の複製測定の平均値である。

【０３１６】

（表１０）

（西ナイルウイルスに耐性を有する修飾リボヌクレアーゼIの抗ウイルス効果）

リボヌクレアーゼ[UA/mL]	$logTCD_{50}$/mL
リボヌクレアーゼ[0;100;250]	[8.7;7.77.0]
prリボヌクレアーゼ[0;100;250]	[8.5;6.3;6.1]
prリボヌクレアーゼ-PEG[0;100;250]	[8.4;5.8;5.0]
prリボヌクレアーゼ-PEG-R8[0;100;250]	[8.5;4.1;3.3]
prリボヌクレアーゼ-PEG-PNA-R8[0;100;250]	[8.4;2.0;1.3]

【０３１７】

（実施例２３）

(FMDウイルスに対する耐性を有するヌクレアーゼ組成物の抗ウイルス効果)

口蹄病（FMD）は多くの国において、多数の動物の間で急速に広まっている。そして何千もの動物の死亡又は犠牲及び多大な経済的損失を引き起こしている。FMDは、一本鎖RNA（FMDV）により引き起こされる。複製の間、ウイルスゲノム一本鎖RNAは、二本鎖RNA形へと転換される。二本鎖RNAは、翻訳されウイルスタンパク質を備える。さらに二本鎖RNAは、転写され子孫ウイルス一本鎖RNAを合成する。ウイルスタンパク質及び子孫ウイルス一本鎖RNAは、FMDビリオンへと集められる。

【０３１８】

表1は、ウシリボヌクレアーゼA、溶解一本鎖RNA及びウシリボヌクレアーゼIII又はベンゾナーゼ（商標登録）の併用が、大きな抗ウイルス効果を呈することを示す。これは、二本鎖RNAを分解することを目的とする。さらにこれらの酵素の併用は、個々の酵素を別々に投与する場合と比較して、より大きな抗ウイルス効果を呈する。PEGに対する酵素の結合は、さらに併用治療の抗ウイルス効果を向上させる。

【０３１９】

（表１１）

（試験管内FMDウイルス複製におけるリボヌクレアーゼA及びリボヌクレアーゼIIIの併用治療の相乗効果）

ヌクレアーゼ[UA/mL]	滴定温度[$logTCD_{50}$/mL]
コントロール	9.3;9.0;9.0
リボヌクレアーゼ[100]	7.3;7.1;6.8
リボヌクレアーゼIII[100]	7.4;7.3;7.3
リボヌクレアーゼ[50]＋リボヌクレアーゼIII[50]	4.6;4.3;4.3

【０３２０】

（実施例２4）

（FMDウイルスに感染した家畜と接触した動物のFMD予防）

多数の動物の間で急速に広まっている口蹄病（FMD）の予防は、一般的に感染動物及び感染動物と接触した動物を隔離したり殺したりすることで達成されている。私たちは、FMDの症状を見せていない病気のラビットと接触した動物の予防的治療が、ラビットの疾病進行を効果的に予防することを明らかにしている。この予防的治療は、ウシリボヌクレアーゼA（RNase）及びリボヌクレアーゼ-PEG複合体の両方を投与することで行われる。実施例はまた、リボヌクレアーゼAの予防的効果と比較して、リボヌクレアーゼ-PEGの予防的効果を向上させることも示している。

【０３２１】

0-typeのFMDVが、アール培地内の0.5%ラクトアルブミン加水分解物で希釈される。そして0-typeのFMDVが皮下注射される（$1000LD_{50}$FMDVを皮下注射により接種した後3時間以内の500UAのヌクレアーゼA）。表12は、単回投与がテンジクネズミ内のFMDの進行を、十分に予防することを示している。ヌクレアーゼの予防的効果は、酵素の単回投与後少なくとも4時間持続する。その一方でリボヌクレアーゼ-PEGの予防的効果は、投与後約100時間持

続する。40匹のテンジクネズミが、皮下注射による500UAリボヌクレアーゼ-PEGの単回投与で前処理を施された後、FMDウイルスに感染させられる。それら40匹のテンジクネズミの内、2匹のみがFMDを進行させた。このことは、リボヌクレアーゼの単回投与後FMDを進行させるテンジクネズミが８匹いることと比較される。コントロールのグループにおいては、40匹全てが、ウイルス接種後FMDの全身症状を現す。最重要事項として、感染動物及びリボヌクレアーゼ処理動物は全て、以下の反復性感染直後のFMDに対する耐性を有する。

【０３２２】

（表１２）

（FMDウイルスに感染した動物内のリボヌクレアーゼ及びリボヌクレアーゼ-PEGの予防的効果）

ヌクレアーゼ[UA/mL]	FMDV[LD_{50}]	テンジクネズミ	生存テンジクネズミ
コントロール:リボヌクレアーゼ[0]	1000	40	3
コントロール:リボヌクレアーゼ[500]	0	40	40
リボヌクレアーゼ[500]	1000	40	32
リボヌクレアーゼ-PEG[500]	1000	40	38

【０３２３】

（実施例２５）

（多価（mc）ヒトデオキシリボヌクレアーゼIは、二本鎖DNA単純ヘルペスウイルスに対する耐性を有する増強抗ウイルス活性を試験管内で示す。）

実施例は、ヘルペスウイルスに対する耐性を有する多価組み換えヒト膵臓デオキシリボヌクレアーゼI（mcDNase）を用いた治療により、飛躍的に高い抗ウイルス活性が得られることを示している。このことは、野生型組み換えヒトデオキシリボヌクレアーゼI（DNase）を用いて得られる抗ウイルス活性と比較して、より高い抗ウイルス活性が得られることを示している。mcデオキシリボヌクレアーゼIは、好適な二本鎖DNA基質に対する加水分解活性の増大を特徴とする。さらにmcデオキシリボヌクレアーゼIは、Gアクチン、つまりデオキシリボヌクレアーゼIの強力阻害剤への結合親和性の著しい低下も特徴とする。組み換えmcデオキシリボヌクレアーゼIは、６箇所においてアミノ酸の置換物E13CR^{2+}/T14K/H44R/N74K/T205K/A114CR^{2+}を有する。さらに、組み換えmcデオキシリボヌクレアーゼIは、アミノ酸配列において８個の追加正電荷を備える。そこでは、T14、H44、N74及びT295のアミノ酸が、一価の陽性リジンと置換される。E13、A114アミノ酸は、Cys（C）残基と置換される。Cys（C）残基は、二価の陽性化学試薬2-bis（トリメチルアンモニウム）エチル・チオール（CR^{2+}）により修飾された結果生じた化学物質を含んでいる。

【０３２４】

単純ヘルペスウイルス、タイプ１(HSV-１)、5.5logTCD_{50}/0.1mLの力価及び細胞培養地HEP-２がATCCから入手された。細胞は、10パーセントの不活性化ウシ胎児血清（FBS）とともに199/イーグル培地（45%+45%）で培養される。細胞を維持するために、成長培地199が使用される。酵素の抗ウイルス活性は、ウイルス複製速度の影響により決定された。このウイルス複製速度は、酵素の異なる用量投薬により影響された。酵素は、細胞培地に加えられ、複製割合が100TCD_{50}/0.1 mLのHVS-1とともに接種される。デオキシリボヌクレアーゼ及びmcデオキシリボヌクレアーゼは10UA/mL、100UA/mL、500UA/mL及び1000UA/mLの量でそれぞれ投与される。mcデオキシリボヌクレアーゼ及びデオキシリボヌクレアーゼで前処理を施されたHEP-2細胞は、HSV-１とともに接種される。さらにHEP-２細胞は、摂氏３７度下で４８時間培養される。その後、細胞は凍結されHVS-1力価が測定されlogTCD/0.1mLとして表される。

【０３２５】

HSV-１に対する耐性を有するデオキシリボヌクレアーゼ及びmcデオキシリボヌクレアー

ゼ（+８）の抗ウイルス効果が、表１３中に示されている。データは、mcデオキシリボヌクレアーゼ及びデオキシリボヌクレアーゼが、それぞれの濃度に対して両方のHSV力価を低減させることに効果的であることを表している。さらに、mcデオキシリボヌクレアーゼは、それぞれの濃度においてデオキシリボヌクレアーゼよりも効果的であった。

【０３２６】

（表１３）

ヒトmcデオキシリボヌクレアーゼ（+８）及びヒトデオキシリボヌクレアーゼIの抗HSV-1活性

ヌクレアーゼ[UA/mL]	HSV力価[$\log TCD_{50}$/mL]	平均力価
コントロール[0]	5.5;5.6;5.7	5.6
デオキシリボヌクレアーゼ[10]	5.4;5.5;5.3	5.4
デオキシリボヌクレアーゼ[50]	5.1;5.0;5.1	5.1
デオキシリボヌクレアーゼ[100]	4.6;4.5;4.7	4.5
デオキシリボヌクレアーゼ[500]	3.8;3.9;3.7	3.8
mcデオキシリボヌクレアーゼ[10]	4.0;3.9;3.9	3.9
mcデオキシリボヌクレアーゼ[50]	3.5;3.4;3.3	3.4
mcデオキシリボヌクレアーゼ[100]	3.0;3.2;3.1	3.1
mcデオキシリボヌクレアーゼ[500]	2.7;2.8;2.9	2.8

【０３２７】

（実施例２６）

（二本鎖サイトメガロウイルスに対する耐性を有するヒトデオキシリボヌクレアーゼIの耐アクチン変異体の増強抗ウイルス活性）

野生型組み換えヒトデオキシリボヌクレアーゼ（DNase）と比較して、単一置換物Ala 114/CR^{2+}を有するヒトデオキシリボヌクレアーゼＩ（+2）（arDNase）のアクチン耐性変異体及び多価変異体（実施例２５参照）は、阻害アクチンを含む酵素の相互作用を低下させる。実施例は、二本鎖ＤＮＡサイトメガロ・ウイルス（CMV）に対する増強された抗ウイルス活性を保有することを示している。CMV（伝染力価5.5$\log TCD_{50}$/0.1mL）及び細胞培地HEP-2がATCCから入手される。細胞は、１０パーセントの不活性ウシ胎児血清（FBS）とともに199/イーグル培地（45%+45%）において培養される。細胞を維持するために、成長培地１９９が使用される。酵素の抗ウイルス活性は、ヌクレアーゼのウイルス複製速度に対する効果の程度により決定される。

【０３２８】

デオキシリボヌクレアーゼ及びarデオキシリボヌクレアーゼが細胞培地に加えられる。この細胞培地は、10UA/mL、50UA/mL、100UA/mL 及び500UA/mL量の100TCD_{50}/0.1mLのCMVを接種されている。HEP-2細胞を接種されたCMVは、デオキシリボヌクレアーゼ及びarデオキシリボヌクレアーゼを用いて処理され、摂氏37度下で48時間培養される。その後、細胞は凍結される。表１４中で示されるように、CMV力価が測定されlogTCD/0.1mLとして表される。

【０３２９】

データはデオキシリボヌクレアーゼ及びarデオキシリボヌクレアーゼの双方がCMV力価を低減させるのに有効であることを示している。使用されているそれぞれの濃度において、arデオキシリボヌクレアーゼはデオキシリボヌクレアーゼよりも有効である。

【０３３０】

（表１４）

（ヒトarデオキシリボヌクレアーゼI及びデオキシリボヌクレアーゼの抗CMV活性）

ヌクレアーゼ[UA/mL]	CMV力価[logTCD$_{50}$/mL]	平均力価
コントロール[0]	5.6;6.0;5.8	5.8
デオキシリボヌクレアーゼ[10]	5.4;5.6;5.5	5.5
デオキシリボヌクレアーゼ[50]	5.1;5.0;5.1	5.1
デオキシリボヌクレアーゼ[100]	4.6;4.5;4.7	4.5
デオキシリボヌクレアーゼ[500]	3.8;3.9;3.7	3.8
arデオキシリボヌクレアーゼ[10]	4.0;3.9;3.9	3.9
arデオキシリボヌクレアーゼ[50]	3.5;3.4;3.3	3.4
arデオキシリボヌクレアーゼ[100]	3.0;3.2;3.1	3.1
arデオキシリボヌクレアーゼ[500]	2.7;2.8;2.9	2.8

【０３３１】

（実施例２７）

（単純ヘルペスウイルスI（HSV-I）の複製におけるD-Ser-His-D-Asp-PEG-R8及びD-Ser-His-D-Aspの阻害効果）

表１５のデータは、生体外単純ヘルペスウイルスＩ（HSV-1）に対する核酸トリペプチドの抗ウイルス活性及び著しく増強された抗ウイルス活性P_3を示している。拡散トリペプチドは、非天然型Dアミノ酸D-Ser-His-D-Aspを運搬し、またP_3は、PEG及びメンブレンと共有結合している。このPEG及びメンブレンは、ペプチドR8を貫通しており、ペプチドR8とはP-PEG-R8である。

【０３３２】

（表１５）

（HSV-1の複製におけるトリペプチドP_3及びP-PEG-R8の抗ウイルス効果）

ヌクレアーゼ[UA/mL]	HSV力価[logTCD$_{50}$/mL]	平均力価
コントロール[0]	5.6;6.0;5.8	5.8
P_3[10]	5.8;5.6;5.7	5.7
P_3[50]	5.5;5.4;5.3	5.4
P_3[100]	5.2;5.3;5.1	5.1
P_3[500]	4.8;4.9;4.7	4.8
P_3-PEG-R8[10]	5.1;5.3;5.2	5.2
P_3-PEG-R8[50]	4.8;4.9;4.9	4.9
P_3-PEG-R8[100]	4.1;4.0;4.1	4.1
P_3-PEG-R8[500]	3.7;3.8;3.9	3.8

【０３３３】

（実施例２８）

（ウシリボヌクレアーゼAは一本鎖RNAコロナウイルスの複製阻害においては、二本鎖RNAレオウイルスの複製阻害においてよりも有効である。ウシリボヌクレアーゼAは、一本鎖RNAに対する優先的加水分解活性を有する。）

実施例は、ウシリボヌクレアーゼが、二本鎖RNAレオウイルスの複製を阻害するのと比較して、より有効的に一本鎖RNAコロナウイルスの複製を阻害することを示している。ウシリボヌクレアーゼAは、一本鎖RNA基質に対する優先的加水分解活性を示す。

組み換えウシリボヌクレアーゼA及び置換物A20Pを有する組み換えウシリボヌクレアーゼの派生物のプロテアーゼ（prRNase）に対する耐性を比較すると、同様の効果が観察される。リボヌクレアーゼA（200UA）は、コロナウイルスの力価を5.8logTCD/0.1mLから1.5 logTCD/0.1mLまで低減させる。一方レオウイルスの力価は、5.0TCD$_{50}$/0.1mLから4.0 TCD$_{50}$/0.1mLまで低減させる。両ウイルスは、ラクトアルブミン及び199培地から成る培地内のHEP-2細胞で培養される。ラクトアルブミン及び199培地は、同量の１０パーセントのFBSを

補給されている。１０センチメートルのプラスチックプレート内の単層HEP-2に、100TCD_{50}/0.1mLのコロナウイルス又はレオウイルスが接種される。ヌクレアーゼが、ウイルス吸着の６０分後に培地に追加される。

【０３３４】

（表１６）

（リボヌクレアーゼAの一本鎖コロナウイルスに対する抗ウイルス活性は、二本鎖RNAレオウイルスに対する活性よりも大きい。）

ヌクレアーゼ[UA/mL]/ウイルス	力価[logTCD_{50}/0.1mL]	平均力価
リボヌクレアーゼA[0]/コロナウイルス	5.6;6.3;6.0	5.8
リボヌクレアーゼA[200]/コロナウイルス	1.4;1.6;1.5	1.5
リボヌクレアーゼA[0]/レオウイルス	5.0;5.2;4.8	5.0
リボヌクレアーゼA[200]/レオウイルス	4.0;4.1;3.9	4.0

【０３３５】

（実施例２９）

（ヒトリボヌクレアーゼIIIは、一本鎖RNAコロナウイルスの複製よりも二本鎖RNAレオウイルスの複製を大幅に阻害する。）

実施例は、ヒトリボヌクレアーゼIIIが、一本鎖RNAコロナウイルスの複製よりも二本鎖レオウイルスの複製を大幅に阻害することを証明している。ヒトリボヌクレアーゼIIIは、一本鎖RNAと比較して二本鎖RNAに対する優先的加水分解活性を有する（表１７参照）。

【０３３６】

（表１７）

（リボヌクレアーゼIIIは、二本鎖RNAレオウイルスの複製を効果的に阻害するが、一本鎖RNAコロナウイルスの複製は阻害しない。）

ヌクレアーゼ[UA/mL]/ウイルス	力価[logTCD_{50}/0.1mL]	平均力価
リボヌクレアーゼIII[0]/コロナウイルス	5.6;6.3;6.0	5.83
リボヌクレアーゼIII[200]/コロナウイルス	4.5;4.7;4.6	4.5
リボヌクレアーゼIII[0]/レオウイルス	5.0;5.1;4.8	4.9
リボヌクレアーゼIII[200]/レオウイルス	2.5;2.6;2.4	2.5

【０３３７】

（実施例３０）

（二本鎖RNAに対するヒトリボヌクレアーゼI及びヒトリボヌクレアーゼIIIの相乗抗ウイルス活性）

二本鎖RNAウイルス（例えばレオウイルスナなど）が複製する間、ウイルスゲノム二本鎖RNAは保護されない状態であり、リボヌクレアーゼIIIにより分解されやすい。さらにリボヌクレアーゼAにより分解されやすい中間体一本鎖RNAが、合成される。

【０３３８】

実施例は、ヒトリボヌクレアーゼIIIとヒトリボヌクレアーゼIとの混合を有する治療的化合物の投与が、等量の酵素的ユニット（UA/mL）活性を別々にこれらの酵素を投与する場合と比較して、二本鎖RNAの複製に対してさらに強い抗ウイルス性をもたらすことを示している（表１８参照）。本実施例で使用されるレオウイルスの原料調製物は、5.5logCPD_{50}/0.1mL力価である。ウイルスは、ラクトアルブミンから成る培地内のHEP-2細胞中で培養される。ラクトアルブミンからなる培地とは、つまり１０パーセントのFBSを補給された等量の１９９培地である。１０センチメートルのプラスチック皿内の単層HEP-2に、100CPD_{50}/0.1mLのレオウイルスが接種される。ウイルス吸着の６０分後に、ヌクレアーゼが、培地に加えられる。

【０３３９】

（表１８）
（二本鎖RNAレオウイルスに対する、ヒトリボヌクレアーゼIおよびヒトリボヌクレアーゼIIIの化合物の相乗抗ウイルス活性）

ヌクレアーゼ[UA/mL]/ウイルス	力価[$logTCD_{50}$/0.1mL]	平均力価
コントロール[0]	5.6;6.3;6.0	5.8
リボヌクレアーゼI[200]	3.9;4.0;4.1	4.0
リボヌクレアーゼIII[200]	2.6;2.7;2.8	2.7
リボヌクレアーゼI[100]+ リボヌクレアーゼIII[100]	1.7;1.9;1.7	1.8

【０３４０】
（実施例３１）
（ヒトヌクレアーゼI（iprリボヌクレアーゼ）のRI耐性変異体及びプロテアーゼ耐性変異体は、野生型リボヌクレアーゼIよりも一本鎖RNAコロナウイルスに対して活性を有する。）
実施例は、野生型（wt）ヒトリボヌクレアーゼIの変異体と比較して、ヒトリボヌクレアーゼIの遺伝子組み換えRI耐性変異体及びプロテアーゼ耐性変異体が、一本鎖RNAコロナウイルスに対する耐性を有する高い抗ウイルス活性を顕著に発揮することを表している。（表１９参照）。遺伝子組み換えRI耐性変異体及びプロテアーゼ耐性変異体は、ヒトリボヌクレアーゼI内にあり、アミノ酸置換物Q11A/A20P/N71A/E111Aを有する。実験の条件は、前回の実施例において述べたとおりである。
【０３４１】
（表１９）
（組み換えRI耐性iprリボヌクレアーゼA及び組み換えプロテアーゼ耐性iprリボヌクレアーゼAは、野生型（wt）リボヌクレアーゼAよりも、一本鎖RNAコロナウイルスの複製を効果的に阻害する。）

ヌクレアーゼ[UA/mL]	力価[$logTCD_{50}$/0.1mL]	平均力価
コントロール[0]	5.6;6.3;6.0	5.8
リボヌクレアーゼI[200]	3.9;4.0;4.1	4.0
iprリボヌクレアーゼI(200)	1.9;2.0;2.1	1.9

【０３４２】
（実施例３２）
（ベンゾナーゼ、すなわちDNA及びRNAに対する加水分解活性を供うヌクレアーゼは、一本鎖DNAウイルス、二本鎖DNAウイルス、一本鎖RNAウイルス及び二本鎖RNAウイルスの複製を阻害する。）
実施例は、細菌性ヌクレアーゼベンゾナーゼ（商標登録）が二本鎖DNAワクシニアウイルスの複製、一本鎖DNAパラボウイルスの複製、二本鎖RNAレオウイルスの複製及び一本鎖RNAコロナウイルスの複製を阻害することを示している。ベンゾナーゼは、一本鎖DNA、一本鎖RNA、二本鎖DNA及び二本鎖RNAのそれぞれの基質に対して高い加水分解活性を有する（表２０参照）。細胞培養実験の条件は、前の実施例で述べたとおりである。
【０３４３】
（表２０）
（ベンゾナーゼは一本鎖DNAウイルスの複製、一本鎖RNAウイルスの複製、二本鎖DNAウイルスの複製及び二本鎖RNAウイルスの複製を阻害する。）

ベンゾナーゼ[μg/mL]/ウイルス	平均力価[$logTCD_{50}$/0.1mL]
[0;10;25]/二本鎖DNA-ワクシニアウイルス	5.6;4.6;3.7
[0;10;25]/一本鎖DNA-パラボウイルス	4.8;4.0;2.9
[0;10;25]/二本鎖DNA-レオウイルス	6.8;5.9;4.2
[0;10;25]/一本鎖RNA-コロナウイルス	6.2;4.5;3.8

【０３４４】

（実施例３３）

（iprリボヌクレアーゼPEG-R8は一本鎖RNAに対してiprヌクレアーゼよりも高い抗ウイルス活性を示す）

ヒトリボヌクレアーゼI（riprリボヌクレアーゼ）の遺伝子組み換えRI耐性変異体及び遺伝子組み換えプロテアーゼ耐性変異体は、置換物Q11A/A20P/N71A/E111Aを有しており、PEG－R8と共有結合している。この遺伝子組み換えRI耐性変異体及び遺伝子組み換えプロテアーゼ耐性変異体は、野生型リボヌクレアーゼIよりも一本鎖RNAコロナウイルスに対して強い抗ウイルス活性を発揮する。RiprリボヌクレアーゼIのN末端アミンへの2x10kDa CHO-PEG-R8の結合は、実施例１で述べられた手順のとおりpH 5.0で行われる。修飾iprリボヌクレアーゼ（25mg）が、蒸留水内で溶解される。さらに、この溶解された修飾iprリボヌクレアーゼを、10mLの塩化カルシウム中のセファデックスG-25カラム（1.6x14.0cm）にアプライする。2.0mLから2.2mLの留分を採取さし、280nmにおける光学濃度を計測する。280nmにおいて高い光学濃度を有する留分が混合される。この溶液は、約6.5mg/mLのタンパク質濃度を有する。0.25Mリン酸カリウムバッファ（PPB）136.8ml、蒸留水0.6mL中のプロテアーゼ阻害剤PMSF（0.8mg/mL）pH8.0及び127.4mLの混合液が、ゲルろ過されることにより精製され、iprリボヌクレアーゼI（1.4 mLの10 mM $CaCl_2$中に8mg）に加えられる（最終量2mL）。

【０３４５】

懸濁液が、遠心分離機にかけられ浄化される。上清が、セファデックスG-75カラム（1.6 X 3.0 cm）にアプライされる。その後、生成物が、5mMの塩化カルシウム（留分2.0mLから2.4mL）とともに溶離される。タンパク質含有量が、280nmにおける波長を測定することによって決定され、生成物は４℃で貯蔵される。

【０３４６】

上述のようにペグ化されたリボヌクレアーゼI（5-15mg）のアリコートは、1.5mLのリン酸バッファpH7.5内で希釈される。さらにアセトン（0.3mg/mL）中の蛍光（＊）0.5mLが追加される。そして混合液の蛍光量が、475nmの励起波長を使用して計測される。蛍光量とタンパク質との関係を示すグラフが作成される。そして傾斜角度が比較される。この比較は、タンパク質内の第一級アミノ基量に比例する角度の正接を用いて行われる。ローダミン標識iprリボヌクレアーゼIペグ化割合が、フルオレスカミンにより計測される。この計測は、一つの2x10kda PEGがiprリボヌクレアーゼIと結合することを示している。標識ipr＊リボヌクレアーゼ-PEG-R8（＊は蛍光を示す）は、一本鎖RNAコロナウイルスに対する抗ウイルス効果を発揮する。この抗ウイルス効果は、ipr＊リボヌクレアーゼI及び＊リボヌクレアーゼIが発揮する抗ウイルス効果より強力である（表２１参照）。

【０３４７】

（表２１）

（一本鎖RNAコロナウイルスに対するヒトiprリボヌクレアーゼI-PEG-R8の増強抗ウイルス活性とiprリボヌクレアーゼI及びリボヌクレアーゼIとの比較）

ヌクレアーゼ[UA/ｍL]	細胞取り込み[OD_{430}nm]	平均力価
コントロール[0]	0	6.4
＊リボヌクレアーゼI	110	5.4
irp＊リボヌクレアーゼ＊I	130	3.4
Irp＊リボヌクレアーゼI-PEG-R8	230	1.8

＊は蛍光ラベルを示す。

【０３４８】

（実施例３４）

（修飾抗ウイルス性ヌクレアーゼによる植物の抗ウイルス治療）

農業において、ウイルス感染は多大な経済的損失を引き起こす原因となる。多くの既知の植物ウイルスはRNAゲノムを有する。リボヌクレアーゼAのようなヌクレアーゼ及びリボヌクレアーゼIIIのようなヌクレアーゼは、それぞれ一本鎖RNA及び二本鎖RNAに対して優先的加水分解活性を発揮する。そしてベンゾナーゼなどの非特異性ヌクレアーゼは、RNA及びDNAの双方を分解する。本明細書中で記載しているように、ヌクレアーゼは、化学修飾され且つ遺伝子操作されることにより、組成物が得られる。この組成物は、増強された加水分解特性と内因性のプロテアーゼ及びヌクレアーゼ阻害剤からの保護作用を有する。

【０３４９】

実施例は、ベンゾナーゼ（BNase）によるジャガイモ頂端分裂組織の治療が、ウイルスに感染していないジャガイモの収穫高を増大させることを示している。PEG及びR8がベンゾナーゼと結合し、ベンゾナーゼ-PEG-R8複合体が得られる。このベンゾナーゼ-PEG-R8複合体は、多くの植物ウイルスに対する増強された抗ウイルス活性を発揮する。植物ウイルスに感染したジャガイモへのベンゾナーゼ-PEG-R8の投与は、ウイルスのないジャガイモの収穫をもたらす。ムラシゲ・スクーグ培地（MSM）の乾燥成分が、蒸留水90mL内で溶解され、高圧蒸気殺菌法により滅菌される。ムラシゲ・スクーグ培地（MSM）は、100mLの培地を準備することが必要である。ベンゾナーゼが、100,000 Kunitzユニット/10 mLの培地に追加される。有効量内の無菌性凍結乾燥ベンゾナーゼが、滅菌蒸留水10mL中で溶解される。培地が摂氏４５度まで冷却されると、ベンゾナーゼ溶液（10mL）が加えられた。２０パーセントの無菌硫酸マグネシウム溶液0.5mLが、100ｍLの栄養培地に加えられる。ポリエチレングリコール（mPEG-NHS,MW 10 kDa）及びK-R８が、実施例１で述べた手順に従ってベンゾナーゼと共有結合する。

【０３５０】

（表１２）

（野生型ベンゾナーゼ及び修飾ベンゾナーゼによるジャガイモ頂端分裂組織の治療は、ウイルスに感染していないジャガイモ数を増加させる）

ヌクレアーゼ治療	感染植物[No]	再生植物[No]	ウイルスに感染していない植物[No]
コントロール	50	6	1
ベンゾナーゼ	50	15	9
ベンゾナーゼ-PEG	50	28	18
ベンゾナーゼ-PEG-R8	50	39	32

【０３５１】

（実施例３５）

（修飾抗ウイルス性ヌクレアーゼによる家畜のウイルス疾病治療）

多数のDNAウイルス及びRNAウイルスが、家畜の中で疾病を引き起こしている。多大な経済的損失は、ウシ・アデノウイルス、豚インフルエンザウイルス、ウシ・ヘルペス・ウイルス、豚ポックスウイルス、ウシ伝染性鼻器官炎などのウイルス性疾病に起因する。今日、これらの疾病の治療あるいは予防に対する薬はない。本発明者は、細胞培地内の家畜ウイ

ルスに対するポリマーに修飾されたデオキシリボヌクレアーゼのようなヌクレアーゼ及びリボヌクレアーゼのようなヌクレアーゼが、潜在的抗ウイルス効果を示すデータを得た。

【０３５２】

（実施例３６）

（修飾ヌクレアーゼの投与は、ＤＮＡ家禽ウイルスの複製及びＲＮＡ家禽ウイルスの複製を阻害し、家禽のウイルス疾病を予防し且つ治療する。）

鳥インフルエンザＡ、鳥アデノウイルス、家禽ジフテリア及びその他の家禽ウイルスなどのＲＮＡ鳥ウイルス及びＤＮＡ鳥ウイルスは、伝染性の高いウイルス疾病に関連している。このウイルス疾病は、有効な予防法及び治療法のない伝染性疾病を引き起こす。本発明によるデオキシリボヌクレアーゼのような野生型ヌクレアーゼ及び修飾ヌクレアーゼ並びにリボヌクレアーゼのような野生型ヌクレアーゼ及び修飾ヌクレアーゼは、ニワトリ、七面鳥及びその他の鳥のウイルス治療に投与される。本発明によるヌクレアーゼは、ベンゾナーゼ、Ser-His及びSer-His-Aspなどのオリゴペプチド及びヌクレオチド特性を備える遷移金属化合物などの科学的ヌクレアーゼを含む。20羽のニワトリを1グループにする。このニワトリを、生理食塩水で溶解したジペプチドD-Ser-His又はトリペプチドD-Ser-His-FD-Aspのエアロゾルで処理する。この処理は3日間、1日に2度行われる。一方でコントロールニワトリは、生理食塩水で処理される。全てのニワトリが鳥アデノウイルスに感染する。全てのコントロールニワトリは、気管支炎を発症して死ぬ。一方で、D-Ser-His及びD-Ser-His-D-Aspで処理した20羽のうち生存ニワトリは、それぞれ18羽及び19羽である。

【０３５３】

（実施例３７）

（ミツバチウイルス性麻痺の伝染を引き起こすウイルスからミツバチを保護するための修飾ヌクレアーゼの投与）

経済的観点から重要である多数の昆虫には、たとえばミツバチ、カイコ及び生物農薬として生育されている昆虫がある。これらの昆虫が、昆虫ウイルスに起因する伝染病により死んでいる。これらの伝染病に対する保護方法は、現在存在しない。本発明者は、修飾ヌクレアーゼの保護作用が、ミツバチ飼育場において圧倒的な影響をもたらすことを示すデータを得た。修飾ヌクレアーゼは、ミツバチ麻痺ウイルス（ＨＰＶ）に起因する疾病に対する保護作用を有する。ＨＢＶＰは一本鎖ＲＮＡ含有性ウイルスである（Bailey, J. Inverteb. Pathol. 7:132-135 1965）。それゆえ、リボヌクレアーゼ活性を有するヌクレアーゼの投与は、致死性の疾病を引き起こすＨＢＶＰからミツバチを保護する働きをする。野生型ベンゾナーゼ及び修飾ベンゾナーゼ並びにウシリボヌクレアーゼＡのＨＢＶＰウイルス性麻痺に対する保護作用が、示されている。

【０３５４】

ＨＢＶＰの感染力価は10^{-8} per mLである。ミツバチはウイルス性感光乳剤を飼料とすることで感染する。ミツバチは、ウイルス接種３時間前に生理溶液で希釈された酵素のエアロゾルを吹き付けられる。表２３は、呼吸孔を通して酵素が体液及び細胞に浸透することを示している。ウイルス接種6時間後の処置は、ミツバチの疾病進行を依然として防いだ。

【０３５５】

（表２３）

（ウイルス性麻痺からミツバチを保護するベンゾナーゼ、リボヌクレアーゼＡ、ベンゾナーゼ-PEG及びリボヌクレアーゼＡ-PEGを用いた処理）

ヌクレアーゼ[UA/mL]	感染ミツバチ	生存ミツバチ
コントロール[0]	100	[0]
リボヌクレアーゼA[200,500,1000,1500]	100	[4,11,67,100]
リボヌクレアーゼA-PEG[200,500,1000,1500]	100	[28,46,100,100]
ベンゾナーゼ[200,500,1000,1500]	100	[12,21,72,100]
ベンゾナーゼ-PEG [200,500,1000,1500]	100	[32,78,100,100]

【０３５６】
（実施例３８）
（野生型ベンゾナーゼ又は修飾ベンゾナーゼを用いたカイコの処理は、カイコのウイルス性核多角体病の進行を防ぐ。）
核多角体病は、農業分野に破壊的な影響をもたらすウイルス性疾病である。放射線療法と同様に耐性に従って選択的にヌクレアーゼを使用することは、この疾病に対するこれらの保護法は効果がないという観点から汎用されていない。ベンゾナーゼ（BNase）500UA/mLのカイコへの噴射は、本明細書中では、無毒で且つ核多角体病の進行からカイコを保護すると考えられる。ベンゾナーゼ-PEG複合体は、野生型ベンゾナーゼと比較して、増強された抗ウイルス効果を発揮する（表２４参照）。
【０３５７】
（表２４）
（ベンゾナーゼ及びベンゾナーゼ-PEGを用いた感染性ウイルス性多角体病からのカイコの保護）

ヌクレアーゼ[UA/mL]	感染カイコ	生存カイコ
コントロール[0,0,0]	50	[7,7,8]
ベンゾナーゼA[500,500,500]	50	[25,28,27]
ベンゾナーゼA-PEG[500,500,500]	50	[45,46,48]

【０３５８】
（実施例３９）
（デオキシリボヌクレアーゼは、白血病ウイルスに感染したＡＫＲマウス内で促進されるリンパ性白血病の進行を阻害する。）
ＡＫＲマウス内の白血病は、白血病ウイルスを保有するマウスによって促進されることは周知である。月齢６～８ヶ月のＡＫＲマウスのリンパ系組織は、マウス白血病ウイルスを有する。さらにこのＡＫＲマウスのリンパ系組織は、白血病を自然に進行させる。体重１グラムあたり5,000KuUのウシデオキシリボヌクレアーゼＩ及びウシＴデオキシリボヌクレアーゼのＡＫＲマウスs.c.への投与は、白血病の進行を防ぐと考えられる。この投与は、隔日1ヶ月間行われる。
【０３５９】
デオキシリボヌクレアーゼ及びＴデオキシリボヌクレアーゼの処理効果を研究するために、リンパ性白血病の兆候のある月齢9～１０ヶ月のＡＫＲマウスにおいて実験が行われる。リンパ節、胸腺、肝臓及び脾臓の大きさの顕著な増大及びリンパ系組織における高い分裂指数が、これらのマウス内で観察される。処理グループは、それぞれ２４匹のマウスを有し、一方でコントロールグループは、１９匹のマウスを有する。5,000KuU/g重量のデオキシリボヌクレアーゼI及びTデオキシリボヌクレアーゼを、４日ごとs.c.に投与する。この投与は、リンパ系組織及び分裂指数を正常値まで減少させ、さらにはマウスの寿命を

伸ばす結果となる。しかしながら、表２５で示されるように、マウスにおいては、デオキシリボヌクレアーゼ投与よりTデオキシリボヌクレアーゼ投与のほうが、より高い効果が得られる。またTデオキシリボヌクレアーゼ投与よりTデオキシリボヌクレアーゼ-PEG投与のほうが、より高い効果が得られる。

【０３６０】

（表２５）

（AKRマウスにおけるウイルス性リンパ性白血病に関してのデオキシリボヌクレアーゼ及びTデオキシリボヌクレアーゼの抗ウイルス活性）

ヌクレアーゼ	肝臓（g）	分裂指数	寿命（週）
コントロール[0]	2370±68	0.92±0.07	4±1.3
デオキシリボヌクレアーゼ[5kUA/g]	941±33	0.18±0.02	16±1.0
Tデオキシリボヌクレアーゼ[5kUA/g]	670±23	0.14±0.01	21±1.2
デオキシリボヌクレアーゼPEG[5kUA/g]	643±21	0.12±0.01	23±1.2
TデオキシリボヌクレアーゼPEG[5kUA/g]	500±18	0.08±0.01	26±1.2

【０３６１】

（実施例４０）

（一本鎖RNA馬脳炎ウイルスにおけるリボヌクレアーゼA治療及びデオキシリボヌクレアーゼ治療の併用）

実施例は、一本鎖RNA馬脳炎ウイルス治療におけるリボヌクレアーゼ及びデオキシリボヌクレアーゼの併用による増強効果を示している。併用治療の効果をさらに増大させるために、酵素がペグ化され、リボヌクレアーゼ-PEG及びデオキシリボヌクレアーゼ-PEGが適用される。相補的ウイルス性一本鎖DNA生成物には、内因性逆転写酵素が関与する。内因性逆転写酵素は、RNAウイルスに感染した細胞内にある。RNAウイルスとはたとえば、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV; Klenerman, et al., Letters to Nature, 390: 298-301, 1997）、ポリオ及び麻疹ウイルスである（Zhdanov, Nature 256: 471-473, 1975）。いかなる具体的な理論及び作用により限定されることなく、内因性RTは、他の感染ウイルスから生じるRNAを逆転写することができる（Zhdanov, Nature 256: 471-473, 1975）。RTの発生源は、内因性レトロウイルス又は別の散在物質となり得る（Wiener et al., A. Rev. Biochem. 55, 631-661, 1986）。そのような内因性発生源から生じる逆転写物は、哺乳類ゲノムの１０～２０パーセントを占めることになる（Coffin, in Reverse Transcriptase, pp.445-479, 1993, Eds. Skalka and Gough, Cold Spring Harbor Lab Press, NY）。内因性トリ白血病ウイルス（ALV-E）及び内因性トリウイルス（EAV）の存在に起因する低水準RT活性が同様に、トリ胎児線維芽細胞基質内で検知された。このトリ胎児線維芽細胞基質は、麻疹ワクチン、流行性耳下腺炎ワクチン及び黄熱病ワクチンの生成に使用される（Hussain et al., Journal of Virology, January 77 (2): 1105-1111, 2003; Johnson and Heneine, J. Virol. 75 (8): 3605-3612, 2001）。

【０３６２】

デオキシリボヌクレアーゼIとリボヌクレアーゼAとの併用による一本鎖RNAウイルスに対する耐性を有するリボヌクレアーゼAの抗ウイルス効果の増強が、本明細書中で示されている。意外なことだが、デオキシリボヌクレアーゼIとリボヌクレアーゼAとの併用治療は、馬脳炎ウイルスの複製において同時阻害効果を生む（表２６参照）。これらの併用は、他のRNAウイルスと関連している可能性がある。デオキシリボヌクレアーゼのような酵素及びリボヌクレアーゼのような酵素の双方を用いた併用投与治療は、他のRNAウイルスへの治療、RNAウイルスとRNA RTウイルスの重感染の治療及びRNAウイルスとDNA RTウイルスの重感染の治療に関する可能性を有する。

【０３６３】

（表２６）

（一本鎖馬脳炎ウイルスの治療に対するデオキシリボヌクレアーゼ及びリボヌクレアー

ゼの併用治療による同時阻害効果）

ヌクレアーゼ[UA/mL]	力価[$\log TCD_{50}$/0.1mL]	平均力価
コントロール[0]	7.0;7.3;7.1	7.1
リボヌクレアーゼA[500]	5.2;5.2;5.4	5.26
デオキシリボヌクレアーゼI[500]	6.5;6.2;6.6	6.56
リボヌクレアーゼ+	4.8;4.3;4.6	4.5
デオキシリボヌクレアーゼ[500]		
リボヌクレアーゼ-PEG[500]	4.1;4.2;4.3	4.2
デオキシリボヌクレアーゼ-PEG[500]	4.8;5.2;5.3	5.1
リボヌクレアーゼ-PEG[250]+	2.8;3.1;3.0	2.9
デオキシリボヌクレアーゼ-PEG[250]		

【配列表】

2007532666000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/12532

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC: **C12N 9/22**(2006.01);**A61K 38/46**(2006.01)
C07H 21/04(2006.01)

USPC: 435/199;424/94.6;536/23.4
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 435/199;424/94.6;536/23.4

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)
EAST, STN dbs: medline, scisearch, caplus, japio, embase

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 5,989,886 A (BOEKE et al.) 23 November 1999, (23.11.1999) see entire document.	90, 92,98-101 ---------- 91,93-97102-105
Y	NOREN et al.,A General Method for Site-specific Incorporation of Unnatural Amino Acids into Proteins, Science, 1989, Vol 244, pages 182-188.	1-44

☐ 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 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
10 August 2006 (10.08.2006)

Date of mailing of the international search report
18 SEP 2006

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (571) 273-3201

Authorized officer
Richard G. Hutson
Telephone No. 571-272-1600

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/12532

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: Group I, claims 1-44 and 89; Group IV, claims 48, 50-52, 54-55, 57, 61-70 and Group V, claims 90-105

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

International application No.
PCT/US05/12532

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

Group I, claim(s) 1-44, 89, drawn to an antiviral composition comprising a modified nuclease with a non-naturally occurring amino acid.

Group II, claim(s) 45, 49, 50, 51, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64-70, 73-88, 89, drawn to an antiviral composition represented by formula Nuc-(Tb)r.

Group III, claim(s) 46, 47, 58, 59, 60, 71, 72, drawn to an antiviral composition represented by formula Nuc-H.

Group IV, claim(s) 48, 50, 51, 52, 54, 55, 57, 61, 62, 63, 64-70, drawn to antiviral composition represented by formula (Nuca)q-Pn-H.

Group V, claim(s) 90-105, drawn to a method of preventing or treating a viral disease with a nuclease.

The inventions listed as Groups I thru V do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: Each of the groups I thru IV are drawn to structurally different antiviral compositions which do not share a special technical feature and group V is drawn to a method of treatment of a viral disease comprising a nuclease. Further Ambion Inc., Cat. No. 2239 teach Turbo DNase , a genetically modified recombinant DNase and methods of its use which anticipates the method claims of group V and destroying any unity.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		テーマコード（参考）
C12N	*9/50*	*(2006.01)*	C12N	9/50	
C12N	*9/22*	*(2006.01)*	C12N	9/22	
C07K	*5/083*	*(2006.01)*	C07K	5/083	
C07K	*5/062*	*(2006.01)*	C07K	5/062	
C07K	*5/097*	*(2006.01)*	C07K	5/097	
C07K	*7/06*	*(2006.01)*	C07K	7/06	
C07K	*14/00*	*(2006.01)*	C07K	14/00	
C07K	*5/078*	*(2006.01)*	C07K	5/078	
C12N	*15/09*	*(2006.01)*	C12N	15/00	A

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

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA11 BA14 CA06 HA01
4B050 CC02 CC04 CC07 DD11 GG03 GG06 LL01
4C084 AA02 BA44 CA04 CA13 CA17 CA43 CA49 DC22 NA14 ZB331
4H045 AA10 AA30 BA42 BA54 BA57 CA40 DA50 DA89 EA29 FA50
FA74