

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3621995号  
(P3621995)

(45) 発行日 平成17年2月23日(2005.2.23)

(24) 登録日 平成16年12月3日(2004.12.3)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I
C 1 2 Q 1/48	C 1 2 Q 1/48 Z
C 1 2 Q 1/70	C 1 2 Q 1/70
// C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 9 (全 22 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平7-530428</p> <p>(86) (22) 出願日 平成7年5月17日(1995.5.17)</p> <p>(65) 公表番号 特表平10-500574</p> <p>(43) 公表日 平成10年1月20日(1998.1.20)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/US1995/006292</p> <p>(87) 国際公開番号 W01995/032309</p> <p>(87) 国際公開日 平成7年11月30日(1995.11.30)</p> <p>    審査請求日 平成14年5月16日(2002.5.16)</p> <p>(31) 優先権主張番号 246,643</p> <p>(32) 優先日 平成6年5月20日(1994.5.20)</p> <p>(33) 優先権主張国 米国(US)</p>	<p>(73) 特許権者 マウント シナイ スクール オブ メデ ィシン オブ ニューヨーク ユニバーシ ティー アメリカ合衆国 10029 ニューヨー ク州 ニューヨーク, ガステイヴ レビー プレイス 1番地</p> <p>(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔</p> <p>(74) 代理人 弁理士 石井 貞次</p> <p>(74) 代理人 弁理士 早川 康</p>
---	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 赤血球凝集素のアシル化/パルミチル化を抑制する抗ウイルス剤を用いるインフルエンザウイルス感染の治療

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

インフルエンザウイルス赤血球凝集素のシステイン残基のパルミチル化を抑制することによって、ウイルス生活環の後期を阻害しかつ感染性ウイルスの生産を抑制する潜在的抗ウイルス性化合物を同定するためのアッセイであって、

(a) 細胞質尾部から2番目の位置にシステイン残基が存在することを特徴とする赤血球凝集素遺伝子産物を有するインフルエンザウイルスに感染した細胞を提供し、

(b) このインフルエンザウイルス感染細胞にパルミテートと被験物質を添加し、

(c) パルミテートが該感染細胞から回収されたインフルエンザ赤血球凝集素に取り込まれるか否かを検出する、

ことを含んでなり、その際、被験物質のパルミチル化抑制能が、被験物質の不在下で該赤血球凝集素に取り込まれたパルミテートの量と比較して、該赤血球凝集素へのパルミテートの取り込みが低下していることによって示される、上記アッセイ。

【請求項2】

パルミテートがシグナル発生化合物により標識されている、請求項1に記載のアッセイ。

【請求項3】

シグナル発生化合物が放射性標識、蛍光体、酵素または比色シグナル発生化合物である、請求項2に記載のアッセイ。

【請求項4】

インフルエンザウイルスの赤血球凝集素基質を前記細胞から回収して、固相表面に固定す

る、請求項 1 に記載のアッセイ。

【請求項 5】

インフルエンザウイルスの赤血球凝集素基質を、赤血球凝集素に特異的な固定化抗体により捕捉する、請求項 4 に記載のアッセイ。

【請求項 6】

赤血球凝集素が細胞質ドメインに下記のアミノ酸配列：

XGX<sup>1</sup>X<sup>2</sup>X<sup>3</sup>X<sup>4</sup>X<sup>5</sup>X<sup>6</sup>CI

〔式中、X（存在するとき）= N；

X<sup>1</sup> = S または N；

X<sup>2</sup> = L、I、M、C または Y；

X<sup>3</sup> = Q または R；

X<sup>4</sup> = C または F；

X<sup>5</sup> = R、Q、T、M または N；および

X<sup>6</sup> = I、F または Y である；

ただし、上記アミノ酸配列は一文字表記により示される〕

を有する、請求項 1 に記載のアッセイ。

【請求項 7】

被験物質が細胞の脂肪酸合成を有意に阻害しない、請求項 1 または 6 に記載のアッセイ。

【請求項 8】

赤血球凝集素のパルミチル化の抑制に必要とされる被験物質の量が前記細胞に対して毒性ではない、請求項 1 または 6 に記載のアッセイ。

【請求項 9】

赤血球凝集素のパルミチル化量を低下させることが示された被験物質を、

( a ) インフルエンザウイルス感染細胞に該被験物質を接触させ、

( b ) ウイルス力価が該被験物質の不在下でよりも存在下で減少するか否かを調べる、  
 ことによってさらにアッセイする、請求項 1 または 6 に記載のアッセイ。

【発明の詳細な説明】

1. 導入

本発明は、インフルエンザウイルス赤血球凝集素 ( HA ) のパルミチル化を阻止し、感染性ウイルスの生産を抑制する化合物を同定するためのアッセイに関する。また、本発明は、

2. 発明の背景

インフルエンザウイルスの赤血球凝集素 ( HA ) は主要表面抗原であり、最もよく特性付けされた膜糖タンパク質のひとつである。それは、レセプター結合および融合活性を有するが、これらの活性は両方ともウイルス感染の開始に必要なものである。このタンパク質は、レセプターおよび融合活性を持つ大きな外部ドメイン ( ectodomain )、経膜ドメイン ( transmembrane domain ) を構成するひと続きの疎水性アミノ酸、および短い細胞質尾部 ( cytoplasmic tail ) を含む。この細胞質尾部は、HA のサブタイプ ( Ward, 1981, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 94/95:1 - 74; Fig. 1 ) によって決まる、10 - 11 個のアミノ酸を含む。この領域の HA 配列を比較することにより、5 個のアミノ酸がよく保存されており、それらは 14 の公知のサブタイプのうちの 11 で同一であることがわかっている ( Doyle et al., 1985, J. Cell Biol. 100:704 - 714; Kawaoka et al., 1990, Virology 179:759 - 767; Nobusawa et al., 1991, Virology 182:475 - 485; Simpson & Lamb, 1992, J. Virol. 66:790 - 803 )。これらの保存された残基のうち 2 個はシステインである ( 560 位および 563 位 ) であり、三番目のよく保存されたシステインは膜固定ドメイン ( 553 位 ) に位置する ( Fig. 1 )。サブタイプ H2、H3 および H7 の HA の保存されたシステインはパルミチン酸の共有付加により翻訳後修飾されていることが以前から示されている ( Naeve & Williams, 1990, EMBO J. 9:3857 - 3866; Naim et al., 1992, J. Virol. 66:7585 - 7588; Schmidt & Lambrecht, 1985, J. Gen. Virol. 66:2635 - 2647; Steinhauer et al., 1991, Virology 184:445 - 448 )。パルミチル化のレベ

10

20

30

40

50

ルは、17個のカルボキシ末端アミノ酸がA/WSN/33HA (H1) のそれと同一であるA/Japan/305/57HA (H2) について定量されている。560位および563位のシステイン (Fig.1) は高度に修飾されており、563位は脂肪酸ラベルの少なくとも半分を取り込んでいるように思われるが、553位は全パルミテートのわずか10%位しか取り込んでいない (Naim et al., 1992, J. Virol. 66:7585 - 7588)。

ウイルスタンパク質のパルミチル化の程度と重要性はまだ十分に理解されてはいない (McIlhinney, 1990, TIPS 15:387 - 391を検討されたい)。HeLa細胞はインフルエンザウイルスの増殖に不応性であるという事実は、このセルラインのパルミチル化の欠損が原因であるとされてきたが、HeLa細胞における感染の不成功を招く他のメカニズムを排除することはできない (Portincasa et al., 1992, Res. Virol. 143:401 - 406)。ヒドロキシルアミンを用いてウイルスタンパク質から脂肪を除く実験により、その脂肪酸部分が膜融合に重要であることが示唆されている (Schmidt & Lambrecht, 1985, J. Gen. Virol. 66:2635 - 2647)。他の報告では、アシル化を抑制するために抗生物質であるセルレニン (cerulenin) が使用され、ウイルス放出における脂質が暗示された (Schlesinger & Malfer, 1982, J. Biol. Chem. 257:9887 - 9890)。しかしながら、ヒドロキシルアミンはタンパク質構造に影響を与えるかもしれず、また、セルレニンは一般に毒性作用を及ぼすことが知られているので、これらの解釈は信頼のおけるものではない。水泡性口内炎ウイルス (VSV) については、そのGタンパク質におけるパルミチル化部位を除いても、膜融合やビリオンへの糖タンパク質の取り込みに何の影響もないことが報告されている (Whitt et al., 1989, J. Virol. 63:3569 - 3578)。アルファウイルスに関する研究により、糖タンパク質E2のカルボキシ末端における2か所のパルミチル化部位のいずれか1か所を除去すると、ウイルス出芽の効率が低下すること (Ivanova & Schlesinger, 1993, J. Virol. 67:2546 - 2551)、および両方のパルミテート付加部位に変化を有する変異体は生存できないこと (Gaedigk - Nitschko & Schlesinger, 1991, Virology 183:206 - 241) が示されている。

A/Japan/305/57HA (H2) は膜融合にパルミテートを必要とすることを示唆する一つの論文がある (Naeve & Williams, 1990, EMBO J. 9:3857 - 3866)。しかしながら、この知見は、H2、H3またはH7サブタイプのHAのいずれかをを用いた他の研究者による支持を受けていない (Naim et al., 1992, J. Virol. 66:7585 - 7588; Simpson & Lamb, 1992, J. Virol. 66:790 - 803; Steinhauer et al., 1991, Virology 184:445 - 448; Veit et al., 1991, J. Virol. 65:2491 - 2500)。組換えプラスミドDNAまたはSV40ベクター (Doyle et al., 1985, J. Cell Biol. 100:704 - 714; Lazarovits & Roth, 1988, Cell 53:743 - 752; Naeve & Williams, 1990, EMBO J. 9:3857 - 3866; Naim et al., 1992, J. Virol. 66:7585 - 7588; Simpson & Lamb, 1992, J. Virol. 66:790 - 803; Steinhauer et al., 1991, Virology 184:445 - 448; Veit et al., 1991, J. Virol. 65:2491:2500) から発現させたとき、553位、560位または563位の保存されたシステインをセリン (H2およびH3) またはアラニン (H7) で置換しても、HAの生合成、細胞内輸送またはレセプター結合活性に有意な影響を与えなかったことが示されている。事実、2か所 (Simpson & Lamb, 1992, J. Virol. 66:790 - 803) または3か所すべて (Naim et al., 1992, J. Virol. 66:7585 - 7588) のパルミテート付加部位に変異を有するHAタンパク質は、HAにおける温度感受性の変異を有するインフルエンザウイルスに相補性があった (complement)。

最近、NaimとRoth (Naim & Roth, 1993, J. Virol. 67:4831 - 4841) は、組換えSV40ウイルス由来のHA変異型 (variants) をインフルエンザウイルス感染細胞において発現させることにより、細胞質尾部の役割の研究を拡張した。外来細胞質配列を有するキメラHAは効率的にウイルス包膜から除去されたが、細胞質尾部を欠くHAはビリオンに取り込まれた。同様に、SimpsonおよびLamb (Simpson & Lamb, 1992, J. Virol. 66:790 - 803) は、細胞質尾部を欠いているHA変異型はウイルス粒子に取り込まれたことを示したが、その粒子は非感染性であることがわかった。このことは、保存された細胞質配列は、HAをビリオンに取り込むのに必要ではないが、HAの細胞質尾部はウイルスの感染力に必要なことを示すのだろう。しかしながら、異なるアッセイ系を用いる本明細書に提示したデータは、感染性インフルエンザウイルスの生産におけるこれらのシステイン残基の役割を示している。

10

20

30

40

50

### 3. 発明の概要

本発明は、インフルエンザウイルスHAのPALミチル化を抑制し、ウイルスの構築 (assembly) を阻止する化合物を同定するためのアッセイに関する。本発明のもう一つの面では、ウイルスの構築、感染および/または複製を阻止し、かつ良好な治療係数を示す化合物がインフルエンザ感染の治療に用いられる。

本発明は、幾分かは、インフルエンザウイルスHAのPALミチル化部位の変異がウイルスの形成に影響を与え、HAのPALミチル化の抑制は、おそらくウイルスの構築を妨げることに  
10  
より、ウイルスの複製を阻止するという本出願人の知見に基づく。逆遺伝子技術 (reverse genetics techniques) を用いることにより、HA遺伝子が変化したトランスフェクタントインフルエンザウイルスを構築した。逆遺伝子手法の利点は、変異の効果を感染性ウイルスに関して分析できることである。ウイルスの表現型に対するその変化の効果を調べるために、HAの保存されたPALミチレート付加部位に変異を含むトランスフェクタントインフルエンザウイルスを単離した。提示したデータは、感染性インフルエンザウイルスの形成におけるシステイン残基の役割を示している。さらに、PALミチレート付加部位の一つである、細胞質尾部の563位のシステインは、感染性粒子の形成に必要であることがわかった。いかなる操作の説明や理論にも限定されるわけではないが、インフルエンザHAの保存されたカルボキシ末端のPALミチル化は、ウイルスタンパク質の適切な固定に必要であり、また、ウイルス構築に必要なHAタンパク質の翻訳後トラフィック (post-translational trafficking) に必要であることが提唱されている。

一つの態様において、本発明のアッセイは、PALミチレートの合成に続く工程を標的とする  
20  
ように設計されている。そのようなアッセイにより、ウイルス遺伝子産物のPALミチル化を妨げ、感染性ウイルス形成を抑制するが、PALミチレート (細胞の代謝とエネルギー生産に重要な鍵となる脂肪酸である) の合成を妨げない化合物の同定が可能となる。従って、本発明のこれらのアッセイを用いて、エネルギー生成に重要な細胞経路を破壊しない抑制性化合物を同定することができる。

本発明のもう一つの面では、アッセイは、抗ウイルス作用が発揮されるように、PALミチレートの生合成を妨げるかあるいは抑制する化合物を検出するように設計されている。例えば、感染性ウイルスの形成は、細胞に毒性でない減少したPALミチレートのレベルで減少するのかもしれない; 減少したレベルのPALミチレートはウイルス感染細胞に対して選択的に毒性であるのかもしれない; あるいは、この2つの組合せにより所望の抗ウイルス作用が発揮されるのかもしれない。  
30

### 4. 図面の説明

図1。14の異なるインフルエンザAウイルスサブタイプのHAのカルボキシ末端アミノ酸配列の比較 (Doyle et al., 1985, J. Cell Biol. 100:704 - 714; Kawaoka et al., 1990, Virology 179:759 - 767; Nobusawa et al., 1991, Virology 182:475 - 485; Simpson & Lamb, 1992, J. Virol. 66:790 - 803)。システイン残基を枠で囲い、軸方向の棒は経膜 (TM) と細胞質尾部 (Ward, 1981, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 94/95:1 - 74) との境界線を示す。保存されたシステインの番号付けは、H1サブタイプHAを指す (Hiti et al., 1981, Virology 111:113 - 124)。

図2。野生型インフルエンザA/WSN/33と変異型HAタンパク質のカルボキシ末端のアミノ酸  
40  
配列。左欄に使用したプラスミドの名称を記載してある。例えば、構築物pC553Sは、553位のシステインがセリンに変更されている。右欄に、救済された変異株 (rescued mutants) を (+) で示す。TM、経膜領域; Cyto、細胞質尾部; 野生型: プラスミドpT3WSN - HA/Hind III。

図3。一過的にトランスフェクトされた、ワクシニア感染 (vTF7.3) COS - 7細胞における野生型および変異型HAタンパク質の表面発現。トランスフェクトされたプラスミド: (A) pSVK3/HA (野生型)、(B) 偽トランスフェクトされた、(C) PSVK3/C560A/C563A、(D) /PSVK3/C563A、(E) PSVK3/C560S、(F) PSVK3/C553S/C560S/C563S。

図4。ブランク力価測定 (A) およびMDBK細胞におけるTCID<sub>50</sub>アッセイにより測定された、MDBK細胞における野生型およびトランスフェクタントウイルスの増殖特性。変異株C560  
50

Yははっきりしたプラークを形成しないので、TCID<sub>50</sub>アッセイをウイルス生産の力価測定に使用したことに注意されたい。

## 5. 発明の説明

本発明は、ウイルスの感染力、複製および/または構築に必要なウイルスタンパク質のアルミチル化を妨げるか、抑制する化合物の同定および使用に関する。ウイルスタンパク質へのアルミチル化の共有結合を阻止し、結合したアルミチル化をウイルスタンパク質から除去するか、アルミチル化の生合成を抑制して感染性ウイルスの形成を中断する化合物を同定するためのアッセイを記載する。比較的毒性である、例えば、良好な治療係数を示す抑制性化合物は、ヒトを含む動物におけるウイルス感染を治療するための抗ウイルス剤として利用できる。

10

考察を明確化するために、本発明を以下のサブセクションにおいてインフルエンザウイルスHAについて記載する。しかしながら、この原理は、ウイルスタンパク質のアルミチル化がウイルスの複製および構築における鍵となる役割を果たす他のウイルスにも同様に応用できるかもしれない。本当に、いくつかの包膜を有するウイルスに存在する糖タンパク質は、アルミチル化残基を含むことが示されてきた (Schmidt, 1982, *Virology* 116:327 - 338; Schmidt et al., 1979, *Cell* 17:813 - 819; Schmidt & Schlessinger, 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash)* 76:1687 - 1691; Klochmann & Deppert, 1985, *J. Virol.* 56:541 - 548)。しかしながら、これまでのところ、ウイルスの複製および構築におけるアルミチル化の役割についてはほとんど理解されていない。

### 5.1. インフルエンザHAのアルミチル化はウイルス形成に影響を与えない

20

14のサブタイプのインフルエンザウイルスHAのカルボキシ末端配列においては、3個のシステイン残基がよく保存されていることが示されているが、これらのシステイン残基は、アルミチル化の共有結合により修飾されていることが示されてきた。インフルエンザウイルスのゲノム配列は機能的要求の不存在下において強く保存されてはいないと考えられているにも係わらず、これらのシステインのアルミチル化に対する重要な生物学的役割は見つかっていない。事実、保存されたシステインを置換しても、細胞内輸送の速度または変異型HAタンパク質のレセプター結合および融合活性に影響を与えないこと、細胞質尾部のシステイン残基はウイルスが感染性であるのに必要であるようには思われなことが報告されている (Naim et al., 1992, *J. Virol.* 66:7585 - 7588; Simpson & Lamb, 1992, *J. Virol.* 66:790 - 803; Steinhauer et al., 1991, *Virology* 184:445 - 448; Veit et al., 1991, *J. Virol.* 65:2491 - 2500)。

30

保存されたシステインの単一または複数の変異はHAの細胞質尾部内に設計され、これらの変化がインフルエンザウイルストランスフェクタントのゲノムに導入された。システインの位置のいくつかの変更は、救済されたウイルスを導かず、他のシステインの変更により表現型が弱められることがわかった。これらの知見は、保存されたシステインが、細胞質尾部の構造を維持するのに、および/または、これらの部位におけるアルミチル化結合を提供するのに生物学的役割を果たしているという認識を支持している。

実施例において、以下に記載するが、インフルエンザA/WSN/33ウイルス (H1サブタイプ) のHAの細胞質尾部に553位、560位および563位 (C553、C560およびC563) で変異を導入した。これらの部位を、セリン、アラニン、またはチロシンに変え、これらの変異型の生物学的効果を分析した。その結果は、アルミチル化が重要であること、感染性ウイルス粒子を形成する能力は最も高いアルミチル化のレベルを持つ部位の維持と相関があることを示している (C563は最も高いレベルを持ち、C553は最も低いレベルを持つ)。

40

特に、553位でシステインを欠く変異型は救済され、事実、変異株C553Aは野生型同様増殖する。従って、この部位でのアルミチル化はウイルス形成に決定的な重要性を持つ可能性は低い。さらに、Naimら (上記) は、C553がHAに共有結合した全<sup>3</sup>H-アルミチル化の約10%しか取り込まないことを示している。Naimら (上記) は、アルミチル化レベルの定量のためにH2サブタイプHA (A/Japan/305/57) を使用したが、このウイルスの17個のカルボキシ末端アミノ酸はA/Japan/305/57ウイルスのそれと同一であるので、類似の修飾レベルがA/WSN/33ウイルスHA (H1) についても推測される。しかしながら、最近の結果は、563位

50

および560位でのシステインを含むHAの細胞質ドメインが除かれている欠失変異型においては、端を切り取ったHAは553位で完全にパルミチル化され、ウイルスは救済されることを示している。

560位のシステイン残基は、取り込まれたパルミテートの約40%を含むことが示された (Naim et al., 1992, 上記)。この位置がアラニンに置換された時、変異株 (C560A) は非常に弱毒化されることがわかった。この知見は、560位のパルミチル化が感染性ウイルスの形成に絶対に必要ではないが、補助的な役割を持つという考えと矛盾しない。最後に、HAの563位に変異を有するウイルスは救済されないであろう。Naimら, 1992, 上記によれば、このシステインは、14のサブタイプのすべてのHAで保存され、最も高いパルミチル化レベルを有する。また、パルミチル化部位の2か所または3か所に変化を有するすべての変異株ウイルスは生存できない。

システインを異なるアミノ酸で置換すると、ウイルスの表現型に異なる効果をもたらすという事実は、また、この領域における構造の役割を示している。セリンへの変異は、アラニンへの変異よりも、ウイルス増殖に悪影響を及ぼす。変異株C553Sは、粒子形成に遅れを示し、野生型よりも約5倍低い力価まで増殖するが、変異株C553Aは正常に増殖する (図4A)。さらに、変異株C560Sは生存できなかったが、C560Aは救済された。SV40ベクターを用いた発現の後、この位置でセリンを有する変異型HAタンパク質は、トリプトファンまたはチロシンのいずれかを含む変異型タンパク質と比較して、わずか約50%の脂肪酸しか取り込まなかった (Naim et al., 1992, 上記)。従って、560位のセリンは、おそらくHA尾部におけるペプチド構造を変化させることにより、他の位置でのパルミチル化の効率に影響を与えることができる。563位でのパルミチル化に対する560位のセリンのこの間接的な効果は、変異株C560Sが救済されなかった理由であるかもしれない。

驚くべきことに、変異株C560Fはほんのわずかしが弱毒化されなかった。サブタイプH13のHAにおいては560位にフェニルアラニンが存在するので、このアミノ酸はシステインに最適の別構造を与えるのかもしれない。この解釈はSugrueらの知見により支持されるが、彼らはM2 (50位) における保存されたパルミチル化システインがあるウマのインフルエンザウイルス株でフェニルアラニンに変更されることを示した (Sugrue et al., 1990, *Virology* 179:51 - 56)。フェニルアラニンは疎水性の大きなアミノ酸であるので、機能的に修飾システインの代役となるのかもしれない。

変異株C560Yは、野生型よりも、約2対数低いピーク力価まで増殖する。いくつかの独立の復帰変異体の特性付けがなされており、チロシンはいつも単一のAからGへのヌクレオチド変更によりシステインに戻った。チロシンコドンの単一ヌクレオチド変更は、ヒスチジン (転位)、またはアスパラギン、アスパラギン酸、フェニルアラニンおよびセリン (転換) のような他のアミノ酸をコードすることができる。しかしながら、これらのアミノ酸のいずれもがこれらの復帰変異体において観察されなかった。このことは、システインが本当に560位の好ましいアミノ酸であることを示唆している。しかしながら、4つの復帰変異体だけが配列決定され、560位での可能なアミノ酸置換のすべてが試験されたわけではないので、他のアミノ酸もまた許容される可能性を排除することはできない。野生型ウイルスの増殖の利点は、この位置でパルミチル化されたシステインはウイルス構築に有利に働くことであると説明できる。

本明細書に記載したデータは、インフルエンザウイルスのHAの細胞質尾部における保存されたシステインに対する生物学的重要性を示しており、かくして、他の研究者により得られたデータに新たな重要性を付け加える (Naim et al., 1992, 上記, Simpson & Lamb, 1992, 上記)。これらの初期の研究においては、置換されたシステイン残基を有するHA変異型 (サブタイプH2およびH3) は、温度感受性で輸送欠損インフルエンザウイルス変異株 ts61S に相補性があることが示された。一過的に発現した変異型HAタンパク質は感染性ウイルス粒子に取り込まれた。しかしながら、このタイプの相補性 (complementation) 実験は、HAの細胞質配列がウイルスの出芽または他の生物学的に重要な工程に必要なかどうかという質問を扱うことはできない。というのは、最近、NaimとRothにより考察されたように (Naim & Roth, 1993, *J. Virol.* 67:4831 - 4841)、許容されない温度 (nonpermissive tempe

10

20

30

40

50

rate) で、ts61SのHAのパルミチル化されたフラグメントは合成されたかもしれず、それらはピリオン構築を開始することができたであろうからである。他方で、初期の研究に使用されたH2またはH3サブタイプのHAにおけるシステインは、インフルエンザA/WSN/33HA (H1サブタイプに属する) におけるよりも、決定的でない役割を果たすという可能性は排除できない。要約すると、本明細書に記載したデータは、H1のHAサブタイプにおける保存されたカルボキシ末端システインに対する生物学的機能は、感染性ウイルス粒子の形成に必要であるように思われることを示している。一つ以上のシステイン残基の変更は、HAのパルミチル化の全体的なレベルを変化させ、かくして、構築過程に影響を及ぼしうる。あるいはまた、HAにおける別個のシステイン (C563) のパルミチル化が感染力に極めて重要なかもしれない。

10

## 5.2 インフルエンザHAのパルミチル化を抑制する化合物のアッセイ

ここで記載するアッセイは、HAウイルスタンパク質、遺伝子工学的に操作された細胞によって合成されたHA発現産物、およびHAの細胞質ドメインに対応する合成タンパク質、並びにそれらと機能的に均等なもの (以下、「HA - 基質」という) を含むがこれらには限定されない適当な基質のパルミチル化を測定するために設計されている。これらのアッセイは細胞内または *in vitro* で行われ、そしてHAのパルミチル化、および感染性ウイルスの生産を抑制する物質を同定するために使用することができる。本発明のアッセイにおいては、あるHA - 基質、例えば、HAの細胞質ドメインの配列モチーフを有するタンパク質またはペプチドを、細胞内または *in vitro* でパルミテートまたはパルミテート残基の供与体と、パルミチル化に関与するタンパク質アシルトランスフェラーゼ酵素 (以下、パルミテートトランスフェラーゼ、または「PT」という) の存在下に反応させる。パルミテート残基のHA - 基質への取込みは、パルミチル化およびPT活性を示す。試験物質によるパルミテート残基の取込みの抑制は、HA産物のパルミチル化を阻止し、感染性ウイルスの形成を阻害する被験物質の能力を示す。

20

本発明のアッセイにおいて、パルミテート基のHA - 基質中への取込みは、種々の方法によって検出することができる。例えば、HA - 基質のパルミチル化は、TLC (薄層クロマトグラフィー)、HPLC (高速液体クロマトグラフィー) を含むが、これらに限定されない各種のクロマトグラフ法、 ; またはSDS - PAGEなどの電気泳動法によって決定される、反応産物の移動度における変化によって検出することができる。加えて、基質、HA - 基質またはパルミテートのいずれかは標識されていてもよく、それにより、反応生成物中の標識の検出をパルミチル化および酵素活性の指標として使用することができる。このために、放射性標識、発蛍光性 (fluorogenic) 化合物、比色化合物、酵素などを含むがこれらに限られない、種々のシグナルを発生する化合物を、当業界で公知の標準的な代謝標識技術または化学的結合 (コンジュゲート) 技術を用いて、いずれかの基質中に取り込ませてもよい。いずれかの基質に特異的な抗体は、反応産物の単離および / または捕捉に使用してもよい。固相支持体を利用する場合、反応物を、非共有結合的にまたは共有結合によって、支持体の表面に固定することができる。例えば、抗 - HAまたはHA - 基質などのタンパク質の固定化は、支持体をタンパク質溶液でコーティングして乾燥することによって行われる。コートされた支持体は、予め調製して、使用前に保存しておいてもよい。

30

スクリーニングアッセイおよび以下に記載する要素は、インフルエンザHAのパルミチル化を抑制する化合物を同定するために設計されたものである。しかしながら、同様な設計およびアプローチは、ウイルスの感染性、複製、および / または組み立てといった重要な他のウイルスタンパク質のパルミチル化の阻害物質を同定するために使用することができる。

40

### 5.2.1 アッセイの要素

HA - 基質、パルミテート供与体または反応の要素を構成するパルミテート前駆物質およびPT酵素は、種々の方法によって得ることができる。

この細胞スクリーニングアッセイでは、ウイルス - 感染細胞、またはパルミチル化できるHA - 基質を細胞で発現するように遺伝子工学的に操作された細胞を利用する。このような細胞または細胞系は、当業者に公知の技術を用いて、HAまたはHAの細胞質ドメインに対応

50

するペプチドを発現するように操作を行ってもよい(例えば、Sombrookら、1989、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY、これは引用文献としてこの出願に含まれている)。このような細胞は、パルミチル化反応に必要なすべての要素を提供し、ここに記載されたように市販されている標識されたパルミテート(例えば、Amersham社製、New England Nuclear社製)とともに、および/またはHAまたはパルミテートに特異的な抗体とともに使用することができるが、上記抗体は細胞からの反応産物の回収および/または検出に使用することができるものである。

HAに特異的な抗体は、種々の公知の技術を用いて製造することができる。好適な実施態様においては、アッセイにおいて用いられる抗体は、細胞質ドメインの外側にあるHAのエピトープに対するものであり、および/またはパルミチル化部位を妨害するものではない。抗体生産のために、種々の宿主動物をHAタンパク質、またはそれらの一部を注射して感作してもよい。このような宿主動物は、家兎、マウス、およびラットなど数種の例示を含むが、これらに限られるものではない。種々のアジュバントは、宿主の種によるが、免疫学的応答の増強に使用されてもよく、フロイントのアジュバント(完全および不完全)、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲル、リゾレシチンなどの界面活性剤、プルロニックポリオール(pluronic polyols)、ポリアニオン、ペプチド、油性エマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノールなどを挙げるができるがこれらに限定されるものではなく、そしてBCG(bacille Calmette - Guerin)およびコリネバクテリウム・パルバム(*Corynebacterium parvum*)などのヒトのアジュバントが潜在的に有用である。 10 20

モノクローナル抗体は、培養で継代される細胞系によって抗体分子の生産を提供するいかなる技術を用いて製造することができる。これらは、ケーラーおよびミルシュタインによって最初に記載されたハイブリドーマ技術(Nature, 1975, 256: 495 - 497); ヒトB - 細胞ハイブリドーマ技術(Kosborら、1983, Immunology Today, 4: 72, Coteら、1983, Proc. Natl. Acad. Sci., 80: 2026 - 2030)およびEBV - ハイブリドーマ技術(Coleら、1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77 - 96)などを含むが、これらに限られるものではない。さらに、適当な抗原特異性を有するマウス抗体分子からの遺伝子と適当な生物学的活性を有するヒト抗体分子からの遺伝子をスプライスすることによる「キメラ抗体」生産のために開発された技術(Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81: 6851 - 6855; Neubergerら、1984, Nature, 312: 604 - 608; Takeda et al., 1985, Nature, 314: 452 - 454)を使用することができる。また、一本鎖の抗体の生産のために記載された技術(米国特許第4,946,778号)を、HAに特異的な一本鎖抗体の生産に適合させることもできる。 30

特異的エピトープを認識する抗体断片を、公知の技術で作成してもよい。例えば、このような断片は、抗体分子のペプシン消化で製造されるF(ab')<sub>2</sub>断片およびF(ab')<sub>2</sub>断片のジスルフィド架橋を還元して製造できるFab断片などを含むが、これらに限定されるものでない。また、Fab発現ライブラリを構築し(Huseら、1989, Science, 246: 1275 - 1281)、所望の特異性を有するモノクローナルFab断片を迅速かつ容易に同定することができる。 40

in vitroアッセイのために、HA - 基質は、パルミチル化に必要ないかなるモチーフを有するタンパク質またはペプチドを含んでもよい。このようなHA - 基質は、未処理の(unprocessed)HA - タンパク質(以下、「未処理HA - タンパク質」は、パルミテート残基の付加によって翻訳後に修飾されなかったHA - タンパク質; すなわち、パルミチル化されていないHA - タンパク質、をいう)、およびHAの細胞質ドメインに対応するペプチドを含むが、これらに限定されることはない。

未処理HAは、HA遺伝子、またはそれらの変異体を、種々の原核細胞発現系のいずれかで、当業界で周知の組換えDNA技術(例えば、Sambrook, 1989, 既出)を用いて、クローニングし発現させて有利に得ることができる。このような原核細胞系で発現されたHAタンパク質は、プロセッシングされず、または真核細胞系中にあるはずのように翻訳後に修飾されない 50

。また、パルミチル化できない真核細胞系を、発現宿主として使用してもよい（例えば、HeLa細胞）。

また、HA - 基質を当業界で周知の技術を用いて、化学的に合成してもよい（例えば、Creighton,1983,Proteins:Structures and Molecular Principles,W.H.Freeman & Co.,NY,Chapter.1）。

分子クローニング法または化学合成法のいずれで製造するかを問わず、細胞ベースまたは本発明の *in vitro* アッセイのいずれかにおいて使用してもよいHA - 基質のアミノ酸配列は、報告されたHAの配列（またはその細胞質ドメイン）と同一である必要はない。HA基質は、アミノ酸残基が欠失、付加、または置換され、パルミチル化のための基質として作用する機能的に等価な産物を生じる変化した配列を含むものでもよい。

例えば、機能的に等価なアミノ酸残基を、配列に変化を生じさせるその配列の範囲内にある残基で置換してもよい。このような置換は、アミノ酸が属するクラスの他のメンバー；例えば、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびメチオニンを含む非極性（疎水性）アミノ酸；グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンを含む極性の中性アミノ酸；アルギニン、リシン、ヒスチジンを含む正に帯電する（塩基性）アミノ酸；アルギニン酸およびグルタミン酸を含む負に帯電する（酸性）のアミノ酸から選択されてもよい。

*in vitro* アッセイで使用されるPT酵素は、種々の供給源から得ることができる。例えば、PTは、種々の哺乳動物細胞、組織または器官のいずれから、記載された精製スキームを用いて単離したものでもよい（例えば、Schmidt and Burns,1989,Biochem.Soc.Trans.17:635 - 626;およびKasinathanら、1990,J.Biol.Chem.265:5139 - 5144を参照されたい；各々は、参考文献として本出願に取り込まれている）。

活性な酵素は、234kDの分子量を有し、65および67kDのポリペプチドからなる。この酵素は粗面小胞体の膜に固く結合している；このため、膜脂質が反応混合物中に含まれざるを得ないかもしれない。また、PTを発現する細胞の未精製の溶解物、または細胞の細胞質ゾル画分（例えば、細胞のミクロゾーム画分）、PTを発現する組織または器官を、アッセイ系の要素として利用してもよい。

PTが均一に精製された後は、特異的抗体が生産されてもよく、そしてPTのアミノ酸配列を、標準的なシーケンシング（配列決定）技術、例えば、エドマン分解（例えば、Creighton,1983,既出の34~49頁を参照せよ）を用いて、全部または一部決定することができる。

これらのアミノ酸配列（全部または一部）は、その後PTの配列をコードするヌクレオチドを得るためおよびこれを合成するために使用してもよい。PTの配列をコードするヌクレオチドは、PT遺伝子および/またはcDNAを当業界で公知の方法でクローニングするために使用することができ、当業界で公知の適当な発現/宿主細胞系を用いてPT遺伝子産物を発現させるために使用することができる。例えば、cDNAおよび/またはゲノムライブラリを、PTのためのオリゴヌクレオチドプローブを用いてスクリーニングすることができ；発現ライブラリを抗体でスクリーニングすることができる（例えば、Sambrookら、1989、既出を参照せよ）。また、PTアミノ酸配列に由来するオリゴヌクレオチドは、PCR（polymerase chain reaction:ポリメラーゼ連鎖反応）におけるプライマーとして使用して、種々の細胞の供給源からのcDNAまたはPT配列のゲノムコピーを生産することができるはずである。このようなPCR技術を検討するために、例えば、Gelfand,DH,1989,PCR Technology:Principles and Applications for DNA Amplification,H.A.Ehrlich編、Stockton Press,NYおよびCurrent Protocols in Molecular Biology,Vol.2,Ch.15,Ausubelら編、John Wiley & Sons,NY,1988を参照せよ。PTコーディング配列を、その後、適当な発現系中に操作して入れ、十分な量の酵素を生産することができる；例えば、このような発現系は統合性の（*integrating*）または非統合性の（*non-integrating*）複数の発現ベクター、適当なプロモーター/エンハンサー要素、選択可能な/増幅可能な複数のマーカーなどの使用を含んでもよい（例えば、Sambrookら、1989、既出を参照せよ）。

また、PTタンパク質は、全部または一部のアミノ酸配列を合成するための化学的方法を用

10

20

30

40

50

いて生産することができるはずである（例えば、Creighton, 1983, 既出の34～49頁および50～60頁を参照せよ）。

パルミテートは種々の市販のソースから得てもよく（例えば、Sigma社製）、放射性標識、発蛍光性化合物、比色化合物、酵素などを含むがこれらに限定されるものではない種々のシグナル発生化合物で、標準的な代謝標識技術または化学的結合技術を用いて標識してもよい。実際、放射性標識されたパルミテートが市販されている（例えば、Amersham社製; New England Nuclear社製）。

標識されたパルミチン酸前駆物質は $^{14}\text{C}$ または $^3\text{H}$ を含んでもよく、これらは市販されている（例えば、Amersham社製; New England Nuclear社製）。

### 5.2.2 細胞スクリーニングアッセイ

このアッセイは、インフルエンザ感染細胞、またはHA - 基質を発現するように操作された細胞中におけるインフルエンザHAのパルミチル化を抑制する化合物を検出する。一般的な操作は、標識されたパルミチン酸または標識されたパルミチン酸前駆物質を被験化合物とともにおよび被験化合物なしで細胞に添加する工程と、細胞からのHAまたはHA - 基質を回収する工程と、標識されたパルミチン酸または標識されたパルミチン酸前駆物質が回収されたHAおよびHA - 基質中に取り込まれているか否かを検出する工程とを含む。標識されたパルミチン酸前駆物質の使用により、感染性ウイルス形成の選択的阻害がされるようなパルミテートの生合成を妨害する化合物の検出が可能となる。標識されたパルミチン酸または標識されたパルミチン酸前駆物質の使用により、感染性ウイルス形成の選択的阻害がされるような、ウイルスHAへのパルミテートの結合（attachment）を妨害する化合物の検出が可能となる。標識されたパルミチン酸前駆物質または標識されたパルミチン酸のいずれかを、HAからパルミテートを除去し、感染性のインフルエンザウイルスの形成を阻害する化合物を検出するために使用してもよい。

1つの実施態様においては、被験化合物および標識されたパルミチン酸または標識されたパルミチン酸前駆物質を、インフルエンザに感染した細胞の培養物に添加する。別の実施態様においては、被験化合物および標識されたパルミチン酸または標識されたパルミチン酸前駆物質を特別に操作された細胞の培養物に添加し、インフルエンザウイルスHA遺伝子産物または他のHA - 基質を発現させる。このアッセイ系における感染細胞の使用により、ウイルスの感染、複製、および/または組立の阻害もアッセイできるという利点をもたらされる。感染細胞のアッセイによっても、HAのパルミチル化以外の標的に作用するウイルス阻害物質が同定されるかもしれない。HA遺伝子産物またはHA - 基質を発現する遺伝子工学的に操作された細胞の使用により、HAのパルミチル化を特異的に阻害する成分のみが同定されるだろう。

被験化合物およびパルミチン酸または標識されたパルミチン酸前駆物質の添加の順序は、変えてもよい；例えば、同時にまたは順次に添加してもよく、このような添加は異なる情報を提供できる。例えば、被験化合物を先に添加すると、HAのパルミチル化を妨げる化合物が同定されるであろう。被験化合物を標識されたパルミテートの後に添加すると、HAからパルミテートを除去する化合物が同定されるはずである。被験化合物なしまたはプラセボは、対照に添加する。

適当な時間の経過後、ウイルスHAまたは遺伝子操作されたHA遺伝子産物またはHA - 基質が培養物から単離される。これは、細胞を溶解させ、その溶解物からHAを、抗 - HA抗体；例えば、捕捉してつなぎ止める固定化抗 - HA抗体で単離することによって行ってもよい。この系により、被験化合物の迅速かつ高処理量のスクリーニングが可能となる。また、HAは、溶解物から免疫沈降または免疫電気泳動（例えば、ウェスタンブロット）によって単離してもよい。

次に、単離されたHA中へ取り込まれた標識パルミチン酸の有無を検出する。被験化合物がインフルエンザHAのパルミチル化を妨げることができる場合には、HA - タンパク質または基質は標識されたパルミチン酸を取り込まず、そして、アッセイは標識の取込みの欠如によって点数付けされるだろう。被験化合物がHAのパルミチル化を抑制しないならば、タンパク質は標識を取り込み、そして標識されたタンパク質が上記の技術によって検出される

10

20

30

40

50

だろう。

### 5.2.3 in vitroスクリーニングアッセイ

このアッセイはin vitroでインフルエンザHAのPALミチル化を抑制する化合物を検出する。このアッセイの原理は、被験化合物と標識されたPALミチン酸とを、HA - 基質（例えば、未処理のHA - タンパク質またはペプチド）とPTとを含む反応混合物中に添加する工程を含む。適当な時間の経過後、HA - 基質中への取り込まれた標識PALミチン酸の有無を検出する。HA - 基質は、反応混合物中から除去してもよく、および/または細胞ベースのアッセイ系中で記載したように抗 - HA抗体を用いて固定してもよい。

使用された反応条件は、in vitroにおけるPALミチル化活性を最適化するように調整してもよい。例えば、膜脂質を系に添加して酵素活性を高めてもよく；適当な濃度のカオチン 10  
を反応バッファーに添加してもよく；pHおよび温度は、至適酵素活性に達するように調整すべきである。同様に、スルフヒドリル基を保護するDTT (dithiothreitol; ジチオトレイトール) などの試薬を反応混合物に添加してもよい。

細胞ベースのアッセイ系で説明したように、PALミチル化を抑制または妨害することによって作用する化合物、およびHAからのPALミチン酸を破壊または除去する化合物を区別するために、被験化合物の反応生成物に対する添加の順序は変えてもよい。

別の実施態様においては、未処理のHA - 基質を、被験化合物、標識されたPALミチン酸、および細胞抽出物またはPTとともにインキュベートする。適当な反応時間の経過後、HA - 基質を反応混合物中から、例えば、抗 - HA抗体を用いて除去する。このことについては、 20  
固定化抗体は、迅速かつ高処理量のアプローチを提供する。例えば、反応混合物を、固定化抗 - HA抗体でコートしたマイクロタイターウェルプレートに添加してもよい。未反応の成分を、例えば洗浄により除去した後、捕捉されたHA - 基質を標識されたPALミチン酸の取込みについてアッセイする。被験化合物の存在下において標識PALミチン酸を取込むHA - 基質の能力は、HA - タンパク質による標識されたPALミチン酸の保持によって点数付けされる。被験化合物が、インフルエンザHAのPALミチル化を妨げることができる場合には、HA - 基質は標識されたPALミチン酸を取り込まないであろうし、そしてアッセイは標識の取込みがないことによって点数付けられるだろう。被験化合物がHA PALミチル化を抑制しない場合には、HA - 基質は標識を取り込むだろう。被験化合物の評価は、被験化合物が付加されていない、またはプラセボが使用されている対照実験を参照して行う。

他の実施態様においては、HA - 基質は標識されたPALミチン酸と細胞抽出物またはPT、および被験化合物（膜脂質を添加しなければならないかもしれない）を添加する前に固定化 30  
してもよい。このために、HA - 基質の溶液を、固相支持体をコートするために使用することができる。また、HA - 基質をつなぎ止めるために、抗 - HA抗体を使用して支持体をコートしてもよい。被験化合物の存在下において標識PALミチン酸を取込む固定化HAの能力は、タンパク質による標識の保持によって点数付けされる。被験化合物が、インフルエンザHAのPALミチル化を妨げることができる場合には、HA - 基質は標識されたPALミチン酸を取り込まないであろうし、そしてアッセイは標識の取込みがないことによって点数付けられるだろう。被験化合物がHA PALミチル化を抑制しない場合には、HA - 基質は標識を取り込むだろう。標識されたHA - 基質の有無は、固定化された成分のオートラジオグラフィ 40  
ー分析によって検出される。被験化合物の評価は、被験化合物が付加されていない対照実験を参照して行う。

本発明のさらに別の実施態様では、PALミチン酸を固相支持体上に固定化し、そしてHAおよび細胞抽出物またはPALミチン酸トランスフェラーゼ、および被験化合物とともにインキュベートする。被験化合物の存在下における固定化PALミチン酸へのHAの結合能は、1標識HAタンパク質または標識された抗 - HA抗体を用いて点数付けできる。この使用のための検出系では、放射活性、ビオチン - ストレプトアビジン、または蛍光を利用することができる。被験化合物が、インフルエンザHAのPALミチル化を妨げることができる場合には、タンパク質はPALミチン酸に結合しないであろうし、そしてアッセイはPALミチン酸への結合タンパク質がないことによって点数付けられるだろう。被験化合物がHA PALミチル化を抑制しない場合には、タンパク質はPALミチン酸と結合してそのように記載された技 50

術によって検出される。被験化合物の評価は、被験化合物が付加されていない対照実験を参照して行う。

### 5.3 抗ウイルス活性のアッセイ

#### 5.3.1 ウイルス増殖アッセイ

パルミチル化阻害物質のウイルス増殖阻害能は、プラーク形成または、TCID<sub>50</sub>もしくはトリ胚の尿膜における増殖などのウイルス増殖の他の指標を用いてアッセイできる。これらのアッセイにおいては、適当な細胞系に野生型のインフルエンザウイルスを感染させ、被験化合物を組織培養の培地に感染時または感染後に添加する。被験化合物の効果を、ウイルスプラークの存在によって示されたウイルス粒子形成を定量することによってもしくはTCID<sub>50</sub>、トリ胚の尿膜における増殖のような指標によって、または赤血球凝集アッセイによって点数付けする。

10

パルミチル化阻害物質は、ウイルス感染細胞またはトリ胚の尿膜におけるプラーク形成抑制能または細胞変性作用低減能、または赤血球凝集アッセイで測定されたようなウイルス粒子形成低減能によって点数付けできる。

#### 5.3.2 動物モデルアッセイ

パルミチル化阻害物質のインフルエンザウイルス複製阻止能を、天然のまたはインフルエンザの宿主に適合させた動物モデルでアッセイすることができる。このような動物は、ブタ、白イタチ (ferrets)、マウス、サル、ウマ、霊長類、またはトリなどを含んでもよい。下記の5.5章で詳細に説明するが、このような動物モデルは、被験動物においてLD<sub>50</sub>およびED<sub>50</sub>を決定するために使用することができ、このようなデータをパルミチル化阻害物質の治療係数を得るために使用することができる。

20

#### 5.3.3 HA力価アッセイ

パルミチル化阻害物質のウイルス増殖阻害能は、感染後の種々の時間における感染細胞の培養上清中または感染孵化卵の尿膜液中のHA力価を測定することによってアッセイすることができる。

### 5.4 抑制性化合物

本発明に従って使用されてもよい上述のスクリーニングで同定された抑制性化合物は、小さな有機分子、ペプチド、および抗体を含むがこれらに限定されるものではない。

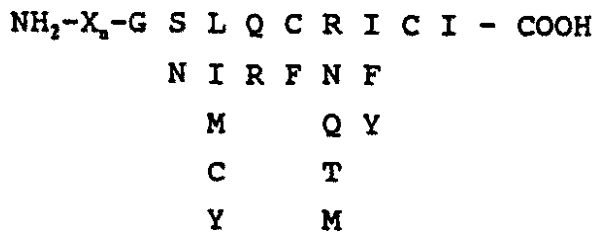
アッセイは、パルミチル化の受容体としてのHAの細胞質ドメインと拮抗する化合物；HAの細胞質ドメイン上へのパルミチル化の結合を阻止する（ブロックする）化合物；および宿主細胞のPT酵素の活性を抑制する化合物を同定するために使用することができる。

30

パルミチル化された宿主細胞タンパク質の数を分析することにより、共通のパルミチル化部位を明らかにすることはできなかつた（総説として、Deschenesら、1990、Current Opinion in Cell Biology 2:1108 - 1113を参照せよ）。それゆえ、HAパルミチル化部位をブロックするかまたは基質としてのHAと拮抗する化合物は、宿主細胞タンパク質とは対照的に、HAのパルミチル化を抑制するより高い特異性を証明するかもしれない。結果として、このような化合物は、より少ない副作用を示すかもしれない。

例えば、インフルエンザHAの細胞質ドメインに対応するアミノ酸配列を有するペプチドを、パルミチル化のための基質としてウイルスHAと拮抗させるために使用してもよく、それゆえ、本発明の阻害物質として有用であるかもしれない。このようなペプチドは化学的に合成してもよく（例えば、Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman & Co., NY, Ch.1）、または組換えDNA技術によって生産してもよい（例えば、Sambrook, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories Press, Cold Spring Harbor, N.Y.）。下記のアミノ酸配列を有するペプチドを使用してもよい。

40



ここで、nは、(0~40)の整数であり、示された配列の上流側に位置するHAの膜貫通領域の1以上のアミノ酸を表し；そして、示されているペプチド配列の範囲内の残基の下部に示されたアミノ酸は、その残基で置換されていてもよい。

デカペプチド (NGSLQCRICI) が、細胞培養におけるインフルエンザ感染において、力価が対数で1~2減少し、有意な抗ウイルス活性を有さないことを示したということを明記すべきである (Collierら、1991, Virology 183;769 - 772; 図1)。しかしながら、このデカペプチドは、非常に水に溶けにくく、担体として界面活性剤を使用することが必要であるため、十分な量のペプチドが感染細胞中に運ばれることは保証されなかった。細胞内輸送のためのリポフェクチンまたはリポソームなどの改良された担体を使用して、このペプチドの有効性を高めてもよい。さらに、HA膜貫通領域の全部または一部を含むより長いペプチドは、感染細胞中でパルミチル化のための優れた拮抗物質として作用するかもしれず；このようなペプチドは、細胞膜内に局在しうるので、細胞性PTタンパク質により接触しやすい。細胞の脂質二重層中にあるこのようなペプチドを取り込むリポフェクチンまたはリポソームを、細胞にこのペプチドを運ぶために使用してもよい。

また、HAの細胞質ドメインに特異的であって、パルミチン酸の共有結合を阻害する抗体を使用してもよい。このような抗体は、上記5.2.1章に記載したような標準的な技術を用いて、HA、HAの細胞質ドメインに対して、または合成ペプチドに対して生産させてもよい。このような抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、Fab断片、一本鎖抗体、キメラ抗体などを含むが、これらに限定されるものではない。抗体全体を使用する場合には、自己化抗体 (internalizing antibody) が好適である。しかしながら、リポフェクチンを、抗体またはHAエピトープに結合するFab領域の断片を細胞内に運ぶために使用してもよい。抗体の断片を使用する場合、HAの細胞質ドメインに結合する最も小さな抑制性断片が好適である。

別の実施態様では、その化合物が低毒性で良好な治療係数を示すならば、HAへのパルミチン酸の転移および共有結合に關与する細胞性PT酵素の酵素活性を阻害する化合物を使用してもよい。

5.5 HAのパルミチル化を抑制する化合物を使用したインフルエンザウイルス感染の治療  
パルミチル化及びウイルス複製を抑制する特定の化合物を、治療上有効な投与量で患者に投与することができる。治療上有効な投与量とは、ウイルス感染の症状の改善を生じるのに十分な量をいうものである。

そのような化合物の毒性及び治療効果は、細胞培養物あるいは実験動物において標準的な薬学的方法を用いて決定することができ、例えばLDS<sub>50</sub> (集団の50%に致死的な投与量) 及びED<sub>50</sub> (集団の50%に治療上有効な投与量) を求める方法により決定できる。毒性投与量と治療的に有効な投与量の比が治療指数であり、比LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>で表せる。大きい治療指数を示す化合物が好ましい。有毒な副作用を示す化合物も使用できるが、非感染細胞を傷つけたり、副作用を減らすために、そのような化合物を感染部位に向かわせるデリバリーシステムの設計には注意を払わなくてはならない。

細胞培養アッセイ及び動物実験から得られたデータを使用してヒトにおいて使用するための投与量範囲を処方することができる。そのような化合物の投与量は好ましくは、殆どあるいは全く毒性がなく、ED<sub>50</sub>を包含する循環濃度の範囲内にある。投与量はこの範囲内で、使用した投与形態及び使用した投与経路により変化させてもよい。本発明の方法において使用される任意の化合物について、治療上有効な投与量は最初に細胞培養アッセイから見積もることができる。動物モデルにおいて投与量を処方して、細胞培養物において測定されたIC<sub>50</sub> (即ち、最大感染または最大抑制の半値を示す試験化合物の濃度) を含む、循

10

20

30

40

50

環血漿濃度範囲を得ることができる。このような情報を使用してヒトにおける有用な投与量をより正確に決定することができる。血漿におけるレベルは、例えば高速液体クロマトグラフィーにより測定できる。

本発明により使用するための医薬組成物は、生理学的に許容される1種以上の担体あるいは賦形剤を用いて慣用の方法により処方することができる。

即ち、前記治療化合物及びその生理学的に許容される塩及び溶媒和物を、吸入あるいは吸引（口または鼻を通して）による投与、経口、口内、非経口あるいは経直腸投与のために処方することができる。

吸入による投与のためには、本発明により使用するための化合物は、適当な噴射剤、例えばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素、あるいはその他の適当なガスを使用した圧縮パックあるいはネブライザーから噴出されるエアロゾルスプレーの形態でデリバリーするのが便利である。圧縮エアロゾルの場合、調整された量をデリバリーするためのバルブを取り付けることにより投与単位を決めることができる。吸入器あるいは吸引器で使用するための、治療化合物と例えばラクトースあるいはデンプンのような適当な粉末基剤との粉末混合物を含む例えばゼラチンのカプセル及びカートリッジを処方することができる。

経口投与については、医薬組成物は、結合剤（例えば、予備糊化したトウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、あるいはヒドロキシプロピルメチルセルロース）；充填剤（例えば、ラクトース、微結晶セルロース、あるいはリン酸水素カルシウム）；滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、あるいはシリカ）；崩壊剤（例えばジャガイモデンプン、あるいはデンプングリコール酸ナトリウム）；あるいは湿潤剤（例えばラウリル硫酸ナトリウム）等の医薬上許容される賦形剤（pharmaceutically acceptable excipient）を使用して慣用の手段により製造された、例えば錠剤あるいはカプセルの形態とすることができる。錠剤は当分野で周知の方法により被覆してもよい。経口投与のための液体製剤は、例えば、溶液、シロップ、あるいは懸濁物の形態とすることができ、あるいは使用前に水あるいはその他の適当なビヒクルで構成する乾燥製品としてもよい。このような液体製剤は、例えば、懸濁剤（例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導體あるいは水素化可食脂肪）；乳化剤（例えば、レシチンあるいはアカシア）；非水性ビヒクル（例えば、アーモンドオイル、油性エステル、エチルアルコール、あるいは分別植物油）；及び保存料（例えば、メチルあるいはプロピル-p-ヒドロキシベンゾエートあるいはソルビン酸）等の医薬上許容される添加剤を使用して慣用の手段により製造できる。このような製剤は、バッファ塩、香味剤、着色剤、甘味剤等を適宜含んでもよい。

経口投与のための製剤を適当に処方して活性化合物の放出を制御することもできる。

口内投与のためには、組成物は慣用の方法で配合された錠剤あるいはロゼンジの形態とすることができる。

治療化合物は、例えばボラス注射あるいは持続点滴等による注射での非経口投与用に処方してもよい。注射用の処方物は、例えば、保存料を添加したアンプルや複数投与単位容器のような単位投与形態にすることができる。組成物は例えば、油性もしくは水性のビヒクル中の懸濁物、溶液、あるいは乳液の形態とすることができ、懸濁剤、安定剤及び/または分散剤のような処方用剤を含んでもよい。あるいは活性成分は、使用前に適当なビヒクル、例えば滅菌された発熱物質を含まない水等により構成される粉末の形態とすることができる。

治療化合物はまた、例えば、慣用の座薬基剤、例えばココアバターあるいはその他のグリセリドを含む、座薬や固定浣腸のような経直腸用組成物に処方することもできる。

先に記載した処方物の他、化合物はデポ製剤として処方してもよい。そのような長期間作用する処方物は移植（皮下あるいは筋肉内）あるいは筋肉内注射により投与することができる。即ち、治療化合物は例えば、適当なポリマー性あるいは疎水性物質（例えば許容される油中のエマルジョン）あるいはイオン交換樹脂と共に処方してもよく、あるいは僅かにしか溶解しない誘導體として、例えば僅かにしか溶解しない塩として処方することもできる。

10

20

30

40

50

組成物は、所望により、活性成分を含む1以上の投与単位形態を含み得るパックあるいはディスペンサーデバイス中のものとするができる。そのようなパックは例えば、金属あるいはプラスチックホイルを含むものであり、例えばプリスターパックである。パックあるいはディスペンサーデバイスには投与のための説明書を添付することができる。

#### 6. 実施例：インフルエンザHAタンパク質のパルミチル化部位での突然変異はウイルスの形成に影響を及ぼす

以下に記載する例においては、リバーズジェネティック技術により（米国特許第5,166,057号を参照、これは引用により全体を本明細書の一部とする）、インフルエンザA/WSN/33ウイルス（H1サブタイプ）のHAに突然変異を導入した。細胞質尾部の位置563のシステインが感染性粒子の形成に必要であることが判った。位置560のシステインをアラニンあるいはチロシンに変更して弱毒株を形成することができ、一方位置553のシステインのセリンあるいはアラニンへの変更はウイルスの表現型を有意には変化させない。二重あるいは三重の突然変異では感染性のウイルスは得られなかった。システインからチロシン（位置560）への弱毒化変異体の復帰突然変異体の選択によれば、他のアミノ酸ではなく常にシステインへの復帰突然変異が得られた。

##### 6.1. 材料及び方法

###### 6.1.1. ウイルス及び細胞

以前に記載されたように、インフルエンザA HK - WSN（H3N1）ウイルスをヘルパーウイルスとして使用した（Enami and Palese, 1991, J. Virol. 65:2711 - 2713; 米国特許第5,166,057号）。HK - WSNウイルスは、A/WSN/33（H1N1）ウイルスからの7つの遺伝子と、A/Hong Kong/8/68（H3N2）ウイルスからのHA遺伝子を含む再構築ウイルスである。HK - WSNウイルスは、Mardin - Darbyウシ腎臓（MDBK）細胞において増殖させ、MDBK細胞に感染させることにより力価を測定した。MDBK細胞をRNPトランスフェクションとトランスフェクタントウイルスの選択、並びにウイルスストックの調製に使用した（Luytjesら, 1989, Cell 59:1107 - 1113）。最も高い力価を有する前の世代の試料から得た接種物を使用して、MDBK細胞あるいは孵化卵においてウイルスの複数回の継代を行った。1/10 ~ 1/1000の希釈物を接種に使用した。

###### 6.1.2. MDBK細胞中での増殖曲線

60mm皿中のMDBK細胞の集密単層に0.001の感染多重度（moi）で室温で1時間ウイルスを感染させ、培養培地を加えた後、37 °C / 5% CO<sub>2</sub>でインキュベートした。感染後12時間の間隔でブランクアッセイあるいはTCID<sub>50</sub>アッセイによりウイルス力価を測定した。後者のアッセイは、別個の（discrete）ブランクを形成しない突然変異体ウイルスの力価測定のために使用した。

###### 6.1.3. HAのパルミテート付加部位のオリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発

全ての突然変異体構築物の構築にインフルエンザA/WSN/33ウイルスの野性型HA遺伝子の完全長cDNAを含むプラスミドpT3/WSN - HA（Enami and Palese, 1991, J. Virol. 65:2711 - 2713）を使用した。cDNAの3'末端への突然変異の導入を促進するため、pT3/WSN - HAを以下のように修飾した。ヌクレオチド位置1679（カルボキシ末端から16アミノ酸離れている）にHind III制限酵素部位を導入し、当初のpT3/WSN - HAクローンのT3プロモーター及びpUC18ベクターの間のHind III部位をPst1部位により置き換えた。この目的のため、最初にpT3/WSN - HAをHind IIIで直線化し、末端をクレノウ酵素（Bethesda Research Laboratories）で修復した。次に直線化したベクターをBstX1により消化し、ゲル電気泳動により精製した。pT3/WSN - HA DNAを鋳型として用い、2つの合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCR断片を生成した。上流のプライマー（5' - CTGTCGCCAGTTCACCTGGTCTTTGGTCTCCCTGGGGCAAGCTTCTGGATGTGT - 3'）は、HAcDNAのヌクレオチド1636 ~ 1695からの配列をカバーし、ヌクレオチド位置1679と1682（太字）において導入したサイレント変異により生成されたBstX1部位とHind III部位（下線部）を含む。下流のプライマーHA01（5' - CGGCCCTGCAGAATTAACCCTCACAAA - 3'）はT3プロモーターとPst1部位（下線部）を含む。PCR断片をBstX1により消化し、先に記載されたベクターに結合した。修飾されたプラスミドをpT3/WSN - HA/Hind IIIと称する。

10

20

30

40

50

図2に示した突然変異体プラスミドは、オリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発により構築した。pC553Sを生成するため、例えばpT3/WSN-HA/Hind IIIを鋳型として使用し、プライマー-HA01及びHind III部位(下線部)と適当な突然変異(太字)をHAのオープンリーディングフレームに含むオリゴヌクレオチド(5'-CCGGTTTCTGGATGTCTTCTAATGGGTC-3')を使用するPCRによりDNA断片を増幅した。PCR断片をHind III及びPst1により消化し、Hind III及びPst1により消化したpT3/WSN-HA/Hind IIIに挿入した。全ての突然変異プラスミドは、適当なプライマーと鋳型とを使用してこの方法により構築した。全ての突然変異プラスミドの挿入物は配列決定により確認した(Sangerら,1977,Proc.Natl.Acad.Sci.USA74:5463-5467)。

野生型及び突然変異体HAタンパク質を発現させるため、HAの全コード領域と非コード領域を含む、pT3/WSN-HA/Hind IIIと突然変異体構築物のXbaI-Pst1断片を発現ベクター-pSVK3(Pharmacia)に、T7プロモーターの下流でサブクローン化した。

#### 6.1.4 インフルエンザAウイルスRNAポリメラーゼ複合体の精製及びMDBK細胞のリボ核タンパク質(RNP)トランスフェクション

RNAポリメラーゼ複合体をインフルエンザA/PR/8/34ウイルスまたはX-31から記載されたようにして精製し(Parvinら,1989,J.Virol.63:5142-5152)、MDBK細胞のRNPトランスフェクションに使用した。トランスフェクトの手順は、トランスフェクション収穫物を液体中で0.5%ウサギ抗-HK抗血清(Wiglerら,1979,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:3567-3570)の存在下にMDBK細胞で2回継代させた以外は、以前に記載されたプロトコールに従った(Enami and Palese,1991,J.Virol.65:2711-2713;米国特許第5,166,057号)。ウイルスは0.5%ウサギ抗-HK抗血清の存在下にブランク精製した。

#### 6.1.5 ウイルス精製及びRNA抽出

野生型及び突然変異体トランスフェクタントウイルスをMDBK細胞中で増殖させ、30%~60%スクロース勾配遠心分離により精製した。そしてビリオンRNAを以前に記載されたようにして抽出した(Luoら,1992,J.Virol.66:4679-4685)。

#### 6.1.6 RNA及びDNA配列決定

トランスフェクタントウイルスC553S、C553A及びC560AのHA遺伝子の配列を、プライマー5'-GGTGTATCAGATTCTGGCGATC-3'(A/WSN HA遺伝子の位置1607-1628に対応する)及びAMV逆転写酵素を使用した直接のRNA配列決定により確かめた。全てのその他の突然変異体ウイルスのHAセグメントの配列は以下のようにして得た。精製されたウイルスからのRNAを、AMV逆転写酵素と、A/WSN HAビリオンRNAの位置1509-1526に相補的でBamH1部位(下線部)を含むプライマー5'-ACGTGGATCCGAAAGTGTAAGAAATGGG-3'を使用してcDNAに転写した。このオリゴヌクレオチド及びプライマー5'13/Hind III(ATGCTCTAGAAGCTTAGTAGAAACAAGG)をその後のcDNAのPCR増幅に使用した。オリゴヌクレオチド5'13/Hind IIIの配列はビリオンRNAの5'末端の13の保存ヌクレオチドに対応し、Hind III部位を含む。PCR産物のHind III断片をpUC19中にサブクローン化し、標準的な方法により配列決定した(Sambrookら,1989,Molecular Cloning:A Laboratory Manual.Cold Spring Harbor Laboratory Press.Cold Spring Harbor,NY;Sangerら,1977,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74:5463-5467)。

#### 6.1.7 トランスフェクトCOS-7細胞中でのHAの発現

pSVK3中にクローン化されたHAcDNAの一時的な発現のために、COS-7細胞の亜集密単層にT7 RNAポリメラーゼを発現する組換え体ワクシニアウイルス(vTF7.3)(Feurstら,1986,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83:8122-8125)を5のmoiで1時間感染させた。10mgのプラスミドDNAを、リン酸カルシウム沈降法により60mm皿中にトランスフェクトした(Wiglerら,1979,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:3567-3570)。トランスフェクションの16時間後、細胞を3%パラホルムアルデヒドで固定し、間接免疫蛍光法により表面発現を測定した(Staehehlら,1986,Cell 65:147-158)。H1 HA特異的モノクローナル抗体2G9(Liら,1993,J.Virol.67:6659-6666)を第1抗体として使用し、ローダミン結合ヤギ抗マウス抗体(Boehringer-Mannheim)を第2抗体に使用した。

## 6.2. 結果

### 6.2.1 インフルエンザウイルスA/WSN/33ウイルスHAのカルボキシ末端突然変異体の設計

10

20

30

40

50

## と構築

オリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発をA/WSN/33 HAのcDNAコピーについて行い、カルボキシ末端をコードする領域に突然変異を導入した。位置C553、C560及びC563のシステイン残基がその他のHAサブタイプ中のHAのパルミチル化と関連付けられた (Naeve and Williams, 1990, *EMBO J.* 9:3857 - 3866; Naimら, 1992, *J. Virol.* 66:7585 - 7588; Steinhauerら, 1991, *Virology* 184:445 - 448; Vietら, 1991, *J. Virol.* 65:2491 - 2500)。これらの位置を最初にセリンまたはアラニンに変えこれらの突然変異体の生理学的効果を分析した (図2)。サブタイプH13のHAは位置558にシステインを含むが位置560には含まないので、突然変異体S558C/C560Sを構築した (図1)。これでこの突然変異体は位置560に代えて558に潜在的パルミチル化部位を有する。さらに、位置C560はフェニルアラニンまたはチロシンに変更した。C560をフェニルアラニンに変更するのは、この配列がHAのH13サブタイプ中に存在するからである (図1)。C560のチロシンにより単一の置換は、野生型タンパク質のものからは全く異なる表現型を有するタンパク質をもたらすことが以前に示されている (Brewerら, 1991, *J. Cell Biol.* 114:413 - 421; Lazarovits & Roth, 1988, *Cell* 53:743 - 752)。野生型HAは被覆ピットから排除されたのに対し、突然変異体HAタンパク質は効率的にインターナライズされ、さらに先端膜ではなく側底膜に輸送された。

### 6.2.2. 変異型ウイルスの回収

ここで記載する実験は、こうした変異型HAタンパク質を有するウイルスが、感染性のウイルス粒子を形成しうるかどうかを調べる目的で設計したものである。変異型HA遺伝子を回収するために、ヘルパーウイルスとしてHKWSN (H3N1) を使用して、リボ核タンパク質 (RNP) によるトランスフェクションを実施した (Enami and Palese, 1991, *J. virol.* 65:2711 - 2713)。図2に示すように、セリンあるいはアラニンへのC553の単一の変化をコードするRNAでトランスフェクションを行ったところ、ウイルスが単離され、HA中のこのシステインの位置は、生存可能なウイルスの形成にとって必須ではないことが示唆された。560の位置のシステインは、アラニン、チロシン、あるいはフェニルアラニンに変化させることができ、その場合でも生存可能なウイルスの回収が可能であった。しかし、この位置 (C560S) をセリンに変化させた場合には、トランスフェクションによって生存可能なウイルスが得られることはなかった。HAの主要部分の想定外の変異によって変異型のC560Sウイルスの回収が阻まれた可能性を除外するために、pC560Sの細胞質部分をコードする領域を、野生型の対応領域で置換した。このプラスミド (pC560S/wt) でトランスフェクションを行ったところ、トランスフェクションによって生じたインフルエンザウイルスが回収された。C563の位置をアラニンあるいはセリンに変化させた変異体も回収されなかった。pC563Sの細胞質部分コード領域を、対応野生型配列で置換した場合には、トランスフェクションによって生じたウイルスは回収され、563の位置のシステインが必須であることが示唆された。また、保存されたシステイン残基のうち2つないし3つをアラニンあるいはセリンで置換した変異体も回収されなかった。変異型のS558C/C560Sも回収されず、560の位置のセリンが構造上不適合性であることが示唆された。あるいは、558の位置に導入したシステインが、パルミテートの付加位置の役目を果たせない可能性もある。

いずれの場合も、変異型ウイルスが回収されない場合には、十分制御された条件下でRNPによるトランスフェクションを2回以上繰り返した。こうした実験では、日常的に、ウイルス上清1mlあたり約 $10^3$ の野生型トランスフェクタントが回収された。さらに、最も弱毒化された変異体 (C560A) は、常に回収された (下記参照)。また、いずれの変異型プラスミドについても、pT3WSN - HA/Hind III (野生型) を用いた場合と同様のRNAレベルが *in vitro* で得られることも示された。こうした結果から、実験条件下でウイルスが回収されないような変異は、HAの作用を阻んだり、甚だしく損なったりするものであることが示された。

### 6.2.3. トランスフェクトされた細胞中での変異型HAの発現

変異型構築物が、細胞表面に発現されるHAタンパク質をコードしていることを確認するために、HAcDNAを、発現ベクターであるpSVK3中にサブクローニングし、間接免疫蛍光法によって細胞表面での発現について調べた。生ウイルス中に回収されることのなかった変異

10

20

30

40

50

型HA遺伝子は、いずれも、細胞表面での発現状態が、野生型HAのものから区別不能であるようなタンパク質をコードしていた。図3に、野生型HA、ならびに変異型C560S、C563A、C560A/C563A、およびC553S/C560S/C563Sについて免疫蛍光法で調べた結果を示す。導入した変異は、変異型HAタンパク質の生合成や輸送に有意に影響せず、これまでに公表されている結果が確認された(Naeve & Williams, 1990, EMBO J.9:3857 - 3866; Naim et al., 1992, J. Virol. 66:7585 - 7588; Simpson & Lamb, 1992, J. Virol. 66:790 - 803; Steinhauer et al., 1991, Virology 184:445 - 448; Veit et al., 1991, J. Virol. 65:2491 - 2500)。

#### 6.2.4 トランスフェクトされたウイルスの生育特性

トランスフェクタントの生育特性を、MDBK細胞中で調べた(図4)。膜アンカリング領域中の保存されたシステインの変異は、ウイルスの生育にほとんど影響を及ぼさなかった。変異型のC553Aは野生型の対照と同様の挙動を示す一方、変異型ウイルスのC553Sはウイルス放出に関して再現性の遅延を示し、野生型ウイルスより5倍低い力価までの生育にとどまった(図4A)。しかし、変異型のC560Aは、野生型ウイルスより50倍低い力価までの生育にとどまった(図4A)。C-560の位置を別のアミノ酸に変化させた場合には、興味深い結果が得られた。変異型のC560Yでは、C560Aウイルスの場合と同様に弱毒化されたのに対し、変異型のC560Fの場合には、遅延こそ生じたものの、野生型ウイルスの力価に匹敵する最終力価に達した(図4B)。

#### 6.2.5 弱毒化変異体の継代による復帰突然変異体の生成

弱毒化変異型のC560Y及びC560Aの復帰突然変異ウイルスの選択を試みることによって、HAの細胞質尾部の560の位置において保存されているシステインの重要性を調べた。チロシンのコドン(TAC)をシステインのコドン(TGC)に変化させる際には、ヌクレオチド1つのみを変化させれば十分なのに対し、アラニン(GCC)をシステイン(TGC)に変化させる際には、ヌクレオチド2つの変化が必要となる。双方の変異体とも、単一の点突然変異によって560の位置を変化させることができ、システイン以外にも各種のアミノ酸が生じた。

変異型ウイルスであるC560Yの調製物は、MDBK細胞の75cm<sup>2</sup>の組織培養のフラスコに、単一のプラークから採取したウイルスを接種することによって生育させた。得られた力価が4x10<sup>6</sup>TCID<sub>50</sub>/mlの調製物は、約10<sup>4</sup>個の粒子を含んでおり、野生型の特徴を有するプラークを形成した。2つの独立したウイルス調製物の2つの大型のプラークから得たウイルスを、さらにプラーク精製して、配列決定に用いるウイルスRNAを調製した。4例のいずれの場合でも、チロシンは、システインへの復帰突然変異を生じていた。もともとのプラスミド構築物(pC560Y)が5'非コード領域に変異を有している(1739の位置、TからCへの変化)、これらのウイルスは、真正な復帰突然変異体であると特定することが可能である。また、個々の小型の拡散したC560Yのプラークから得たウイルスも、MDBK細胞(7代)、あるいは卵(8代)中で継代した。この場合も、システインへの復帰突然変異が生じており、このことは、配列決定によって確認した。

同様の実験を、変異型のC560Aを用いて行ったところ、弱毒化された表現型の復帰突然変異体も、変異型の配列の変化も観察されなかった。この結果は、アラニンからシステインへの復帰突然変異には、ヌクレオチド2つが同時に変化することが必要だという事実のためである可能性が最も高い。かろうじて弱毒化を示したC560FをMDBK細胞中で7代継代した場合も、この位置での配列の変化は生じなかった(配列を分析して確認)。

### 7. ウイルス形成に対するセルレニンの影響

以下の実施例は、パルミチル化を抑制することが公知の化合物であるセルレニンが、細胞培養中での感染性インフルエンザウイルスの産生を抑制することを例証するものである。しかし、セルレニンは多くの副作用を有する毒性の化合物であり、本発明では最良の医薬品として選択するものではない。

#### 7.1 材料および方法

##### 7.1.1 セルレニンのHA力価への影響

MDBK細胞を、野生型のインフルエンザウイルスで、MOIを1として感染させた。感染後6時間の時点で、各種濃度のセルレニンを培地に加えた(0 - 20 µg/ml)。HA力価を、感染

10

20

30

40

50

後12時間及び24時間の時点で調べた。

#### 7.1.2 セルレニンのウイルス形成への影響

MDBK細胞を、野生型のインフルエンザウイルスで、MOIを1として感染させた。感染後1時間の時点で、各種濃度のセルレニンを培地に加えた(0 - 10 µg/ml)。20時間の培養の後に、ウイルス力価を調べた(PFU/ml)。

#### 7.2 結果

##### 7.2.1 セルレニンのHA力価への影響

感染後12時間あるいは24時間の時点で、HAのレベルを、セルレニン不在の場合に観察されるレベルに対して定量したところ、セルレニンは、HAを濃度の関数として抑制することが可能であった(表I)。

10

表 I

### セルレニンのHA力価への影響

セルレニン* (µg/ml)	HA力価	
	<u>感染後12時間</u>	<u>感染後24時間</u>
0	7	7
2	7	7
10	3	4
20	0	0

20

\* セルレニンの細胞毒性は、8 µg/ml以上の濃度で観察された。

30

##### 7.2.2 セルレニンのウイルス形成への影響

セルレニンとともに20時間インキュベートした後にウイルスを回収したところ、インフルエンザウイルスの力価は、セルレニンの濃度の関数として減少していた(表II)。6 µg/mlを越える濃度では、ウイルスの力価は、セルレニン不在の場合に観察される力価に対して、対数で3 - 4の減少を示した。

表 I I

セルレニンのウイルス形成への影響

セルレニン ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	P f u力価 ( $\text{p f u}/\text{ml}$ )
0	$2 \times 10^7$
2	$\sim 10^7$
4	$\sim 10^7$
6	$2 \times 10^7$
8	$1 \times 10^4$
10	$2 \times 10^3$

10

本発明の範囲は、発明の個々の観点の一例を例示する目的で記載した特定の実施態様に限定されるものではなく、機能上均等な方法及び成分も、本発明の範囲に包含されるものである。実際、当業者であれば、以上の記載及び添付図面から、本明細書に示し、記載した実施態様以外にも、本発明の各種の変更を思いつくはずである。こうした変更も、添付した請求の範囲の範囲内に包含されるものである。

20

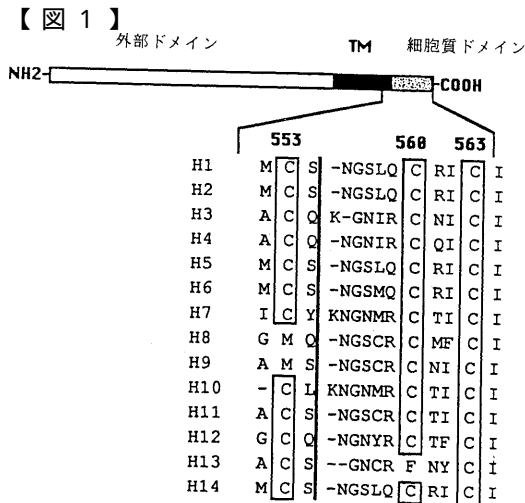


FIG. 1

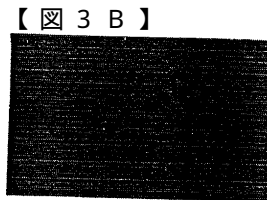


FIG.3B

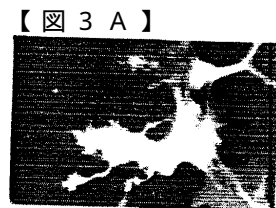


FIG.3A

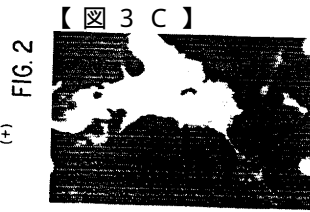
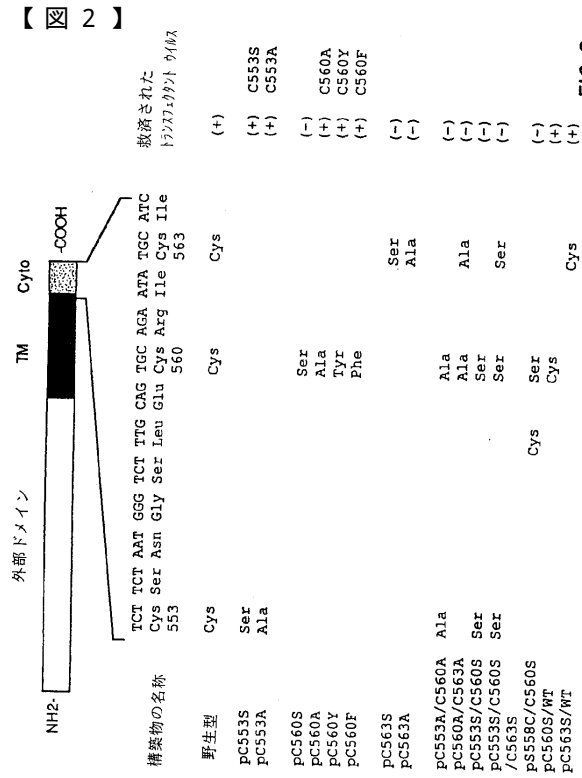


FIG.3C



FIG.3D

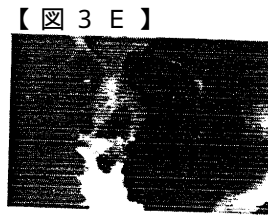


FIG.3E

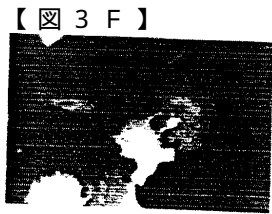


FIG.3F

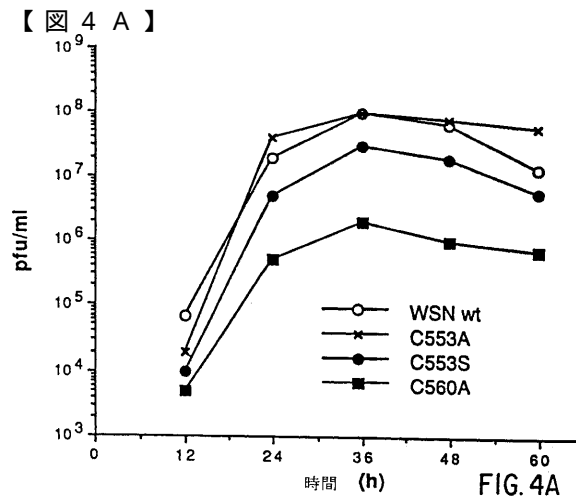


FIG.4A

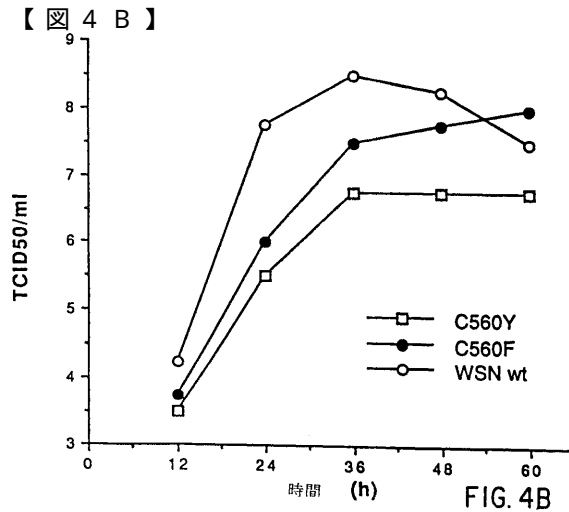


FIG.4B

---

フロントページの続き

(72)発明者 パリーズ, ピーター

アメリカ合衆国 07605 ニュージャージー州 レオニア, ハイウッド アヴェニュー 41  
4番地

審査官 阪野 誠司

(56)参考文献 The EMBO Journal, 1990年, Vol.9(12), pp.3857-66

Journal of Virology, 1992年, Vol.66, pp.790-803

Journal of Virology, 1992年, Vol.66(12), pp.7585-8

Journal of Virology, 1994年 9月, Vol.68(9), pp.5748-54

(58)調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>, DB名)

C12Q 1/48

C12N 15/09

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

PubMed

JICSTファイル(JOIS)

EUROPAT(QUESTEL)