

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成29年1月19日(2017.1.19)

【公開番号】特開2016-189772(P2016-189772A)

【公開日】平成28年11月10日(2016.11.10)

【年通号数】公開・登録公報2016-063

【出願番号】特願2016-53802(P2016-53802)

【国際特許分類】

C 1 2 N	9/16	(2006.01)
C 0 7 K	14/11	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 Q	1/34	(2006.01)
C 0 7 K	16/10	(2006.01)
G 0 1 N	23/207	(2006.01)
A 6 1 K	39/395	(2006.01)
A 6 1 P	31/16	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	9/16	Z N A C
C 0 7 K	14/11	
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	
C 1 2 Q	1/34	
C 0 7 K	16/10	
G 0 1 N	23/207	
A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	39/395	P
A 6 1 K	39/395	S
A 6 1 P	31/16	
C 1 2 N	15/00	A

【手続補正書】

【提出日】平成28年11月29日(2016.11.29)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

エンドヌクレアーゼ活性を有するウイルスRNA依存性RNAポリメラーゼのPAサブユニットのアミノ末端断片を含むポリペプチド断片であって、前記PAサブユニットが、配列番号2に示されるインフルエンザA2009パンデミックH1N1ウイルス由来のものであり、N末端が、配列番号2に示されるPAサブユニットのアミノ酸配列の1位のア

ミノ酸と同一若しくはこれに対応するものであり、且つ、C末端が、配列番号2に示されるP Aサブユニットのアミノ酸配列の190位～198位から選択される位置のアミノ酸と同一若しくはこれに対応するポリペプチド断片、又は前記ポリペプチド断片の変異体であり、前記変異体は、配列番号2に記載のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性があり、配列番号2に示されるアミノ酸位置186又はそれに対応するアミノ酸位置にアミノ酸セリンを含み、エンドヌクレアーゼ活性を保持している、ポリペプチド断片。

**【請求項2】**

可溶性及び／又は結晶化可能なポリペプチド断片である、請求項1に記載のポリペプチド断片。

**【請求項3】**

ポリペプチド断片は2つの二価の陽イオンが結合するものである、請求項1又は2に記載のポリペプチド断片。

**【請求項4】**

二価の陽イオンがマンガン及び／又はマグネシウムである、請求項3に記載のポリペプチド断片。

**【請求項5】**

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列のアミノ酸1～198からなるポリペプチド断片からなり、(i) 図1に示される構造座標、(ii) 図2に示される構造座標、(iii) 図3に示される構造座標、(iv) 図4に示される構造座標、若しくは(v) 図5に示される構造座標によって規定される構造を有するか、又は

(b) 配列番号2に示されるアミノ酸配列のアミノ酸1～198のうち配列番号2に示されるアミノ酸配列のアミノ酸52～64がアミノ酸グリシンによって置き換えられているアミノ酸配列からなるポリペプチド断片からなり、(vi) 図15に示される構造座標、若しくは(vii) 図16に示される構造座標によって規定される構造を有する、請求項1～4のいずれか一項に記載のポリペプチド断片。

**【請求項6】**

アミノ酸配列M G S G M A (配列番号3)からなるアミノ末端リンカーを更に含む、請求項5に記載のポリペプチド断片。

**【請求項7】**

(i) によって規定される構造を有するポリペプチド断片が、空間群C2及びa = 26.36 nm ± 0.5 nm、b = 6.62 nm ± 0.3 nm、c = 6.63 nm ± 0.3 nm、= 90度、= 96度 ± 2度、= 90度の単位格子寸法を有する

(ii)～(v) によって規定される構造を有するポリペプチド断片が、空間群P212121及びa = 5.46 nm ± 0.3 nm、b = 12.25 nm ± 0.4 nm、c = 13.0 nm ± 0.3 nm、= 90度、= 90度、= 90度の単位格子寸法を有する結晶形態を有し、(vi) によって規定される構造を有するポリペプチド断片が、空間群P6222及びa = 7.50 nm ± 0.3 nm、b = 7.50 nm ± 0.3 nm、c = 12.00 nm ± 0.5 nm、= 90度、= 90度、= 120度の単位格子寸法を有する結晶形態を有し、又は

(vii) によって規定される構造を有する該ポリペプチド断片が、空間群P6422及びa = 9.99 nm ± 0.5 nm、b = 9.99 nm ± 0.5 nm、c = 8.27 nm ± 0.3 nm、= 90度、= 90度、= 120度の単位格子寸法を有する結晶形態を有する、請求項4に記載のポリペプチド断片。

**【請求項8】**

結晶が、2.6以上分解能までX線を回折する、請求項7に記載のポリペプチド断片。

**【請求項9】**

結晶が、2.1以上、若しくは1.9以上分解能までX線を回折する、請求項8に記載のポリペプチド断片。

**【請求項 10】**

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の単離ポリペプチド断片をコードする単離ポリヌクレオチド。

**【請求項 11】**

請求項 10 に記載の単離ポリヌクレオチドを含む組換えベクター。

**【請求項 12】**

請求項 10 に記載の単離ポリヌクレオチド又は請求項 11 に記載の組換えベクターを含む組換え宿主細胞。

**【請求項 13】**

インフルエンザ A 2009 パンデミック H1N1 ウィルス由来の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの PA サブユニット又はその変異体のエンドヌクレアーゼ活性を調節する化合物を同定する方法であって、

(a) (i) 図 1 に示される請求項 5 に記載のポリペプチド断片の構造座標、(ii) 図 2 に示される請求項 5 に記載のポリペプチド断片の構造座標、(iii) 図 3 に示される請求項 5 に記載のポリペプチド断片の構造座標、(iv) 図 4 に示される請求項 5 に記載のポリペプチド断片の構造座標、(v) 図 5 に示される請求項 5 に記載のポリペプチド断片の構造座標、又は(vi) 図 15 に示される請求項 5 に記載のポリペプチド断片の構造座標によつて規定される活性部位のコンピュータモデルを構築する工程、

(b) 下記 (i) ~ (iii) から選択される、有望な活性調節化合物を選択又は設計する工程：

(i) 三次元コンピュータモデルの目視検査により前記活性部位とドッキングする分子断片又は前記化合物を選択すること、

(ii) 小分子に関するデータベースから前記活性部位に結合することができる化合物を選択すること、及び

(iii) de novo リガンド設計法により前記化合物を設計すること、

(c) 計算手段を利用する工程であつて、活性部位における前記化合物のエネルギーを最小化した立体配置を提供するために、前記化合物と前記活性部位とのコンピュータモデル間のフィッティングプログラム操作を行う、計算手段を利用する工程、並びに

(d) 前記フィッティング操作の結果を評価する工程であつて、前記化合物と活性部位モデルとの間の会合を定量化することによつて前記活性部位と会合する前記化合物の能力を評価する、結果を評価する工程、

を含む、化合物を同定する方法。

**【請求項 14】**

活性部位が、配列番号 2 に示される PA サブユニットのアミノ酸配列のアミノ酸 G1u80、G1u119、Asp108、Ile120 及び His41、又はそれに対応するアミノ酸を含む、請求項 13 に記載の方法。

**【請求項 15】**

活性部位が、配列番号 2 に示される PA サブユニットのアミノ酸配列のアミノ酸 Lys34、Tyr24、Arg84、Phe105、Tyr130、Ile38 及び Arg124、又はそれに対応するアミノ酸を更に含む、請求項 14 に記載の方法。

**【請求項 16】**

活性部位が、配列番号 2 に示される PA サブユニットのアミノ酸配列のアミノ酸 G1u26、Lys134、Leu106 及び Lys137、又はそれに対応するアミノ酸を更に含む、請求項 15 に記載の方法。

**【請求項 17】**

活性部位が、図 1 ~ 図 5 に示される PA サブユニット(配列番号 2)のアミノ酸 G1u80、G1u119、Asp108、Ile120 及び His41 の構造座標によつて規定される、又は図 15 若しくは図 16 に示される配列番号 2 のアミノ酸 G1u80、G1u119、Asp108、Ile120 及び His41 にそれぞれ対応する PA サブユニット

ットのアミノ酸 G l u、 G l u、 A s p、 I l e 及び H i s の構造座標によって規定される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 8】

活性部位が、図 1 ~ 図 5 に示される P A サブユニット(配列番号 2 )のアミノ酸 L y s 3 4 、 T y r 2 4 、 A r g 8 4 、 P h e 1 0 5 、 T y r 1 3 0 、 I l e 3 8 及び A r g 1 2 4 の構造座標によって規定される、又は図 1 5 若しくは図 1 6 に示される配列番号 2 のアミノ酸 L y s 3 4 、 T y r 2 4 、 A r g 8 4 、 P h e 1 0 5 、 T y r 1 3 0 、 I l e 3 8 及び A r g 1 2 4 にそれぞれ対応する P A サブユニットのアミノ酸 L y s 、 T y r 、 A r g 、 P h e 、 T y r 、 I l e 及び A r g の構造座標によって更に規定される、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

活性部位が、図 1 ~ 図 5 に示される P A サブユニット(配列番号 2 )のアミノ酸 G l u 2 6 、 L y s 1 3 4 、 L e u 1 0 6 及び L y s 1 3 7 の構造座標によって規定される、又は図 1 5 若しくは図 1 6 に示される配列番号 2 のアミノ酸 G l u 2 6 、 L y s 1 3 4 、 L e u 1 0 6 及び L y s 1 3 7 にそれぞれ対応する P A サブユニットのアミノ酸 G l u 、 L y s 、 L e u 及び L y s の構造座標によって更に規定される、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

( a ) 請求項 1 3 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の方法により化合物を同定する工程、及び  
( b ) 前記化合物を合成する工程、又は前記化合物を合成し、1 つ若しくは複数の薬学的に許容可能な添加物及び / 若しくは担体とともに前記化合物若しくはその薬学的に許容可能な塩を配合する工程、  
を含む組成物を生産する方法。

【請求項 2 1】

( c ) 化合物と請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド断片若しくはその変異体又は請求項 1 2 に記載の組換え宿主細胞とを接触させ、 P A サブユニットポリペプチド断片若しくはその変異体のエンドヌクレアーゼ活性を調節する前記化合物の能力を決定する工程、を更に含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

インフルエンザ A 2 0 0 9 パンデミック H 1 N 1 ウイルス由来の R N A 依存性 R N A ポリメラーゼの P A サブユニット又はその変異体のエンドヌクレアーゼ活性を調節する化合物を同定する方法であって、

( i ) 請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド断片若しくはその変異体又は請求項 1 2 に記載の組換え宿主細胞を試験化合物と接触させる工程、及び

( i i ) 前記 P A サブユニットポリペプチド断片又はその変異体のエンドヌクレアーゼ活性を調節する前記試験化合物の能力を分析する工程、  
を含む、化合物を同定する方法。

【請求項 2 3】

P A サブユニットポリペプチド断片又はその変異体のエンドヌクレアーゼ活性を阻害する試験化合物の能力を分析する、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

ハイスループット設定において行う、請求項 2 2 又は 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

試験化合物が小分子及び / 又はペプチド若しくはタンパク質である、請求項 2 2 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

1 つ又は複数の薬学的に許容可能な添加物及び / 又は担体とともに化合物又はその薬学的に許容可能な塩を配合する工程を更に含む、請求項 2 2 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の P A サブユニットポリペプチド断片又はその変異

体のエンドヌクレアーゼ活性を調節することができ、又はこれを阻害することができる化合物。

**【請求項 28】**

請求項 13～19のいずれか一項に記載の方法によって同定可能である又は請求項 20 又は 26 に記載の方法によって製造可能である、請求項 27 に記載の化合物。

**【請求項 29】**

請求項 27 若しくは 28 に記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩と、1つ又は複数の薬学的に許容可能な添加物及び／又は担体とを含む、薬学的組成物。

**【請求項 30】**

請求項 20～26のいずれか一項に記載の方法によって製造可能である、請求項 29 に記載の薬学的組成物。

**【請求項 31】**

配列番号 2 に示されるインフルエンザ A 2009 パンデミック H1N1 ウィルスの PA サブユニット又はその変異体の活性部位を認識する抗体であって、前記変異体は、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 95% の配列同一性があり、配列番号 2 に示されるアミノ酸位置 186 に又はそれに対応するアミノ酸位置にアミノ酸セリンを含むものである、抗体。

**【請求項 32】**

抗体が、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の 5 個～15 個のアミノ酸の長さのポリペプチド断片を認識し、該ポリペプチド断片が、Lys 34、Glu 26、Ile 38、Tyr 24、His 41、Glu 80、Arg 84、Leu 106、Asp 108、Glu 119、Ile 120、Tyr 130、Lys 134、Phe 105、Lys 137 及び Arg 124 からなる群から選択される 1 つ又は複数のアミノ酸残基を含む、請求項 31 に記載の抗体。

**【請求項 33】**

オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科及び／若しくはアレナウイルス科のウイルスによるウイルス感染によって引き起こされ、又はインフルエンザ A 2009 パンデミック H1N1 ウィルスによるウイルス感染によって引き起こされる疾患状態を治療、改善又は予防する薬物の生産のための、請求項 27 若しくは 28 に記載の化合物、請求項 29 若しくは 30 に記載の薬学的組成物、又は請求項 31 若しくは 32 に記載の抗体の使用。

**【請求項 34】**

インフルエンザ A 2009 パンデミック H1N1 ウィルスによるウイルス感染によって引き起こされる疾患状態を治療、改善又は予防する薬物の生産のための、4-[3-[ (4-クロロフェニル)メチル]-1-(フェニルメチル)-3-ピペリジニル]-2-ヒドロキシ-4-オキソ-2-ブテン酸 (EMBL-R05-3)、4-[4-[ (4-クロロフェニル)メチル]-1-(シクロヘキシルメチル)-4-ピペリジニル]-2-ヒドロキシ-4-オキソ-2-ブテン酸 (EMBL-R05-2)、4-[3-[ (4-クロロフェニル)メチル]-1-(フェニルメチルスルホ)-3-ピペリジニル]-2-ヒドロキシ-4-オキソ-2-ブテン酸 (EMBL-R05-1) 又は [(2R,3R)-5,7-ジヒドロキシ-2-(3,4,5-トリヒドロキシフェニル)クロマン-3-イル]3,4,5-トリヒドロキシベンゾエート (EGCG) の使用。

**【請求項 35】**

オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科及び／若しくはアレナウイルス科のウイルスによるウイルス感染によって引き起こされ、又はインフルエンザ A 2009 パンデミック H1N1 ウィルスによるウイルス感染によって引き起こされる疾患状態を治療、改善又は予防するための、請求項 27 若しくは 28 に記載の化合物、請求項 29 若しくは 30 に記載の薬学的組成物、又は請求項 31 若しくは 32 に記載の抗体。

**【請求項 36】**

インフルエンザ A 2009 パンデミック H1N1 ウィルスによるウイルス感染によって引き起こされる疾患状態を治療、改善又は予防するための、4-[3-[ (4-クロロフ

エニル)メチル] - 1 - (フェニルメチル) - 3 - ピペリジニル] - 2 - ヒドロキシ - 4 - オキソ - 2 - プテン酸 ( E M B L - R 0 5 - 3 ) 、 4 - [ 4 - [ ( 4 - クロロフェニル ) メチル] - 1 - ( シクロヘキシルメチル ) - 4 - ピペリジニル] - 2 - ヒドロキシ - 4 - オキソ - 2 - プテン酸 ( E M B L - R 0 5 - 2 ) 、 4 - [ 3 - [ ( 4 - クロロフェニル ) メチル] - 1 - ( フェニルメチルスルホ ) - 3 - ピペリジニル] - 2 - ヒドロキシ - 4 - オキソ - 2 - プテン酸 ( E M B L - R 0 5 - 1 ) 又は [ ( 2 R , 3 R ) - 5 , 7 - ジヒドロキシ - 2 - ( 3 , 4 , 5 - トリヒドロキシフェニル ) クロマン - 3 - イル ] 3 , 4 , 5 - トリヒドロキシベンゾエート ( E G C G ) 。