

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4764881号
(P4764881)

(45) 発行日 平成23年9月7日(2011.9.7)

(24) 登録日 平成23年6月17日(2011.6.17)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 9/24 (2006.01)

C 1 2 N 9/24

C O 7 K 19/00 (2006.01)

C O 7 K 19/00

C O 7 K 14/47 (2006.01)

C O 7 K 14/47

A 6 1 K 38/43 (2006.01)

A 6 1 K 37/48

請求項の数 22 (全 76 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-531167 (P2007-531167)
 (86) (22) 出願日 平成17年7月21日(2005.7.21)
 (65) 公表番号 特表2008-512117 (P2008-512117A)
 (43) 公表日 平成20年4月24日(2008.4.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/025831
 (87) 国際公開番号 W02006/031291
 (87) 国際公開日 平成18年3月23日(2006.3.23)
 審査請求日 平成20年7月17日(2008.7.17)
 (31) 優先権主張番号 10/939,262
 (32) 優先日 平成16年9月10日(2004.9.10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 505171986
 ファン, ファン
 アメリカ合衆国 カルフォルニア州 92
 130, サンディエゴ, コルテブレノペラ
 ーノ 11124
 (73) 特許権者 507075440
 マラーホフ, マイケル
 MALAKHOV, Michael
 アメリカ合衆国 カルフォルニア州 92
 130, サンディエゴ, カミノラバー 1
 1530
 (74) 代理人 100096024
 弁理士 柏原 三枝子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規の治療タンパク質ベースの分子クラス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 12 の 274 - 666 のアミノ酸からなる第1アミノ酸配列、及び、K R K K K G G K N G K N R R N R K K K N P のアミノ酸配列からなる第2アミノ酸配列を含む単離融合タンパク質において、前記第1アミノ酸配列の C 末端のアミノ酸が、前記第2アミノ酸配列の N 末端に融合されていることを特徴とする融合タンパク質。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の融合タンパク質において、前記融合タンパク質が配列番号 21 のアミノ酸配列からなることを特徴とする融合タンパク質。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むことを特徴とする単離核酸分子。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の核酸分子を含むことを特徴する発現ベクター。

【請求項 5】

インフルエンザ又はパラインフルエンザによるウイルス感染の防止又は治療用の薬剤の製造のための請求項 1 に記載の融合タンパク質の使用。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の使用において、前記薬剤が吸入用であることを特徴する使用。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の融合タンパク質を含むことを特徴とする医薬組成物。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の医薬組成物において、前記医薬組成物が噴霧薬として処方されることを特徴する医薬組成物。

【請求項 9】

請求項 7 に記載の医薬組成物において、前記医薬組成物が吸入薬として処方されることを特徴する医薬組成物。

【請求項 10】

請求項 7 に記載の医薬組成物において、前記医薬組成物が点眼液として処方されることを特徴する医薬組成物。

10

【請求項 11】

請求項 7 に記載の医薬組成物において、前記医薬組成物がクリーム、蠟膏、ゲル、又は軟膏として処方されることを特徴する医薬組成物。

【請求項 12】

インフルエンザ又はパラインフルエンザによるウイルス感染の防止又は治療用の薬剤の製造への請求項 7 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の使用において、前記薬剤が吸入用であることを特徴する使用。

【請求項 14】

請求項 5 又は 12 に記載の使用において、前記薬剤が送達系内に存在することを特徴とする使用。

20

【請求項 15】

請求項 14 に記載の使用において、前記送達系が吸入器であることを特徴とする使用。

【請求項 16】

請求項 14 に記載の使用において、前記送達系が鼻内噴霧器であることを特徴とする使用。

【請求項 17】

請求項 14 に記載の使用において、前記送達系が噴霧器又は霧吹きであることを特徴とする使用。

【請求項 18】

30

請求項 14 に記載の使用において、前記送達系がドロPPERボトルであることを特徴とする使用。

【請求項 19】

請求項 5 に記載の使用において、前記薬剤がインフルエンザによるウイルス感染の防止又は治療用であることを特徴とする使用。

【請求項 20】

請求項 5 に記載の使用において、前記薬剤がパラインフルエンザによるウイルス感染の防止又は治療用であることを特徴とする使用。

【請求項 21】

請求項 12 に記載の使用において、前記薬剤がインフルエンザによるウイルス感染の防止又は治療用であることを特徴とする使用。

40

【請求項 22】

請求項 12 に記載の使用において、前記薬剤がインフルエンザ又はパラインフルエンザによるウイルス感染の防止又は治療用であることを特徴とする使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、発明の名称が「新規の治療タンパク質ベースの分子クラス (Novel Class of Therapeutic Protein Based Molecu

50

les)」である、2004年9月10日出願の米国特許出願番号10/939,262号(その全体が本明細書中で参考として援用される)の優先権の利益を主張する。

【0002】

本発明はまた、以下の特許出願のその全体を参考として援用する：発明の名称が「広範囲の抗ウイルス治療薬及び予防薬(Broad spectrum anti-viral therapeutics and prophylaxis)」である、2003年11月21日出願の米国特許出願番号10/718,986号、発明の名称が「広範囲の抗ウイルス治療薬及び予防薬(Broad spectrum anti-viral therapeutics and prophylaxis)」である、2002年11月22日出願の米国特許出願番号60/428,535号、発明の名称が「広範な抗ウイルスタンパク質クラス(Class of broad spectrum anti-viral protein)」である、2003年4月19日出願の米国特許出願番号60/464,217号、発明の名称が「抗菌治療薬及び予防薬(Anti-microbial therapeutics and prophylaxis)」である、2004年4月13日出願の米国特許出願番号60/561,749号、発明の名称が「広範囲の抗菌薬クラス(Class of broad spectrum anti-microbial agents)」である、2004年6月16日出願の米国特許出願番号60/580,084号。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

本発明は、ヒト及び動物被験体の病原体による感染を予防及び治療するために使用することができる治療組成物、具体的には、ウイルス感染及び細菌感染の防止及び治療のために使用することができるタンパク質ベースの治療組成物に関する。本発明はまた、アレルギー反応及び炎症反応を防止又は改善するために使用することができるタンパク質ベースの組成物に関する。本発明はまた、遺伝子治療のために使用される組換えウイルス等の組換えウイルスの形質導入効率を増加させるためのタンパク質ベースの組成物に関する。

【0004】

インフルエンザは、古代より人類を苦しめてきた感染性の強い急性呼吸器疾患である。インフルエンザは、毎年再発し、周期的な広範囲にわたる世界的規模の流行病であることを特徴とする。この疾患による罹患率及び死亡率が高いので、インフルエンザの直接的、及び間接的な社会経済的影響は甚大である。米国だけでも、この流行病により、毎年約300,000人が入院し、約25,000人が死亡している。この1世紀で4回流行し、合わせて1000万人が死亡している。以前の流行に基づく数学モデルでは、次の流行で89,000人~207,000人が死亡し、1800万人~4200万人が通院し、2000万人~4700万人が罹患すると見積もられている(Meltzer, MI, Cox, NJ and Fukuda, K. (1999) Emerg Infect Dis 5:659-671)。

【0005】

インフルエンザは、典型的には、2つのウイルス型(インフルエンザウイルスA型及びインフルエンザウイルスB型)の感染に起因する(第3の型であるインフルエンザウイルスC型は、少数の一般的な風邪様症状のみを引き起こす)。これらは、RNAウイルスのオルトミクソウイルス科に属する。A型及びB型は共に、宿主細胞に由来する脂質エンベロープ中に封入された8つのセグメント化マイナス鎖RNAゲノムを有する。ウイルスエンベロープは、以下の3つのタンパク質型から構成されるスパイクで覆われている：宿主細胞受容体にウイルスを付着させてウイルスと細胞膜との融合を媒介する血球凝集素(HA)；宿主細胞からの新規のウイルスの放出を促進するノイラミニダーゼ(NA)；及びイオンチャネルとしての機能を果たす少数のM2タンパク質。

【0006】

インフルエンザA型ウイルス及びB型ウイルスの感染は、典型的には、上気道の粘膜面

で開始される。ウイルスの複製は、主に上気道に限定されるが、下気道に拡大して気管支肺炎を引き起こして死に至り得る。

【0007】

インフルエンザウイルスタンパク質である血球凝集素(HA)は、主要なウイルスエンベロープタンパク質である。これは、ウイルス感染で不可欠な役割を果たす。HAの重要性は、宿主免疫応答によって産生される防御中和抗体の主な標的であるという事実によって証明されている(Hayden, F.G. (1996) In Antiviral drug resistance (ed. D.D. Richman), pp. 59-77. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd.)。現在、HAがウイルス感染において2つの異なる機能を有することが明らかである。第1に、HAは、シアル酸細胞受容体へのウイルスの付着を担う。第2に、HAは、ウイルスエンベロープと細胞膜との融合を誘発することによって標的細胞へのウイルスの侵入を媒介する。

10

【0008】

HAは、前駆体タンパク質HA0として合成され、三量体分子複合体としてゴルジ装置によって細胞表面に輸送される。HA0は、更に切断されて、C末端のHA1(HA0の残基328)及びN末端のHA2が生成される。一般に、細胞表面又は放出されるウイルス上で切断されると考えられる。HA0のHA1/HA2への切断はシアル酸受容体へのHA結合に必要な。しかし、ウイルス感染に必要であると考えられている(Klenk, H.D. and Rott, R. (1988) Adv Vir Res. 34: 247-281; Kido, H., Niwa, Y., Beppu, Y. and Towatari, T. (1996) Advan Enzyme Regul 36: 325-347; Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (2000) Annu Rev Biochem 69: 531-569; Zambon, M. (2001) J Rev Med Virol 11: 227-241.)。

20

【0009】

現在、インフルエンザは、ワクチン接種及び抗ウイルス化合物によって制御されている。不活化インフルエンザワクチンは、現在、世界中で使用されており、特に、高リスク群に使用されている。ワクチンウイルスを、ニワトリ受精卵中で成長させ、化学的手段によって不活化し、精製する。このワクチンは、通常、3価であり、代表的なインフルエンザAウイルス(H1N1及びH3N1)及びインフルエンザB株を含む。このワクチン株は、効力を維持するために定期的に更新する必要がある、この更新は、世界保健機関(WHO)で実施されている。通常、流行するまでに、更新されたインフルエンザワクチンを用意するのに8ヶ月かかる(Wood, J. (2001) Phil Trans R Soc Lond B 356: 1953-1960)。しかし、歴史的に、流行病は6ヶ月以内にほとんどの大陸に拡大し、海外旅行の増加と共に流行病の拡大は更に加速すると予想される(Gust, I.D., Hampson, A.W., and Lavanchy, D. (2001) Rev Med Virol 11: 59-70)。従って、将来的に起こる流行の初期に有効なワクチンを利用できないか供給量が非常に少なくなることは避けられない。

30

【0010】

抗ウイルス化合物は、汎流行間期の治療の要となっている。現在、これらは、ワクチンを利用できない初期の流行病の制御のための唯一の潜在的な代替法である。以下の2つのクラスの抗ウイルス化合物が現在販売されている: M2インヒビター(アマンタジン及びリマンタジン)及びNAインヒビター(オセルタミビル(タミフル)及びザナミビル(リレンザ))。両分子クラスは、インフルエンザの防止及び治療の有効性が証明されている。しかし、副作用及び薬物耐性菌が生成されるリスクが、依然として化学予防薬としての広範な使用における2つの主な懸念である(Hayden, F.G. (1996) In Antiviral drug resistance (ed. D.D. Richman), pp. 59-77. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd.)。最も重要なことは、更なる流行病株(生物兵器の遺伝子操作によって天然に

40

50

、又は人為的に作製された株)は、全ての利用可能な抗ウイルス化合物に耐性を示す可能性があり、これが世界的に破滅的な結果をもたらす。

【0011】

要約すれば、現在利用可能なワクチン接種及び抗ウイルス化合物は、いくつかの基本的な欠点によって制限されている。更なるインフルエンザ流行病に取り組むための新規の治療及び予防様式が必要である。

【0012】

呼吸器感染症(RTI)は、最も一般的且つ潜在的に最も重篤なインフルエンザ疾患型である。臨床的に、RTIには、副鼻腔炎、耳炎、喉頭炎、気管支炎、及び肺炎が含まれる。多数の病因学及び疫学的研究に基づいて、多数の微生物がRTIを引き起こす可能性があり、有害な病原体のみが大部分の症例に関与することが明らかである。このような病原体には、肺炎球菌(*S. pneumoniae*)、肺炎マイコプラズマ、ヘモフィルスインフルエンザ菌、カタル球菌、インフルエンザA型及びB型、並びにパラインフルエンザウイルスが含まれる。CAP及びAECBを引き起こすことに加えて、いくつかの細菌病原体(肺炎球菌(*S. pneumoniae*)及びヘモフィルスインフルエンザ菌等)は、急性副鼻腔炎、中耳炎、並びに敗血症及び髄膜炎等を引き起こす侵襲性感染症の一般的な原因でもある。従って、これらの微生物は、臨床的に最も重要である。

【0013】

全ての呼吸器病原菌の1つの共通の特徴は、これらが上気道の粘膜表面上に共生コロニーを形成することであり、このようなコロニー形成が進行して感染し、これが感染の必要条件である。新生児における細菌コロニー形成は、出生直後に起こる。一生涯、上気道(具体的には、鼻咽頭及び中咽頭)は、継続的にバクテリアが捕捉され、排除され、再捕捉される微生物種の動的な生態的貯蔵所であり続ける。ほとんどの場合、咽頭中の細菌叢は無害である。しかし、宿主の条件が変化した場合、いくつかの微生物が隣接組織又は血流に侵入して疾患を引き起こし得る。細菌及びウイルスの両方による粘膜感染及び侵襲性感染症の侵入口として作用するのに加えて、鼻咽頭は、個体間の病原微生物の主な拡散源及び抗生物質耐性菌が選択される貯蔵所でもある(Garcia-Rodriguez and Martinez, *J Antimicrob Chemother*, (2002) 50 (Suppl S2), 59-73; Soriano and Rodriguez-Cerrato, *J Antimicrob Chemother*, (2002) 50 (Suppl S2), 51-58)。RTIの傾向のある個体が病原菌の持続的及び再発性のキャリアになる傾向があることが臨床的に十分に確立されている(Garcia-Rodriguez and Martinez, *J Antimicrob Chemother*, (2002) 50 (Suppl S2), 59-73; Mbaki et al., *Tohoku J Exp. Med.*, (1987) 153 (2), 111-121)。

【0014】

ピロリ菌は、胃炎及び消化性潰瘍に関与するヒト病原体である。この細菌は、ヒトの胃に存在し、胃前庭部の上皮細胞に結合する。細菌付着がピロリ菌アドヘシンI及びIIの上皮表面上のシアル酸への結合によって媒介されることが証明されている。

【0015】

シグレク(siglec)(シアル酸結合Ig様レクチン)は、シアル酸に結合し、主に造血系細胞によって発現される免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーのメンバーである。少なくとも11種のシグレクが発見されており、これらは、リガンドとして細胞表面シアル酸を排他的に認識するようである。シグレクのシアル酸への結合が細胞-細胞接着及び相互作用を媒介すると考えられている(Crocker and Varki, *Trends Immunol.*, (2001) 22 (6), 337-342; Angata and Brinkman-Van der Linden, *Biochim. Biophys. Acta*, (2002) 1572 (2-3), 294-316)。シグレク8(SAF-2)は、アレルギー状態(アレルギー性鼻炎、喘息、及び湿疹が含まれる

10

20

30

40

50

）における中心的エフェクターである好中球、好塩基球、及び肥満細胞の表面に高度に限定される接着分子である。シグレク 8 は、3 つのアレルギー細胞型の気道、肺、及び他のアレルギー部位への動員の媒介を担うと見なされる。シグレク 1（唾液腺接着（sialoadhesion））及びシグレク 2（CD22）は、マクロファージ及び B 細胞の接着分子であり、両細胞型は、炎症を引き起こす免疫反応の中心的役割を果たす。

【0016】

組換えウイルス、特に、アデノ随伴ウイルス（AAV）を使用して、野生型嚢胞性線維症膜通過伝導制御因子（CFTR）遺伝子を上皮細胞に導入し、嚢胞性線維症を引き起こす遺伝的欠損を修正することができる（Flotte and Carter, Methods Enzymol., (1998) 292, 717-732）。AAV ベクターを使用した臨床試験により、低レベルの遺伝子導入で CFTR 遺伝子を上皮細胞に有効且つ安全に送達されることが示された（Wagner et al., Lancet, (1998) 351 (9117), 1702-1703）。アデノウイルスベクターと比較して、AAV はより安定に遺伝子を発現し、細胞性免疫が減少する。しかし、in vivo での AAV の形質導入効率は、肺でむしろ低い（Wagner et al., Lancet, (1998) 351 (9117), 1702-1703）。嚢胞性線維症の遺伝子治療で完全に治療できるようにするために、in vivo での AAV の形質導入効率を改善することができる方法が必要である。負電荷の炭水化物（シアル酸等）が十分に分化した気道上皮への AAV ベクターの形質導入効率を抑制し、グリコシダーゼ（ノイラミニダーゼが含まれる）及びエンドグリコシダーゼ H による気道上皮の治療によって AAV ベクターの形質導入効率が増強されることが示されている（Bals et al., J Virol., (1999) 73 (7), 6085-6088）。

【発明の開示】

【0017】

発明の要旨

本発明は、病原体による感染の防止及び治療のための現在の治療法が適宜得た様式で提供することがしばしば困難であり、望ましくない副作用を引き起こし、薬物耐性病原体株が生じ得ることを認識する。本発明はまた、現在のアレルギー及び炎症を治療するためのアプローチの有効性が制限されており、副作用に関連することを認識する。更に、本発明はまた、現在の組換えウイルスを投与するアプローチの形質導入効率が低く、遺伝子治療の有効性が不満足なものであることを認識する。

【0018】

本発明は、病原体感染の防止及び治療のための新規の組成物及び方法を提供する。特に、本発明は、病原体による細胞感染を防止するように細胞外で作用することができる化合物を提供する。本発明のいくつかの好ましい実施形態は、標的細胞の表面に化合物をアンカーするアンカードメイン（anchoring domain）及びウイルス又は細菌等の病原体による標的細胞の感染を防止するように細胞外で作用することができる治療ドメインを有する治療化合物である。

【0019】

1 つの態様では、本発明は、病原体による感染を防止又は治療するためのタンパク質ベースの組成物を提供する。組成物は、ペプチド又はタンパク質を含む少なくとも 1 つの治療ドメインを含む化合物を含み、治療ドメインは、病原体による標的細胞の感染を防止することができる少なくとも 1 つの細胞外活性及び標的細胞の膜又は膜付近に結合することができる少なくとも 1 つのアンカードメインを有する。

【0020】

本発明のこの態様のいくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの治療ドメインは、病原体による標的細胞の感染を防止又は妨害する阻害活性を含む。好ましい実施形態では、阻害活性は、標的細胞の感染に必要なウイルスタンパク質を処理することができるプロテアーゼ活性を阻害する。特に好ましい実施形態では、化合物は、インフルエンザウイルスの HA ドメインの処理を阻害することができる治療ドメインを含み、アンカードメインは気

道上皮細胞の表面で化合物を結合することができる。

【 0 0 2 1 】

本発明のいくつかの実施形態では、少なくとも1つの治療ドメインは、触媒活性を含む。好ましい実施形態では、触媒活性は、標的細胞の感染に必要な標的細胞表面由来の部分を除去する。特に好ましい実施形態では、治療ドメインは、上皮標的細胞表面上のシアル酸部分を消化することができるシアリダーゼであり、アンカードメインは、上皮細胞表面でヘパリン又はヘパラン硫酸部分に結合することができる非とタンパク質のG A G結合ドメインである。

【 0 0 2 2 】

別の態様では、本発明は、被験体の病原体感染を治療又は予防するための薬学的組成物を含む。薬学的組成物は、少なくとも1つの治療ドメイン及び少なくとも1つのアンカードメインを含む本発明の化合物を含む。薬学的組成物はまた、溶液、安定剤、及び充填剤等を含み得る。いくつかの好ましい実施形態では、薬学的組成物を、吸入薬として処方する。いくつかの好ましい実施形態では、薬学的組成物を、鼻内噴霧として処方する。

【 0 0 2 3 】

本発明の別の態様は、少なくとも1つのシアリダーゼを含む薬学的組成物である。シアリダーゼを、任意の供給源（例えば、細菌又は哺乳動物供給源等）から単離することができるか、天然に存在するシアリダーゼと実質的に相同な組換えタンパク質であり得る。シアリダーゼを含む薬学的組成物を、鼻、気管、気管支、経口、又は局所投与のために処方することができるか、注射液又は点眼液として処方することができる。シアリダーゼを含む薬学的組成物を使用して、病原体感染を治療又は防止するか、アレルギー反応又は炎症反応を治療又は防止するか、遺伝子治療のための組換えウイルスの形質導入効率を増強することができる。

【 0 0 2 4 】

本発明の別の態様は、シアリダーゼ触媒ドメインタンパク質である。この態様では、シアリダーゼの触媒ドメインを含むが、触媒ドメイン配列が由来するシアリダーゼ全体を下回るタンパク質を、シアリダーゼ触媒ドメインタンパク質と見なす。シアリダーゼ触媒ドメインタンパク質は、他のタンパク質配列（他のタンパク質由来の機能ドメイン等であるが、これに限定されない）を含み得る。シアリダーゼを含む薬学的組成物を、鼻、気管、気管支、経口、又は局所投与のために処方することができるか、注射液又は点眼液として処方することができる。シアリダーゼを含む薬学的組成物を使用して、病原体感染を治療又は防止するか、アレルギー反応又は炎症反応を治療又は防止するか、遺伝子治療のための組換えウイルスの形質導入効率を増強することができる。

【 0 0 2 5 】

更に別の態様では、本発明は、病原体による感染を治療又は予防するための方法を含む。好ましい実施形態では、本方法は、感染を防止又は治療するために、シアリダーゼ活性（シアリダーゼ又はシアリダーゼ触媒ドメインタンパク質（シアリダーゼ触媒ドメイン融合タンパク質が含まれる）等）を被験体に投与するステップを含む。病原体は、例えば、ウイルス病原体又は細菌病原体であり得る。本方法は、薬学的有効量の本発明の化合物を被験体の少なくとも1つの標的細胞に適用するステップを含む。好ましくは、薬学的組成物を、噴霧、吸入薬、又は局所処方物の使用によって適用することができる。

【 0 0 2 6 】

本発明はまた、アレルギー及び炎症を治療するための新規の組成物及び方法を提供する。特に、本発明は、炎症細胞の接着及び機能を防止又は阻害するように細胞外で作用することができる化合物を提供する。アレルギー及び炎症を治療するための化合物のいくつかの好ましい実施形態は、細胞外活性を有する少なくとも1つの治療ドメイン及び標的細胞表面に化合物がアンカーする少なくとも1つのアンカードメインを含む。いくつかの好ましい実施形態では、本方法は、アレルギー反応又は炎症反応を防止又は治療するために、シアリダーゼ活性（シアリダーゼ又はシアリダーゼ触媒ドメインタンパク質（シアリダーゼ触媒ドメイン融合タンパク質が含まれる）等）を被験体に投与するステップを含む。ア

10

20

30

40

50

レルギー反応又は炎症反応は、喘息、アレルギー性鼻炎、湿疹等の皮膚病 (s k i n c o n d i t i o n)、又は植物毒素若しくは動物毒素への曝露であり得る。本方法は、薬学的有効量の本発明の化合物を被験体の少なくとも1つの標的細胞に適用するステップを含む。好ましくは、薬学的組成物を、噴霧、吸入器、又は局所処方物の使用によって適用することができる。

【0027】

本発明はまた、遺伝子治療中に組換えウイルスベクターによって遺伝子導入効率を改善するための新規の組成物及び方法を提供する。特に、本発明は、AAVベクター等の遺伝子治療ベクターによる形質導入を妨害する物理的又は化学的障壁を減少させるように細胞外で作用することができる化合物を提供する。組換えウイルスベクターによる遺伝子導入効率を改善するための本発明のいくつかの好ましい化合物は、細胞外活性を有する少なくとも1つの治療ドメイン及び標的細胞表面に化合物がアンカーする少なくとも1つのアンカードメインを含む。いくつかの好ましい実施形態では、本方法は、組換えウイルスベクターによる標的細胞の形質導入を容易にするために、シアリダーゼ活性 (シアリダーゼ又はシアリダーゼ触媒ドメインタンパク質 (シアリダーゼ触媒ドメイン融合タンパク質が含まれる) 等) を被験体に投与するステップを含む。本方法は、組換えウイルスベクターと共に有効量の本発明の化合物を少なくとも1つの標的細胞に適用するステップを含む。本発明の薬学的組成物を、噴霧、吸入薬、又は局所処方物の使用によって適用することができる。

10

【発明を実施するための最良の形態】

20

【0028】

発明の詳細な説明

定義

他で定義しない限り、本明細書中で使用した全ての技術用語及び科学用語は、本発明に属する当業者に一般に理解されている意味を有する。一般に、本明細書中で使用した命名法及び下記の製造手順又は実験手順は、周知であり、当該分野で一般的に使用されている方法) を使用する。用語を単数形で提供する場合、我々はこの用語の複数形も意図する。用語及び定義が参考として援用される参考文献と矛盾する場合、本出願で使用した用語は、本明細書中に記載の定義に従う。開示全体で使用されるように、以下の用語は、他で示さない限り、以下の意味を有すると理解すべきである。

30

【0029】

「病原体」は、細胞、組織、又は生物に感染することができる任意のウイルス又は微生物であり得る。病原体は、ウイルス、細菌、又は原生動物であり得る。

【0030】

「標的細胞」は、病原体が感染することができる任意の細胞若しくは炎症細胞と相互作用することができる任意の細胞又は組換えウイルスによって導入される外因性遺伝子の意図する目的地 (d e s t i n a t i o n) である宿主細胞である。

【0031】

「組換えウイルス」又は「組換えウイルスベクター」、「遺伝子治療ウイルスベクター」又は「遺伝子治療ベクター」を、1つ又はそれ以上の外因性遺伝子を含む遺伝子操作されたウイルスと定義する。標的細胞が組換えウイルスによって形質導入された場合、外因性遺伝子は標的細胞に導入される。標的細胞に導入された遺伝子を細胞中で発現させて、意図する治療効果を得ることができる。現在、最も一般的に使用されている遺伝子治療ウイルスベクターは、以下の4つのウイルス型に基づく：レトロウイルス (レンチウイルスが含まれる)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス (AAV)、及び単純ヘルペスウイルス1型。

40

【0032】

「炎症細胞」は、免疫系の炎症反応を実施するか、これに関与する細胞である。炎症細胞には、Bリンパ球、Tリンパ球、マクロファージ、好塩基球、好酸球、肥満細胞、NK

50

細胞、及び単球が含まれる。

【 0 0 3 3 】

「病原体によって標的細胞の感染を防止することができる細胞外活性」は、標的細胞の外面又は外面付近に対する作用によって病原体による標的細胞の感染を遮断又は妨害することができる任意の活性である。病原体による標的細胞の感染を防止することができる細胞外活性は、触媒活性又は阻害活性等（これらに限定されない）の活性であり得る。例えば、触媒活性は、病原体、標的細胞、又は標的細胞の周辺の1つ又はそれ以上の物質（リガンド、受容体、又は酵素等であるが、これらに限定されない）（1つ又はそれ以上の物質（*e n t i t y*）が感染過程に寄与する）を分解する酵素活性であり得る。触媒活性はまた、物質（*e n t i t y*）の感染促進特性が減少するように病原体、標的細胞、又は標的細胞の周辺の1つ又はそれ以上の物質（*e n t i t y*）を修飾することができる。阻害活性は、例えば、受容体又はリガンドに結合して、受容体又はリガンドが部分に結合するのを防止する活性（この結合は感染過程に必要であるかこれを促進する）であり得る。阻害活性はまた、酵素又は受容体が阻害過程に必要であるかこれを促進する機能を実施するのを防止する酵素又は受容体のインヒビターであり得る。標的細胞の外側には、標的細胞膜自体並びに標的細胞を取り巻く細胞外環境（細胞外基質が含まれる）、細胞内空間、及び管腔空間（*l u m i n a l s p a c e*）が含まれる。上皮細胞について、標的細胞の外側には、管腔の内張りを形成する細胞膜の頂端又は管腔表面及び管腔表面付近の細胞外環境が含まれる。「病原体によって標的細胞の感染を防止することができる細胞外活性」は、任意の化学物質型（タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、核酸、ペプチド核酸、核酸類似体、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、有機小分子、ポリマー、脂質、ステロイド、脂肪酸、及び炭水化物等（任意のこれらの組み合わせが含まれる）が含まれる）であり得る。しかし、好ましくは、活性は、ペプチド又はタンパク質若しくはペプチド又はタンパク質に結合する活性を含む。

【 0 0 3 4 】

「組換えウイルスによって形質導入効率又は遺伝子導入効率を改善することができる細胞外活性」は、標的細胞の外面又はその付近での作用によって組換えウイルスによる宿主細胞の侵入を妨害する物理的又は化学的障壁を減少させるか排除する任意の活性である。組換えウイルスによって形質導入効率又は遺伝子導入効率を改善することができる細胞外活性は、触媒活性又は阻害活性等（これらに限定されない）の活性であり得る。例えば、触媒活性は、病原体、標的細胞、又は標的細胞の周辺の1つ又はそれ以上の物質（*e n t i t y*）（リガンド、受容体、又は酵素等であるが、これらに限定されない）（1つ又はそれ以上の物質（*e n t i t y*）が感染過程に寄与する）を分解する酵素活性であり得る。触媒活性はまた、物質（*e n t i t y*）の感染促進特性が減少するように病原体、標的細胞、又は標的細胞の周辺の1つ又はそれ以上の物質（*e n t i t y*）を修飾することができる。阻害活性は、例えば、受容体又はリガンドに結合して、受容体又はリガンドが部分に結合するのを防止する活性（この結合は感染過程に必要であるかこれを促進する）であり得る。阻害活性はまた、酵素又は受容体が阻害過程に必要であるかこれを促進する機能を実施するのを防止する酵素又は受容体のインヒビターであり得る。標的細胞の外側には、標的細胞膜自体並びに標的細胞を取り巻く細胞外環境（細胞外基質が含まれる）、細胞内空間、及び管腔空間が含まれる。上皮細胞について、標的細胞の外側には、管腔の内張りを形成する細胞膜の頂端又は管腔表面及び管腔表面付近の細胞外環境が含まれる。「病原体によって標的細胞の感染を防止することができる細胞外活性」は、任意の化学物質型（タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、核酸、ペプチド核酸、核酸類似体、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、有機小分子、ポリマー、脂質、ステロイド、脂肪酸、及び炭水化物等（任意のこれらの組み合わせが含まれる）が含まれる）であり得る。しかし、好ましくは、活性は、ペプチド若しくはタンパク質又はペプチド若しくはタンパク質に結合する活性を含む。

【 0 0 3 5 】

「炎症細胞の接着又は機能を阻害することができる細胞外活性」は、炎症細胞が標的細胞

10

20

30

40

50

胞に接触して標的細胞の正常な生理学的状態に影響を与えるのを防止することができる任意の活性である。

【 0 0 3 6 】

「細胞外アンカードメイン」又は単に「アンカードメイン」とも呼ばれる「標的細胞膜に少なくとも1つの治療ドメインをアンカーすることができるドメイン」は、細胞表面又は細胞表面上若しくは細胞表面に極めて接近した部分に安定して結合することができる化学物質をいう。細胞外アンカードメインは、1つ又はそれ以上の部分（好ましくは、1つ又はそれ以上の治療ドメイン）に可逆的、又は不可逆的に結合し、それにより、1つ又はそれ以上の付着した治療部分が真核細胞の外面又は外面に極めて接近して維持され得る。好ましくは、細胞外アンカードメインは、標的細胞表面上の少なくとも1つの分子、又は標的細胞表面と密接に会合して見出される少なくとも1つの分子に結合する。例えば、細胞外アンカードメインは、標的細胞の細胞膜に共有結合又は非共有結合した分子に結合することができるが、標的細胞の周囲の細胞外基質中に存在する分子に結合することができる。細胞外アンカードメインは、好ましくは、ペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質であり、任意の更なる化学物質型（1つ又はそれ以上の更なるタンパク質、ポリペプチド、又はペプチド、核酸、ペプチド核酸、核酸類似体、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、有機小分子、ポリマー、脂質、ステロイド、脂肪酸、炭水化物、又は任意のこれらの組み合わせも含み得る。

【 0 0 3 7 】

本明細書中で使用される場合、タンパク質配列又はペプチド配列は、基準配列と同一であるか、1つ又はそれ以上のアミノ酸欠失、1つ又はそれ以上の更なるアミノ酸、又は1つ又はそれ以上の保存的アミノ酸置換を含み、基準配列と同一又は本質的に同一の活性を保持する場合、基準配列と「実質的に相同」である。保存的置換を、以下の5つの群のうちの1つの範囲内の交換と定義することができる。

I．小さな脂肪族非極性又はわずかに極性のある残基：A l a、S e r、T h r、P r o、G l y

II．負電荷の極性残基及びそのアミド：A s p、A s n、G l u、G l n

III．正電荷の極性残基：H i s、A r g、L y s

IV．巨大な脂肪族非極性残基：M e t、L e u、I l e、V a l、C y s

V．巨大な芳香族残基：P h e、T r y、T r p

上記群内で、以下の置換を、「高度な保存」と見なす：A s p / G l u、H i s / A r g / L y s、P h e / T y r / T r p、及びM e t / L e u / I l e / V a l。半保存的置換を、上記群（I）～（IV）の2つの間の交換と定義し、上記の（I）、（II）、及び（III）を含むスーパーグループ（A）又は上記（IV）及び（V）を含むスーパーグループ（B）に制限される。更に、疎水性アミノ酸を本出願で特定する場合、これらは、A l a、G l y、P r o、M e t、L e u、I l e、V a l、C y s、P h e、及びT r pをいうのに対し、親水性アミノ酸は、S e r、T h r、A s p、A s n、G l u、G l n、H i s、A r g、L y s、及びT y rをいう。

【 0 0 3 8 】

「シアリダーゼ」は、基質分子からシアル酸を除去することができる酵素である。シアリダーゼ（N - アシルノイラミノシルグリコヒドロラーゼ、E C 3 . 2 . 1 . 1 8）は、シアロ複合糖質からシアル酸を加水分解によって除去する酵素群である。シアル酸は、通常、糖タンパク質及び糖脂質に付着するオリゴサッカリド鎖の最も外側の位置で見出される9炭素骨格を有するアルファ - ケト酸である。主なシアル酸型の1つは、ほとんどの他の型の生合成前駆体であるN - アセチルノイラミン酸（N e u 5 A c）である。基質分子は、制限されない例として、オリゴサッカリド、ポリサッカリド、糖タンパク質、ガングリオシド、又は合成分子であり得る。例えば、シアリダーゼは、シアル酸残基と基質分子の残部（r e m a i n d e r）との間のアルファ（2，3） - G a l 結合、アルファ（2，6） - G a l 結合、又はアルファ（2，8） - G a l 結合を切断することができる。シアリダーゼはまた、シアル酸残基と基質分子の残部との間の任意又は全ての結合を切断す

る。Neu5Acと炭水化物側鎖の最後から2番目のガラクトース残基との間の2つの主な結合は、事実上、Neu5Acアルファ(2,3)-Gal及びNeu5Acアルファ(2,6)-Galで見出される。Neu5Acアルファ(2,3)-Gal分子及びNeu5Acアルファ(2,6)-Gal分子の両方は、受容体としてインフルエンザウイルスによって認識され得るが、ヒトウイルスはNeu5Acアルファ(2,6)-Galを好むようであり、トリウイルス及びウマウイルスは、主にNeu5Acアルファ(2,3)-Galを認識する。シアリダーゼは、天然に存在するシアリダーゼ、操作されたシアリダーゼ(アミノ酸配列が天然に存在するシアリダーゼに基づくシアリダーゼ(天然に存在するシアリダーゼの配列と実質的に相同な配列が含まれる)等であるが、これらに限定されない)であり得る。本明細書中で使用される、「シアリダーゼ」は、天然に存在するシアリダーゼの活性部分、又は天然に存在するシアリダーゼの活性部分に基づいた配列を含むタンパク質若しくはペプチドも意味し得る。

10

【0039】

「融合タンパク質」は、少なくとも2つの異なる供給源由来のアミノ酸配列を含むタンパク質である。融合タンパク質は、天然に存在するタンパク質に由来するか天然に存在するタンパク質の全部又は一部と実質的に相同なアミノ酸配列を含むことができ、更に、異なる天然に存在するタンパク質に由来するかその全部又は一部と実質的に相同な1つから非常に多数のアミノ酸を含むことができる。選択的に、融合タンパク質は、天然に存在するタンパク質に由来するか天然に存在するタンパク質の全部又は一部と実質的に相同なアミノ酸配列を含むことができ、更に、合成配列である1つから非常に多数のアミノ酸を含むことができる。

20

【0040】

「シアリダーゼ触媒ドメインタンパク質」は、シアリダーゼの触媒ドメインを含むタンパク質又はシアリダーゼの触媒ドメインと実質的に相同であるが、触媒ドメインが由来するシアリダーゼの全てのアミノ酸配列を含まないアミノ酸配列を含むタンパク質であり、シアリダーゼ触媒ドメインタンパク質は、触媒ドメインが由来するインタクトなシアリダーゼと実質的に同一の活性を保持している。シアリダーゼ触媒ドメインタンパク質は、シアリダーゼに由来しないが、これが必要ではないアミノ酸配列を含むことができる。シアリダーゼ触媒ドメインタンパク質は、1つ又はそれ以上の公知のタンパク質のアミノ酸配列に由来するかこれと実質的に相同なアミノ酸配列を含むことができるか、他のタンパク質のアミノ酸配列に由来しないかこれと実質的に相同ではない1つ又はそれ以上のアミノ酸を含むことができる。

30

【0041】

I. 病原体による感染を防止又は治療するための組成物

本発明は、真核細胞膜に少なくとも1つの治療ドメインをアンカーすることができる少なくとも1つのドメイン及び病原体による細胞の感染を防止することができる細胞外活性を有する少なくとも1つの治療ドメインを含むペプチド又はペプチドベースの化合物を含む。「ペプチド又はペプチドベースの」化合物は、化合物の2つの主要なドメインがアミノ酸フレームワークを有し、アミノ酸がペプチド結合によって結合していることを意味する。ペプチド又はタンパク質ベースの化合物はまた、アミノ酸フレームワーク又は骨格に付着した他の化合物又は基(アンカードメインのアンカー活性に寄与する部分又は感染防止活性又は治療ドメインに寄与する部分が含まれる)を有し得る。例えば、本発明のタンパク質ベースの治療薬は、炭水化物、脂肪酸、脂質、ステロイド、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、核酸分子、核酸類似体、ペプチド核酸分子、有機小分子、又は更にポリマー等の化合物及び分子等(これらに限定されない)を含むことができる。本発明のタンパク質ベースの治療薬はまた、修飾アミノ酸又は天然に存在しないアミノ酸を含むことができる。化合物の非アミノ酸部分は、任意の目的(化合物の精製を容易にすること、化合物(治療処方物等)の溶解性又は分布を改良すること、化合物へのドメインの連結又は化合物への化学的部分の連結、化合物の二次元構造又は三次元構造への寄与、化合物全体のサイズの増加、化合物の安定性の増加、及び化合物のアンカー活性又は治療活性への寄与が含

40

50

まれるが、これらに限定されない)に役立ち得る。

【0042】

本発明のペプチド又はタンパク質ベースの化合物には、アンカードメイン又は治療ドメインを含む化合物に加えて、タンパク質配列又はペプチド配列も含まれ得る。更なるタンパク質配列は、任意の目的(上記概説の任意の目的(化合物の精製を容易にすること、化合物の溶解性又は分布を改良すること、化合物へのドメインの連結又は化合物への化学的部分の連結、化合物の二次元構造又は三次元構造への寄与、化合物全体のサイズの増加、化合物の安定性の増加、及び化合物のアンカー活性又は治療活性への寄与)が含まれるが、これらに限定されない)に役立ち得る。好ましくは、任意の更なるタンパク質配列又はアミノ酸配列は、アンカードメイン及び治療ドメインを含む1つのポリペプチド鎖又はタンパク質鎖の一部であるが、タンパク質配列の任意の実行可能な配置が本発明の範囲内に含まれる。

10

【0043】

アンカードメイン及び治療ドメインを、治療ドメインが病原体による標的細胞の感染を防止又は妨害する細胞外活性を示すことができるように標的細胞膜又はその付近に化合物が結合することが可能な任意の適切な方法で配置することができる。化合物は、好ましくは、少なくとも1つのタンパク質又はペプチドベースのアンカードメイン及び少なくとも1つのペプチド又はタンパク質ベースの治療ドメインを有する。この場合、ドメインを、任意の順序でペプチド骨格に沿って直線的に配置することができる。アンカードメインは、治療ドメインに対してN末端であり得るか、治療ドメインに対してC末端であり得る。各末端上の少なくとも1つのアンカードメインに隣接した1つ又はそれ以上の治療ドメインを有することも可能である。或いは、1つ又はそれ以上のアンカードメインは、各末端上の少なくとも1つの治療ドメインに隣接することができる。化学的(好ましくはペプチド)リンカーを選択的に使用して、化合物のいくつか又は全てのドメインに連結することができる。

20

【0044】

非線状の分枝配置でドメインを有することも可能である。例えば、治療ドメインを、アンカードメインも含むか、或いは、これに連結したポリペプチドの一部であるアミノ酸の誘導体化側鎖に付着させることができる。

【0045】

本発明の化合物は、1つを超えるアンカードメインを有し得る。化合物が1つを超えるアンカードメインを有する場合、アンカードメインは、同一であっても異なっても良い。本発明の化合物は、1つを超える治療ドメインを有し得る。化合物が1つを超える治療ドメインを有する場合、治療ドメインは、同一であっても異なっても良い。化合物が複数のアンカードメインを含む場合、アンカードメインを縦列に配置するか(リンカーを使用するか使用しない)、治療ドメイン等の他のドメインの別の側面に配置することができる。化合物が複数の治療ドメインを含む場合、治療ドメインを縦列に配置するか(リンカーを使用するか使用しない)、アンカードメイン等(これに限定されない)の他のドメインの別の側面に配置することができる。

30

【0046】

本発明のペプチド又はタンパク質ベースの化合物を、任意の適切な方法(天然に存在するタンパク質の精製、所望の機能ドメインを得るための選択的なタンパク質のタンパク質分解による切断、及び機能ドメインの他の機能ドメインとの抱合が含まれる)によって作製することができる。ペプチドを、化学合成し、選択的に他のペプチド又は化学的部分と化学的に抱合することもできる。しかし、好ましくは、本発明のペプチド又はタンパク質ベースの化合物を、連続するポリペプチド中で少なくとも1つのアンカードメイン及び少なくとも1つの治療ドメインを(リンカーを用いるか用いないで)共にコードするように核酸コンストラクトを操作することによって作製する。好ましくは、適切な発現配列を有する核酸コンストラクトを、原核細胞又は真核細胞にトランスフェクトし、治療タンパク質ベースの化合物を細胞に発現させて精製することができる。任意の所望の化学的部分を

40

50

、選択的に、精製後にペプチド又はタンパク質ベースの化合物に抱合することができる。いくつかの場合、所望の翻訳後修飾（グリコシル化等であるが、これに限定されない）を実施する能力についてタンパク質ベースの治療薬を発現するための細胞株を選択することができる。

【0047】

多種多様のコンストラクトをデザインし、そのタンパク質産物を、所望の活性（例えば、アンカードメインの結合活性又は治療ドメインの結合活性、触媒活性、若しくは阻害活性等）について試験することができる。核酸コンストラクトのタンパク質産物を、病原体による標的細胞の感染の防止又は妨害の有効性について試験することもできる。病原体感染力についての *in vitro* 及び *in vivo* 試験（インフルエンザウイルスの感染力について実施例に記載の試験等）は、当該分野で公知である。

10

【0048】

アンカードメイン

本明細書中で使用される、「細胞外アンカードメイン」又は「アンカードメイン」は、標的細胞の外表面又は標的細胞の外表面に極めて接近して存在する物質に安定に結合することができる任意の部分である。アンカードメインは、本発明の化合物を標的細胞の外表面又はその付近に保持するのに役立つ。

【0049】

細胞外アンカードメインは、好ましくは、1) 標的細胞の表面上で発現した分子、又は標的細胞の表面上で発現した分子の一部、ドメイン、若しくはエピトープ、2) 標的細胞の表面上で発現した分子に付着した化学物質、又は3) 標的細胞を取り囲む細胞外基質の分子に結合する。

20

【0050】

アンカードメインは、好ましくは、ペプチド又はタンパク質ドメイン（修飾されているか誘導体化されているペプチド又はタンパク質ドメインが含まれる）であるか、ペプチド又はタンパク質にカップリングした部分を含む。ペプチド又はタンパク質にカップリングした部分は、標的細胞表面又はその付近での物質へのアンカードメインの結合に寄与することができる任意の分子型であってよく、好ましくは、有機分子（例えば、核酸、ペプチド核酸、核酸類似体、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、有機小分子、ポリマー、脂質、ステロイド、脂肪酸、炭水化物、又は任意のこれらの組み合わせ等）である。

30

【0051】

アンカードメインによって結合される分子、複合体、ドメイン、又はエピトープは、標的細胞に特異的であっても特異的でなくても良い。例えば、アンカードメインは、標的細胞上又はそれに極めて接近した分子上に存在するエピトープに結合することができ、標的細胞周囲以外の部位でもこれが起こる。しかし、多くの場合、本発明の治療化合物の送達局在化されることにより、その発生が主に標的細胞表面に限定される。他の場合、アンカードメインによって結合された分子、複合体、部分、ドメイン、又はエピトープは、標的組織又は標的細胞型に特異的であり得る。

【0052】

標的組織又は標的細胞型は、病原体が侵入して増幅する動物又はヒトの体内の部位を含む。例えば、標的細胞は、病原体が感染し得る内皮細胞であり得る。本発明の組成物は、例えば、内皮細胞型に特異的な細胞表面エピトープに結合することができるアンカードメインを含むことができる。別の例では、標的細胞は上皮細胞であってよく、本発明の組成物は多数の上皮細胞型の細胞表面上に存在するか異なる上皮細胞型の細胞外基質中に存在するエピトープに結合することができる。この場合、組成物の送達局在化されることにより、その局在化が病原体の標的である上皮細胞の部位に制限され得る。

40

【0053】

病原体による感染を防止又は治療するための方法は、上皮細胞の表面又はその付近に結合することができるアンカードメインを含むことができる。例えば、ヘパリンに密接に関連するヘパラン硫酸は、細胞膜上（気道上皮表面が含まれる）に遍在するグリコサミノグ

50

リカン (GAG) 型である。多数のタンパク質は、ヘパリン/ヘパラン硫酸と特異的に結合し、これらのタンパク質中のGAG結合配列が同定されている (Meyer, FA, King, M and Gelman, RA. (1975) *Biochimica et Biophysica Acta* 392:223-232; Schauer, S. ed., pp233. *Sialic Acids Chemistry, Metabolism and Function*. Springer-Verlag, 1982)。例えば、ヒト血小板因子4 (PF4) (配列番号2)、ヒトインターロイキン8 (IL8) (配列番号3)、ヒトアンチトロピンIII (AT III) (配列番号4)、ヒトアポタンパク質E (ApoE) (配列番号5)、ヒト血管関連遊走タンパク質 (human angi-associated migratory protein) (AAMP) (配列番号6)、又はヒトアンフィレグリン (human amphiregulin) (配列番号7) のGAG結合配列は、ヘパリンに対して非常に高い親和性 (nmolの範囲で) を示すことが示されている (Lee, MK and Lander, AD. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2768-2772; Goger, B, Halden, Y, Reik, A, Mosl, R, Pye, D. Gallagher, J and Kungl, AJ. (2002) *Biochem.* 41:1640-1646; Witt, DP and Lander AD (1994) *Curr Bio* 4:394-400; Weisgraber, KH, Rail, SC, Mahley, RW, Milne, RW and Marcel, Y. (1986) *J Bio Chem* 261:2068-2076)。これらのタンパク質のGAG結合配列は、その受容体結合配列と異なるので、これらは全長タンパク質又は受容体結合ドメインに関連する生物活性を含まない。これらの配列又はヘパリン/ヘパラン硫酸結合配列として同定されているか将来的に同定される他の配列、又はヘパリン/ヘパラン硫酸結合活性を有する同定されたヘパリン/ヘパラン硫酸結合配列と実質的に相同な配列を、本発明の化合物中の上皮アンカードメインとして使用することができ、これを使用して、例えば、気道上皮感染ウイルス (インフルエンザウイルス等であるが、これに限定されない) を防止又は治療することができる。

【0054】

アンカードメインは、特定の種の標的細胞型に特異的な部分に結合することができるか、1つを超える種の標的細胞型中で見出される部分に結合することができる。アンカードメインが1つを超える種の標的細胞の表面に存在する部分に結合することができ、且つウイルス又は病原体が1つを超える種に感染することができる場合、治療化合物は、1つを超える種で有用であり得る (治療ドメインが関連種を越えても有効である場合)。例えば、インフルエンザウイルスに対して使用することができる治療化合物 (ヘパリン/ヘパラン硫酸に結合するアンカードメインを有する本発明の治療化合物) の場合、化合物を、動物 (ヒトが含まれる) 及びトリで使用するすることができる。

【0055】

治療ドメイン

本発明の化合物は、病原体による細胞の感染を防止又は妨害することができるか、被験体の免疫応答を調整することができるか、組換えウイルスの形質導入効率を改善することができる細胞外活性を有する少なくとも1つの治療ドメインを含む。治療活性は、非限定的な例として、結合活性、触媒活性、又は阻害活性であり得る。本発明のいくつかの実施形態では、治療活性は、病原体による細胞感染に寄与する病原体の機能を修飾又は阻害するように作用する。他の実施形態では、治療ドメインは、標的細胞又は標的生物の機能を修飾するか阻害することができる。

【0056】

例えば、治療ドメインは、標的細胞への病原体の結合に必要な標的細胞上の受容体に結合することができる。この方法では、治療部分は、標的細胞への病原体の結合を遮断して感染を防止することができる。別の方法では、治療ドメインは、病原体上の分子又はエピトープに結合して、分子又はエピトープの感染に必要な標的細胞との相互作用を防止する

ことができる。治療ドメインはまた、宿主による標的細胞の感染を可能にするか促進する病原体又は宿主の分子又はエピトープを分解することができる触媒活性を有し得る。更には他の実施形態では、治療ドメインは、病原体による標的細胞感染に必要な活性のインヒビターであり得る。阻害される活性は、宿主生物又は病原体の活性であり得る。

【0057】

治療ドメインは、好ましくは、細胞外で作用し、その感染防止活性、炎症反応調整活性、又は形質導入増強活性が標的細胞表面又は標的細胞を取り囲む隣接領域中（細胞外基質内の部位、細胞内空間、又は組織の管腔空間が含まれる）で起こることを意味する。

【0058】

治療ドメインは、好ましくは、ペプチド又はタンパク質ドメイン（修飾されているか誘導体化されているペプチド又はタンパク質ドメインが含まれる）であるか、ペプチド又はタンパク質にカップリングした部分を含む。ペプチド又はタンパク質にカップリングした部分は、病原体による標的細胞の感染を防止又は妨害することができる任意の分子型であってよく、好ましくは、有機分子（例えば、核酸、ペプチド核酸、核酸類似体、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、有機小分子、ポリマー、脂質、ステロイド、脂肪酸、炭水化物、又は任意のこれらの組み合わせ等）である。

【0059】

治療ドメインは、合成ペプチド又はポリペプチドであり得るか、ペプチド又はポリペプチドに抱合することができる合成分子を含むことができ、天然に存在するペプチド若しくはポリペプチド又は天然に存在するタンパク質のドメインであり得る。治療ドメインはまた、天然に存在するペプチド又はタンパク質と実質的に相同なペプチド又はタンパク質であり得る。

【0060】

治療ドメインは、特定の種で有用であり得るか、1つを超える種中の病原体感染を防止又は妨害することができる。例えば、病原体機能を阻害する治療ドメインを、一般に、宿主が感染し得る一定の範囲の種で使用するすることができる一方で、宿主の特性の干渉によって宿主-病原体相互作用を遮る治療ドメインは種特異的であっても種特異的でなくてもよい。多くの場合、アンカードメイン及び治療ドメインは、1つを超える種で有効であり得るので、本発明の化合物を使用して、ヒト及び動物の健康を増進することができる一方で、ウイルスの動物宿主全体への伝播及び拡大を減少させることができる。例えば、治療ドメインがシアリダーゼである場合、シアル酸残基と基質分子の残部との間の1つを超える結合型を切断することができるシアリダーゼ（アルファ（2,6）-Gal結合及びアルファ（2,3）-Gal結合の両方を切断することができるシアリダーゼ）は、広範なインフルエンザウイルス（トリ、ブタ、又はウマ等の異なる種に天然に宿主とする（hosted）ウイルスが含まれる）による感染からヒトを防御することができる。

【0061】

リンカー

本発明の化合物は、選択的に、化合物のドメインを連結することができる1つ又はそれ以上のリンカーを含み得る。リンカーを使用して、化合物のドメインを最適に間隔をあけるか折り畳むことができる。リンカーによって連結された化合物のドメインは、治療ドメイン、アンカードメイン、又は化合物の安定性の増強、精製を容易にすること等の更なる機能を提供する化合物の任意の他のドメイン又は部分であり得る。本発明の化合物のドメインを連結するために使用されるリンカーは、化学的リンカー又はアミノ酸リンカー若しくはペプチドリinkerであり得る。化合物が1つを超えるリンカーを含む場合、リンカーは同一でも異なっていてよい。化合物が1つを超えるリンカーを含む場合、リンカーの長さは同一でも異なっていてよい。

【0062】

種々の組成、極性、反応性、長さ、可動性、及び切断性（cleavability）を示す多数の化学的リンカーは、有機化学分野で公知である。本発明の好ましいリンカーには、アミノ酸リンカー又はペプチドリinkerが含まれる。ペプチドリinkerは、当該分

10

20

30

40

50

野で周知である。好ましくは、リンカーは、1アミノ酸長と100アミノ酸長との間、より好ましくは1アミノ酸長と30アミノ酸長との間であるが、本発明の化合物のリンカーの長さは制限されない。好ましくは、リンカーは、本発明の単量体によってコードされるペプチド又はタンパク質の高次構造及び活性を干渉しないアミノ酸配列を含む。いくつかの好ましい本発明のリンカーは、アミノ酸グリシンを含むリンカーである。例えば、配列：

(GGGGS (配列番号10))_n (式中、*n*は1と20との間の整数、より好ましくは1と12との間の整数である)

を有するリンカーを使用して、本発明の治療化合物のドメインを連結することができる。

【0063】

本発明はまた、少なくとも1つの治療ドメイン及び少なくとも1つのアンカードメインを含む本発明のタンパク質ベースの化合物をコードする核酸分子を含む。核酸分子は、特定の細胞型（例えば、大腸菌細胞又はヒト細胞等）における発現のために最適化されたコドンを含み得る。少なくとも1つの治療ドメイン及び少なくとも1つのアンカードメインを含む本発明のタンパク質ベースの化合物をコードする本発明の核酸分子はまた、他の核酸配列（遺伝子発現を増強する配列が含まれるが、これに限定されない）を含むことができる。核酸分子は、ベクター（発現ベクター等であるが、これに限定されない）中に存在し得る。

【0064】

少なくとも1つのアンカードメイン及び少なくとも1つのプロテアーゼインヒビターを含む組成物

本発明のいくつかの態様では、病原体による細胞感染を防止することができる細胞外活性を有する治療ドメインは、プロテアーゼインヒビターである。プロテアーゼインヒビターは、任意の化学物質型（例えば、炭水化物又はポリマー等）であり得るが、好ましくは、酵素活性を阻害するタンパク質又はペプチドである。好ましくは、プロテアーゼインヒビターは、病原体又は宿主細胞のタンパク質のプロセッシングが病原体の感染力に必要である場合、少なくとも1つの病原体又は宿主細胞のタンパク質を少なくとも部分的にプロセッシングする酵素活性を阻害する。病原体の感染力に必要であるウイルスタンパク質をプロセッシングすることができる酵素は、病原体酵素又は宿主細胞を起源とする酵素であり得る。好ましくは、プロセッシング酵素は、標的細胞の表面又は表面付近でアンカーする本発明の化合物が酵素活性を有効に阻害することができるように、標的細胞の表面又は表面付近で作用する。

【0065】

プロテアーゼ阻害ドメインを含む本発明の化合物を使用して、プロテアーゼが宿主細胞の表面又は表面付近で活性であるその生活環でプロテアーゼを必要とする任意の病原体による感染を阻害することができる。これらのタンパク質ベースの組成物は、例えば、以下の構造の1つを含み得る：

(アンカードメイン)_n - リンカー - (プロテアーゼインヒビター)_n (*n* = 1、2、3又はそれ以上)

又は：

(プロテアーゼインヒビター)_n - リンカー - (アンカードメイン)_n (*n* = 1、2、3又はそれ以上)。

【0066】

プロテアーゼインヒビターは、ペプチド又はポリペプチドの単量体形態であり得るか、同一のポリペプチドが直接連結しているか、その間に間隔を空ける配列を使用して連結された同一のポリペプチドの複数のコピーであり得る。或いは、異なるポリペプチドベースのプロテアーゼインヒビターを互いに連結することができる（例えば、プロテアーゼ阻害機能ドメインとしてのダイズプロテアーゼと連結したアプロチニン等）。ポリペプチド又はペプチドを、直接又はペプチドリンカー配列から構成されるスペーサーを介して連結することができる。アンカードメインは、標的細胞の表面又は表面付近で結合することがで

10

20

30

40

50

きる任意のペプチド又はポリペプチドであり得る。

【0067】

プロテアーゼインヒビターは、天然に存在するプロテアーゼインヒビター（又はその活性部分）であり得るか、操作されたプロテアーゼインヒビターであり得る。本発明の化合物で使用されるペプチドプロテアーゼインヒビターは、天然に存在するプロテアーゼインヒビターの活性を保持するか、同一の活性を実質的に保持しながら1つ又はそれ以上の欠失、付加、又は置換を有する天然に存在するプロテアーゼインヒビターと実質的に相同な配列を有し得る。

【0068】

本発明の1つの好ましい実施形態では、本発明の治療化合物は、ヒトのインフルエンザの防止及び治療を目的とし、治療ドメインは、インフルエンザウイルス血球凝集素前駆体タンパク質HA0をHA1及びHA2に切断することができるセリンプロテアーゼを阻害することができるタンパク質又はペプチドプロテアーゼインヒビターである。

【0069】

多数のセリンプロテアーゼインヒビターは、培養細胞、ニワトリ胚、及び感染マウスの肺におけるHA切断及びインフルエンザウイルスの活性化を減少させることが示されている。これらには、一般的に使用されている以下等の多数のトリプシンインヒビターが含まれる：アプロチニン（Zhirnov OP, Ikizler MR and Wright PF. (2002) J Virol 76:8682-8689）、ロイペプチン（Zhirnov OP, Ikizler MR and Wright PF. (2002) J Virol 76:8682-8689; Tashiro M, Klenk HD and Rott R. (1987) J Gen Virol 68:2039-2043）、ダイズプロテアーゼインヒビター（Barbey-Morel CL, Oeltmann TN, Edwards KM and Wright PF. (1987) J Infect Dis 155:667-672）、e-アミノカプロン酸（Zhirnov OP, Ovcharenko AV and Bukrinskaya AG. 1982. Arch Virol 73:263-272）、及びn-p-トシル-L-リジンクロロメチルケトン（TLCK）（Barbey-Morel CL, Oeltmann TN, Edwards KM and Wright PF. (1987) J Infect Dis 155:667-672）。これらのうち、アプロチニンのエアゾール吸入は、マウス（Zhirnov OP, Ovcharenko AV and Bukrinskaya AG. (1984) J Gen Virol 65:191-196; Zhirnov OP, Ovcharenko AV and Bukrinskaya AG. (1985) J Gen Virol 66:1633-1638; Zhirnov OP. (1987) J Med Virol 21:161-167; Ovcharenko AV and Zhirnov OP. (1994) Antiviral Res 23:107-118）及びヒト（Zhirnov OP. (1983) Problems Virol. 4:9-12 (in Russian)）におけるインフルエンザ及びパラインフルエンザ気管支肺炎に対して決定的な治療効果を示している。

【0070】

アプロチニン（配列番号1）は、58アミノ酸ポリペプチドインヒビターである（トラジロール又はウシ膵臓トリプシンインヒビター（BPTI）とも呼ばれる）。本発明の化合物は、1つ又はそれ以上のアプロチニンドメインを有し得る。例えば、本発明の治療組成物は、1～6つのアプロチニンポリペプチド、より好ましくは、1～3つのアプロチニンポリペプチドを有し得る。本発明の化合物はまた、アプロチニンのアミノ酸配列と実質的に相同なポリペプチド又はペプチドを含む治療ドメインを有し得る。

【0071】

プロテアーゼインヒビターを含むインフルエンザを防止又は治療するための化合物は、好ましくは、上皮細胞の表面又は表面付近に結合することができるアンカードメインを含

10

20

30

40

50

む。いくつかの好ましい実施形態では、上皮アンカードメインは、ヒトタンパク質由来の G A G 結合配列（例えば、ヒト血小板因子 4（P F 4）（配列番号 2）、ヒトインターロイキン 8（I L 8）（配列番号 3）、ヒトアンチトロニン III（A T I I I）（配列番号 4）、ヒトアポタンパク質 E（A p o E）（配列番号 5）、ヒト血管関連遊走タンパク質（human angio-associated migratory protein）（A A M P）（配列番号 6）、又はヒトアンフィレグリン（human amphiregulin）（配列番号 7）の G A G 結合配列等）である（図 2）。本発明の化合物はまた、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、及び配列番号 7 に列挙した G A G 結合ドメインのアミノ酸配列と実質的に相同なポリペプチド又はペプチドを含むアンカードメインを有し得る。

10

【0072】

臨床的に、アプロチニン及び上皮アンカードメインを含む薬物を、気道全体を被覆するためのエアゾール吸入によって投与して、その生活環においてセリンプロテアーゼを必要とするインフルエンザウイルス又は任意の他のウイルス（パラインフルエンザウイルス等）に起因する気管支肺炎を防止又は治療することができる。或いは、アプロチニン／上皮アンカードメイン融合タンパク質を、鼻内噴霧として投与して、合併症のない初期段階のインフルエンザ又は呼吸器系ウイルスによる他の感染症治療することができる。更に、アプロチニン／上皮アンカードメイン融合タンパク質を、感染を引き起こす前のインフルエンザ又は他のウイルス感染のための予防薬として使用することができる。

20

【0073】

少なくとも 1 つのアンカードメイン及び少なくとも 1 つの触媒活性を含む組成物

本発明のいくつかの態様では、病原体による細胞感染を防止することができる細胞外活性を有する治療ドメインは、触媒活性である。酵素活性は、病原体の感染力に寄与する宿主分子若しくは複合体又は病原体分子若しくは複合体を除去、分解、又は修飾する触媒活性であり得る。好ましくは、本発明の化合物の酵素活性によって除去、分解、又は修飾される宿主分子若しくは複合体又は病原体分子若しくは複合体は、標的細胞の表面にアンカーされた本発明の化合物が宿主、病原体分子、又は複合体を有効に阻害することができるように、標的細胞の表面上、表面上の一部、又は表面付近に存在する。

【0074】

例えば、治療ドメインは、宿主 - 病原体結合及び病原体の標的細胞へのその後の侵入に必要な病原体又は標的細胞の分子又はエピトープを消化することができる触媒活性を有し得る。ウイルスの細胞への侵入が可能な標的細胞上の受容体は、本発明の化合物の酵素活性の標的であり得る。

30

【0075】

受容体の除去が生物に影響を与えない限り、触媒ドメインを含む本発明の化合物を使用して、標的細胞への侵入を促進するために受容体を使用する任意の病原体による感染を阻害することができる。これらのタンパク質ベースの組成物は、例えば、以下の構造の 1 つを有し得る：

（アンカードメイン） n - [リンカー] - （酵素活性） n （ $n = 1, 2, 3$ 又はそれ以上）

40

又は：

（酵素活性） n （ $n = 1, 2, 3$ 又はそれ以上） - [リンカー] - （アンカードメイン） n

（式中、リンカーは選択的である）。

【0076】

酵素活性は、ペプチド又はポリペプチドの単量体形態であり得るか、同一のポリペプチドが直接連結しているか、その間に間隔を空ける配列を使用して連結された同一のポリペプチドの複数のコピーであり得る。ポリペプチド又はペプチドを、直接又はペプチドリッパ配列から構成されるスペーサーを介して連結することができる。アンカードメインは、標的細胞の表面又は表面付近で結合することができる任意のペプチド又はポリペプチド

50

であり得る。

【0077】

本発明の1つの好ましい実施形態では、治療ドメインは、上皮細胞表面上のシアル酸レベルを排除するか大幅に減少させることができるシアリダーゼを含む。シアル酸は、インフルエンザウイルスの受容体である。従って、シアリダーゼを使用した気道上皮細胞表面の治療により、インフルエンザ感染を防止するか、初期感染を干渉することができる。治療ドメインは、完全なシアリダーゼタンパク質又はその活性部分を含むことができる。シアル酸は、インフルエンザウイルスの受容体、パラインフルエンザウイルス、いくつかのコロナウイルス、及びロタウイルス、肺炎球菌 (*S. pneumoniae*)、肺炎マイコプラズマ、インフルエンザ桿菌 (*H. influenzae*)、カタル球菌、緑膿菌、及びピロリ菌の少なくとも1つの受容体である。従って、シアリダーゼを使用した気道上皮細胞表面の治療により、インフルエンザ又は他のウイルス感染を防止するか、初期感染を干渉することができ、そして、肺炎球菌 (*S. pneumoniae*)、肺炎マイコプラズマ、インフルエンザ桿菌 (*H. influenzae*)、カタル球菌、及び緑膿菌等の細菌のコロニー形成を防止又は減少させることができる。シアリダーゼを使用した胃腸上皮細胞の治療により、胃内でピロリ菌のコロニー形成を防止又は減少させることができる。

10

【0078】

シアル酸はまた、炎症細胞と標的細胞との間の細胞接着及び相互作用を媒介する。従って、シアリダーゼを使用した気道上皮細胞表面の治療により、気道表面への塩小細胞の動員を防止することができ、それにより、アレルギー反応(喘息及びアレルギー性鼻炎が含まれる)を治療することができる。

20

【0079】

シアル酸が遺伝子治療ベクターによる細胞侵入を妨害する障壁として役立つので、シアリダーゼを使用した標的細胞の治療によって形質導入効率を増加させることができ、それにより、遺伝子療法の有効性を改善することができる。

【0080】

好ましいシアリダーゼは、受容体シアル酸 Neu5Acアルファ(2,6)-Gal及び Neu5Acアルファ(2,3)-Galを分解することができる巨大な細菌シアリダーゼである。例えば、ウエルシュ菌 (*C. perfringens*) (Genbankアクセッション番号 X87369)、アクチノミセス・ビスコサス (*Actinomyces viscosus*)、アルスロバクター・ウレアファシエンス (*Artthrobacter ureafaciens*)、又はミクロモノスポラ・ビリジファシエンス (*Micromonospora viridifaciens*) (Genbankアクセッション番号 D01045) 由来の細菌シアリダーゼ酵素を使用することができる。本発明の化合物の治療ドメインは、巨大な細菌シアリダーゼのアミノ酸配列の全部又は一部を含むことができるか、巨大な細菌シアリダーゼのアミノ酸配列の全部又は一部と実質的に相同なアミノ酸配列を含むことができる。1つの好ましい実施形態では、治療ドメインは、アクチノミセス・ビスコサス (*Actinomyces viscosus*) によってコードされたシアリダーゼ(配列番号12のシアリダーゼ又は配列番号12と実質的に相同なシアリダーゼ配列等)を含む。更に別の好ましい実施形態では、治療ドメインは、配列番号12のアミノ酸274~666にわたるアクチノミセス・ビスコサス (*Actinomyces viscosus*) シアリダーゼの触媒ドメイン又は実質的に相同な配列を含む。

30

40

【0081】

他の好ましいシアリダーゼは、ヒトシアリダーゼ (NEU2 (配列番号8; Genbankアクセッション番号 Y16535; Monti, E, Preti, Rossi, E., Ballabio, A and Borsani G. (1999) Genomics 57:137-143) 及び NEU4 (配列番号9; Genbankアクセッション番号 NM080741; Monti, E, Preti, A, Venerando, B a

50

nd Borsani, G. (2002) *Neurochem Res* 27: 646-663) によってコードされるヒトシアリダーゼ等) である (図3)。本発明の化合物の治療ドメインは、ヒトシアリダーゼのアミノ酸配列の全部又は一部を含むことができるか、ヒトシアリダーゼのアミノ酸配列の全部又は一部と実質的に相同なアミノ酸配列を含むことができる。好ましくは、治療ドメインが天然に存在するシアリダーゼのアミノ酸配列の一部又は天然に存在するシアリダーゼのアミノ酸配列の一部と実質的に相同な配列を含む場合、一部は、ヒトシアリダーゼと本質的に同一の活性を含む。

【0082】

酵素ドメインを含むインフルエンザを防止又は治療するための化合物は、好ましくは、上皮細胞の表面又は表面付近に結合することができるアンカードメインを含む。いくつかの好ましい実施形態では、上皮アンカードメインは、ヒトタンパク質由来のGAG結合配列 (例えば、ヒト血小板因子4 (PF4) (配列番号2)、ヒトインターロイキン8 (IL8) (配列番号3)、ヒトアンチトロンビンIII (ATIII) (配列番号4)、ヒトアポタンパク質E (ApoE) (配列番号5)、ヒト血管関連遊走タンパク質 (human angio-associated migratory protein) (AAMP) (配列番号6)、又はヒトアンフィレグリン (human amphiregulin) (配列番号7) のGAG結合アミノ酸配列等) である (図2)。上皮アンカードメインはまた、天然に存在するGAG結合配列 (図2に列挙した配列等) と実質的に相同であり得る。

【0083】

アンカードメインの非存在下で、病原体感染 (インフルエンザ、パラミクソウイルス、コロナウイルス、ロタウイルス、及び緑膿菌感染又は細菌の感染等であるが、これらに限定されない) の治療又は防止、アレルギー反応及び炎症反応の治療又は予防でヒトシアリダーゼ又はシアリダーゼと実質的に相同なシアリダーゼを含む化合物を使用して組換えウイルスの形質導入効率を改良することも本発明の範囲内である。

【0084】

本発明は、このような感染をシアリダーゼ (A. ビスコサスシアリダーゼ (A. viscosus sialidase) 又はNEU2及びNEU4等のヒトシアリダーゼ等であるが、これらに限定されない) の使用によって防止又は軽減することができることを認識する。シアリダーゼを、選択的に、遺伝子操作若しくは化学的操作又は製剤処方によって、気道上皮での半減期又は保持が改良されるように適合させることができる。

【0085】

インフルエンザウイルスが主に上気道に感染するので、鼻腔及び鼻咽頭領域中での局所的な受容体シアル酸の除去により、感染を防止するか初期感染を妨害することができる。シアリダーゼを鼻内噴霧として上気道に送達させることができ、初期段階のインフルエンザ (又は他のインフルエンザ) における治療様式又は感染前の予防様式のいずれかで使用することができる。或いは、シアリダーゼを、吸入薬として下気道に送達させて、インフルエンザを治療し、インフルエンザの合併症 (気管支肺炎等) を防止することができる。

【0086】

II. 少なくとも1つのシアリダーゼ活性を含む治療組成物

本発明は、少なくとも1つのシアリダーゼ活性を含む治療組成物を含む。シアリダーゼ活性は、任意の供給源 (例えば、細菌又は哺乳動物供給源等) から単離することができるか、天然に存在するシアリダーゼの少なくとも一部と実質的に相同な組換えタンパク質であり得る。好ましいシアリダーゼは、受容体シアル酸Neu5Acアルファ(2,6)-Gal及びNeu5Acアルファ(2,3)-Galを分解することができる巨大な細菌シアリダーゼである。例えば、ウエルシュ菌 (C. perfringens) (Genbankアクセッション番号X87369)、アクチノミセス・ビスコサス (Actinomyces viscosus) (Genbankアクセッション番号L06898)、アルスロバクター・ウレアファシエンス (Arthrobacter ureafaciens)、若しくはマイクロモノスポラ・ピリジファシエンス (Micromonospora

ra viridifaciens) (Genbankアクセッション番号DO 1045) 由来の細菌シアリダーゼ酵素、又は実質的に相同なタンパク質を使用することができる。

【0087】

例えば、本発明の化合物の治療化合物は、巨大な細菌シアリダーゼを含むことができるか、巨大な細菌シアリダーゼのアミノ酸配列を含むタンパク質を含むことができるか、巨大な細菌シアリダーゼのアミノ酸配列と実質的に相同なアミノ酸配列を含むことができる。本発明の好ましい薬学的組成物は、A. ビスコサスシアリダーゼ (*A. viscosus sialidase*) (配列番号12) を含むか、A. ビスコサスシアリダーゼ (*A. viscosus sialidase*) と実質的に相同なタンパク質を含む。

10

【0088】

他の好ましいシアリダーゼは、ヒトシアリダーゼ (NEU2 (配列番号8; Genbankアクセッション番号Y 16535; Monti, E, Preti, Rossi, E., Ballabio, A and Borsani G. (1999) Genomics 57:137-143) 及びNEU4 (配列番号9; Genbankアクセッション番号NM080741; Monti, E, Preti, A, Venerando, B and Borsani, G. (2002) Neurochem Res 27:646-663) によってコードされるヒトシアリダーゼ等) である (図3)。本発明の化合物の治療ドメインは、ヒトシアリダーゼのアミノ酸配列と相同なヒトシアリダーゼタンパク質を含むことができるか、ヒトシアリダーゼのアミノ酸配列の全部又は一部と実質的に相同なアミノ酸配列を含むことができる。好ましくは、治療ドメインが天然に存在するシアリダーゼのアミノ酸配列の一部又は天然に存在するシアリダーゼのアミノ酸配列の一部と実質的に相同な配列を含む場合、一部は、ヒトシアリダーゼと本質的に同一の活性を含む。

20

【0089】

シアリダーゼを含む薬学的組成物は、治療活性も有し得る他の化合物 (他のタンパク質が含まれる) を含むことができる。シアリダーゼを含む薬学的組成物は、組成物の安定性、溶解性、パッケージング、送達、一貫性、味、又は香りを増強することができる他の化合物を含むことができる。

【0090】

シアリダーゼを含む薬学的組成物は、鼻、気管、気管支、経口、又は局所投与のために処方することができるか、注射液又は点眼液として処方することができる。シアリダーゼを含む薬学的組成物を使用して、病原体感染を治療又は防止するか、アレルギー反応又は炎症反応を治療又は防止するか、遺伝子治療のための組換えウイルスの形質導入効率を増強することができる。

30

【0091】

III. シアリダーゼ触媒ドメインタンパク質

本発明はまた、シアリダーゼ触媒ドメインタンパク質を含む。本明細書中で使用される、「シアリダーゼ触媒ドメインタンパク質」は、シアリダーゼの触媒ドメインを含むが、触媒ドメイン配列が由来するシアリダーゼの全てのアミノ酸配列を含まない。シアリダーゼ触媒ドメインタンパク質は、触媒ドメイン配列が由来するシアリダーゼ活性の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも70%を含む。より好ましくは、シアリダーゼ触媒ドメインタンパク質は、触媒ドメイン配列が由来するシアリダーゼ活性の少なくとも90%を含む。

40

【0092】

シアリダーゼ触媒ドメインタンパク質は、他のアミノ酸配列 (更なるシアリダーゼ配列、他のタンパク質由来の配列、又は天然に存在するタンパク配列に由来しない配列等であるが、これらに限定されない) を含むことができる。更なるアミノ酸配列は、多数の機能のいずれか (触媒ドメインタンパク質への他の活性の寄与、シアリダーゼ触媒ドメインタンパク質の発現、プロセッシング、折り畳み、若しくは安定性の増強、又は更に、タンパク質の所望のサイズ若しくは間隔を提供すること) を実施することができる。

50

【0093】

好ましいシアリダーゼ触媒ドメインタンパク質は、A．ビスコサスシアリダーゼ（A．viscosus sialidase）の触媒ドメインを含むタンパク質である。好ましくは、A．ビスコサスシアリダーゼ（A．viscosus sialidase）触媒ドメインタンパク質は、A．ビスコサスシアリダーゼ（A．viscosus sialidase）配列（配列番号12）のアミノ酸270～666を含む。好ましくは、A．ビスコサスシアリダーゼ（A．viscosus sialidase）触媒ドメインタンパク質は、A．ビスコサスシアリダーゼ（A．viscosus sialidase）配列（配列番号12）のアミノ酸270～290のアミノ酸のいずれかから始まり、A．ビスコサスシアリダーゼ（A．viscosus sialidase）配列（配列番号12）のアミノ酸665～901のアミノ酸のいずれかで終わり、アミノ酸1からアミノ酸269までにわたる任意のA．ビスコサスシアリダーゼ（A．viscosus sialidase）タンパク質配列を欠くアミノ酸配列を含む。（本明細書中で使用される、「アミノ酸1からアミノ酸269までにわたる任意のA．ビスコサスシアリダーゼ（A．viscosus sialidase）タンパク質配列を欠く」は、指定されたタンパク質配列又はアミノ酸配列中出现する4つ又はそれを超える連続するアミノ酸の任意のストレッチを欠くことを意味する）。

10

【0094】

いくつかの好ましい実施形態では、A．ビスコサスシアリダーゼ（A．viscosus sialidase）触媒ドメインタンパク質は、A．ビスコサスシアリダーゼ（A．viscosus sialidase）配列（配列番号12）のアミノ酸274～681を含み、他のA．ビスコサスシアリダーゼ（A．viscosus sialidase）配列を欠く。いくつかの好ましい実施形態では、A．ビスコサスシアリダーゼ（A．viscosus sialidase）触媒ドメインタンパク質は、A．ビスコサスシアリダーゼ（A．viscosus sialidase）配列（配列番号12）のアミノ酸274～666を含み、任意の他のA．ビスコサスシアリダーゼ（A．viscosus sialidase）配列を欠く。いくつかの好ましい実施形態では、A．ビスコサスシアリダーゼ（A．viscosus sialidase）触媒ドメインタンパク質は、A．ビスコサスシアリダーゼ（A．viscosus sialidase）配列（配列番号12）のアミノ酸290～666を含み、任意の他のA．ビスコサスシアリダーゼ（A．viscosus sialidase）配列を欠く。更に他の好ましい実施形態では、A．ビスコサスシアリダーゼ（A．viscosus sialidase）触媒ドメインタンパク質は、A．ビスコサスシアリダーゼ（A．viscosus sialidase）配列（配列番号12）のアミノ酸290～681を含み、任意の他のA．ビスコサスシアリダーゼ（A．viscosus sialidase）配列を欠く。

20

30

【0095】

本発明はまた、シアリダーゼの触媒ドメインを含む本発明のタンパク質ベースの化合物をコードする核酸分子を含む。核酸分子は、特定の細胞型（例えば、大腸菌細胞又はヒト細胞等）における発現のために至適化されたコドンを含し得る。少なくとも1つの触媒ドメインを含む本発明のタンパク質ベースの化合物をコードする本発明の核酸分子はまた、他の核酸配列（遺伝子発現を増強する配列が含まれるが、これに限定されない）を含むことができる。核酸分子は、ベクター（発現ベクター等であるが、これに限定されない）中に存在し得る。

40

【0096】

融合タンパク質

シアリダーゼ触媒ドメインタンパク質は、少なくとも1つの触媒ドメイン及び少なくとも1つの他のタンパク質ドメイン（精製ドメイン、タンパク質タグ、タンパク質安定性ドメイン、可溶性ドメイン、タンパク質サイズ増加ドメイン、タンパク質折り畳みドメイン、タンパク質局在化ドメイン、アンカードメイン、N末端ドメイン、C末端ドメイン、触

50

媒活性ドメイン、結合ドメイン、又は触媒活性増強ドメインが含まれるが、これらに限定されない)を含む融合タンパク質であり得る。好ましくは、少なくとも1つの他のタンパク質ドメインは、別の供給源に由来する(別のタンパク質由来の配列等であるが、これに限定されない)。少なくとも1つの他のタンパク質ドメインは、任意の公知のタンパク質配列に基づく必要はないが、融合タンパク質中で任意の機能を果たすように操作し、経験的に試験することができる。

【0097】

精製ドメインには、非限定的な例として、1つ又はそれ以上のhisタグ、カルモジュリン結合ドメイン、マルトース結合ドメイン、ストレプトアビジンドメイン、ストレプトアビジン結合ドメイン、インテインドメイン、又はキチン結合ドメインが含まれ得る。タンパク質タグは、タンパク質の抗体検出のために使用することができる配列(例えば、mycタグ、血球凝集素タグ、又はFLAGタグ等)を含み得る。タンパク質の発現、修飾、折り畳み、安定性、サイズ、又は局在化を増強するタンパク質ドメインは、公知のタンパク質又は操作されたタンパク質の配列に基づき得る。他のタンパク質ドメインは、結合活性又は触媒活性を有し得るか、シアリダーゼ触媒ドメインの触媒活性を増強することができる。

【0098】

本発明の好ましい融合タンパク質は、少なくとも1つのシアリダーゼ触媒ドメイン及び少なくとも1つのアンカードメインを含む。好ましいアンカードメインは、GAG結合ドメイン(GAG結合ドメイン等)又はヒトアンフィレグリン(human amphiregulin)(配列番号7)を含む。

【0099】

本発明の融合タンパク質のシアリダーゼ触媒ドメイン及び他のドメインを、選択的に、リンカー(ペプチドリinker等であるが、これに限定されない)によって連結することができる。種々のペプチドリinkerが当該分野で公知である。好ましいリンカーは、グリシンを含むペプチドリinker(G-G-G-G-S(配列番号10))である。

【0100】

本発明はまた、シアリダーゼの触媒ドメインを含む本発明の融合タンパク質をコードする核酸分子を含む。核酸分子は、特定の細胞型(例えば、大腸菌細胞又はヒト細胞等)における発現のために至適化されたコドンを含み得る。本発明の融合タンパク質をコードする本発明の核酸分子はまた、他の核酸配列(遺伝子発現を増強する配列が含まれるが、これに限定されない)を含むことができる。核酸分子は、ベクター(発現ベクター等であるが、これに限定されない)中に存在し得る。

【0101】

IV. 薬学的組成物

本発明は、薬学的組成物として処方された本発明の化合物を含む。薬学的組成物は、薬学的に許容可能なキャリア又は希釈剤中に薬学的有効量の化合物を有する、保存及び好ましくはその後の投与のために調製された薬学的に許容可能なキャリアを含む。治療用の許容可能なキャリア又は希釈剤は薬学分野で周知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA(1990)に記載されている。防腐剤、安定剤、色素、及び更に香味物質を、薬学的組成物中に含めることができる。例えば、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸、及びp-ヒドロ安息香酸のエステルを、防腐剤として添加することができる。更に、抗酸化剤及び懸濁剤を使用することができる。

【0102】

標的細胞に依存して、本発明の化合物を、経口投与のための錠剤、カプセル、又はエリキシル;局所投与のための蠟膏又は軟膏;直腸投与のための座剤;吸入薬又は鼻内噴霧として使用するための滅菌溶液及び懸濁液等;として処方し、使用することができる。溶液又は懸濁液、注射前の溶液又は懸濁液に適切な固体形態、又は乳濁液のいずれかとしての従来の形態で注射液を調製することもできる。適切な賦形剤は、例えば、水、生理食塩水

10

20

30

40

50

、デキストロース、マンニトール、乳糖、レシチン、アルブミン、グルタミン酸ナトリウム、及び塩酸システイン等である。更に、必要に応じて、注射用薬学的組成物は、少量の非毒性賦形剤（湿潤剤及びpH緩衝剤）を含むことができる。

【0103】

用量として必要な薬学的有効量の試験化合物は、投与経路、治療を受ける動物又は患者の型、及び検討中の特定の動物の身体特性に依存する。用量を、所望の効果をに合わせることができるが、体重、食事、同時に行う投薬等の要因及び医学分野の当業者が認識する他の要因に依存する。本発明の方法の実施では、薬学的組成物を、単独又は互いに組み合わせ使用するか、他の治療薬又は診断薬と組み合わせ使用することができる。これらの生成物を、*in vivo*で、好ましくは、哺乳動物患者、好ましくはヒト、又は*in vitro*で使用することができる。*in vivo*での生成物の使用では、薬学的組成物を、種々の方法（局所、非経口、静脈内、皮下、筋肉内、結腸、直腸、鼻腔内、又は腹腔内が含まれる）にて種々の投薬形態を使用して患者に投与することができる。このような方法を、*in vivo*での試験化合物の活性の試験で使用することもできる。

10

【0104】

好ましい実施形態では、これらの薬学的組成物は、経口投与可能な懸濁液、溶液、錠剤、又はロゼンジ；鼻内噴霧；吸入薬；注射液、局所噴霧、軟膏、粉末、又はゲルの形態であり得る。

【0105】

懸濁液として経口投与する場合、本発明の組成物を、製剤処方分野で周知の技術に従って調製し、嵩増しするための微結晶性セルロース、懸濁剤としてのアルギン酸又はアルギン酸ナトリウム、増粘剤としてのメチルセルロース、及び当該分野で公知の甘味料／香味物質を含むことができる。即効型錠剤として、これらの組成物は、当該分野で公知の微結晶性セルロース、第二リン酸カルシウム、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、及び乳糖、並びに／又は他の賦形剤、結合剤、増量剤、崩壊剤、希釈剤、及び潤滑剤を含むことができる。うがい液又はリンスの処方中の成分には、当該分野で公知の抗菌薬、界面活性剤、共力剤（*cosurfactant*）、オイル、水、及び他の添加剤（甘味料／香味物質等）が含まれる。

20

【0106】

飲用溶液によって投与される場合、組成物は、水に溶解され、適切なpHに調整され、キャリアを含む1つ又はそれ以上の本発明の化合物を含む。化合物を、蒸留水、水道水、及び湧き水等に溶解することができる。pHを、好ましくは、約3.5と約8.5との間に調整することができる。甘味料（例えば、約1%（w/v）スクロース）を添加することができる。

30

【0107】

米国特許第3,439,089号（これらの目的のために本明細書中で参考として援用される）に従ってロゼンジを調製することができる。

【0108】

鼻エアゾール又は吸入によって投与する場合、薬学的組成物を、製剤処方分野で周知の技術に従って調製し、当該分野で公知のベンジルアルコール若しくは他の適切な防腐剤、生物学的利用能を増強するための吸収促進剤、フルオロカーボン、及び／又は他の可溶化剤又は分散剤を使用した生理食塩水溶液として調製することができる。例えば、Ansell, H. C. et al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Sixth Ed. (1995)を参照。好ましくは、これらの組成物及び処方物を、適切な非毒性の薬学的に許容可能な成分を使用して調製する。これらの成分は、鼻投薬形態の調製分野の当業者に公知であり、これらのいくつかは、Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)（本分野の標準的基準）で見出すことができる。適切なキャリアの選択は、所望の鼻投薬形態（例えば、溶液、懸濁液、軟膏、又はゲル）の性質に非

40

50

常に厳密に依存する。鼻投薬形態は、一般に、有効成分に加えて、大量の水を含む。pH調整剤、乳化剤、又は分散剤、防腐剤、界面活性剤、ゲル化剤、又は緩衝剤、及び他の安定剤及び可溶化剤等の少量の他の成分も存在し得る。好ましくは、鼻投薬形態は、鼻分泌物と等張であるべきである。

【0109】

鼻処方物を、点滴薬、噴霧薬、エアゾール、又は任意の他の鼻腔内投薬形態として投与することができる。選択的に、送達系は、単位用量送達系であり得る。用量あたりで送達される溶液又は懸濁液の体積は、好ましくは、約5～約2000ml、より好ましくは約10～1000ml、更により好ましくは約50～約500mlのいずれかであり得る。これらの種々の投薬形態のための送達系は、単位用量又は複数回投与パッケージ中のドロップボトル、プラスチック製のスクイズユニット、霧吹き、噴霧器、又は薬用エアゾールであり得る。

10

【0110】

本発明の処方物を、以下を含めるために変化させることができる：(1)pHを調整するための他の酸及び塩基、(2)ソルビトール、グリセリン、及びデキストロース等の他の等張化剤、(3)他のパラヒドロキシ安息香酸エステル、安息香酸塩、プロピオン酸塩、クロロブタノール、フェニルエチルアルコール、塩化ベンザルコニウム、及び水銀剤等の他の抗菌防腐剤、(4)カルボキシメチルセルロースナトリウム、微結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、及び他のガム等の他の増粘剤、(5)適切な吸収促進剤、(6)亜硫酸水素塩及びアスコルビン酸塩のような抗酸化剤、エデト酸ナトリウム等の金属キレート剤、並びにポリエチレングリコール等の薬物溶解促進剤等の安定剤。

20

【0111】

V. 病原体による感染を防止又は治療する方法

本発明はまた、病原体による感染を防止又は治療する方法を含む。1つの態様では、本方法は、病原体に感染した被験体又は病原体に感染するリスクのある被験体を標的細胞の表面又は表面付近に化合物をアンカーする少なくとも1つのアンカードメイン及び病原体による標的細胞の感染を防止することができる少なくとも1つの細胞外活性を有するペプチド又はタンパク質を含む少なくとも1つの治療ドメインを含む化合物を含む本発明の組成物で治療するステップを含む。いくつかの好ましい実施形態では、本方法は、治療有効量の本発明の薬学的組成物を被験体の上皮細胞に適用するステップを含む。治療すべき被験体は、動物又はヒト被験体であり得る。

30

【0112】

別の態様では、本方法は、病原体に感染した被験体又は病原体に感染するリスクのある被験体をシアリダーゼ活性を含むタンパク質ベースの化合物を含む本発明の薬学的組成物で治療するステップを含む。いくつかの好ましい実施形態では、治療有効量の本発明の薬学的組成物被験体の上皮細胞に適用するステップを含む。シアリダーゼ活性は、単離された天然に存在するシアリダーゼタンパク質又は天然に存在するシアリダーゼの少なくとも一部と実質的に相同な組換えタンパク質であり得る。好ましい薬学的組成物は、A.ビスコサスシアリダーゼ(A. viscosus sialidase)(配列番号12)と実質的に相同なシアリダーゼを含む。治療すべき被験体は、動物又はヒト被験体であり得る。

40

【0113】

更に別の態様では、本方法は、病原体に感染した被験体又は病原体に感染するリスクのある被験体をシアリダーゼ触媒ドメインを含むタンパク質ベースの化合物を含む本発明の薬学的組成物で治療するステップを含む。いくつかの好ましい実施形態では、本方法は、治療有効量の本発明の薬学的組成物を被験体の上皮細胞に適用するステップを含む。シアリダーゼ触媒ドメインは、好ましくは、天然に存在するシアリダーゼの触媒ドメインと実質的に相同であり得る。好ましい薬学的組成物は、A.ビスコサスシアリダーゼ(A. viscosus sialidase)(配列番号12)のアミノ酸274～666と実

50

質的に相同なシアリダーゼ触媒ドメインを含む。治療すべき被験体は、動物又はヒト被験体であり得る。

【0114】

病原体は、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、コロナウイルス、ロタウイルス、肺炎球菌(*S. pneumoniae*)、肺炎マイコプラズマ、インフルエンザ菌、カタル球菌、緑膿菌、及びピロリ菌であり得る。1つの好ましい実施形態では、病原体は、インフルエンザウイルスである。

【0115】

本発明の化合物を、ヒト又は動物のためにデザインすることができる。本発明のいくつかの態様では、本発明の化合物を使用して、動物クラス(哺乳動物等)の病原体感染を防止することができる。本発明のいくつかの態様では、組成物をヒト及び動物のために使用することができる(しかし、処方とは異なっても良い)。これらの態様では、化合物の活性ドメインは、1つをこえる病原体の種、型、サブタイプ、又は株に対して有効であり、1つを超える宿主種で活性であり得る。例えば、インフルエンザウイルスのHAタンパク質のプロセッシングを防止するプロテアーゼインヒビター若しくは標的細胞からシアル酸受容体を除去するシアリダーゼ等の活性ドメイン又はヘパリン若しくはヘパラン硫酸に結合するドメイン等のアンカードメインを含む本発明のいくつかの好ましい化合物を、トリ、哺乳動物、又はヒトで使用することができる。異なる宿主種に感染する能力を有する一定範囲の病原体に対して有効であり得るこのような化合物を、ヒトで使用して、他の種を天然に宿主とする病原体による感染と戦うこともできる。

【0116】

本発明のいくつかの好ましい実施形態では、薬学的組成物はインフルエンザによる感染を防止し、治療有効量の薬学的組成物を被験体の気道上皮細胞に適用する。吸入器の使用又は鼻内噴霧の使用によってこれを行うことができる。好ましくは、吸入器又は鼻内噴霧を、1日に1~4回使用する。

【0117】

インフルエンザウイルスが主に上気道に感染するので、鼻腔、咽頭、気管、及び気管支中での局所的な受容体シアル酸の除去により、感染を防止するか初期感染を妨害することができる。シアリダーゼを鼻内噴霧又は吸入薬として上気道に送達させることができ、初期段階のインフルエンザ(又は他のインフルエンザ)における治療様式又は感染前の予防様式のいずれかで使用することができる。或いは、シアリダーゼを、吸入薬として下気道に送達させて、インフルエンザを治療し、インフルエンザの合併症(気管支肺炎等)を防止することができる。同様に、シアリダーゼを鼻内噴霧又は吸入薬として送達させて、パラインフルエンザウイルス及びコロナウイルスによる感染を防止又は軽減することができる。吸入薬又は鼻内噴霧として送達させて、病原菌(肺炎球菌(*S. pneumoniae*)、肺炎マイコプラズマ、インフルエンザ菌、カタル球菌、及び緑膿菌が含まれる)による気道コロニー形成を防止又は軽減することもできる。治療化合物を、選択的に、遺伝子操作若しくは化学的操作又は製剤処方によって、気道上皮での半減期又は保持を改良するように適合させることができる。更に、典型的には、点眼液、噴霧、又は軟膏の形態で眼又は外科創傷に送達させて、細菌感染(緑膿菌による感染が含まれる)を防止及び治療することができる。経口投与してピロリ菌による感染を治療することもできる。

【0118】

投薬量

当業者に容易に明らかとなるように、投与すべき有用な*in vivo*投薬量及び特定の投与様式は、治療を受ける患者の年齢、体重、及び型、使用される特定の薬学的組成物、及び薬学的組成物が使用される特定の用途によって変化する。所望の結果を達成するために必要な用量レベルである有効投薬レベルを、当業者は、上記で考察された日常的方法を使用して決定することができる。非ヒト動物研究では、薬学的組成物の適用を、より高い用量レベルで開始し、所望の効果がもはや達成されなくなるか、副作用が減少又は消滅するまで投薬量を減少させる。本発明の化合物の投薬量は、所望の効果、治療指標(*th*

erapeutic indication)、投与経路、並びに化合物の純度及び活性に広く依存した範囲であり得る。典型的には、生成物のヒト臨床適用を、より低い投薬量レベルで開始し、所望の効果が達成されるまで投薬量レベルを増加させる。或いは、許容可能な *in vivo* 研究を使用して、試験化合物の有用な用量及び投与経路を確立することができる。典型的には、投薬量は、約 1 ng/kg と約 10 mg/kg との間、好ましくは約 10 ng/kg と約 1 mg/kg との間、より好ましくは約 100 ng/kg と約 100 マイクログラム/kg との間であり得る。

【0119】

正確な処方、投与経路、及び投薬量を、患者の条件を考慮して、各医師が選択することができる (Fingle et al., in The Pharmacological Basis of Therapeutics (1975) を参照)。主治医は、毒性、臓器機能障害、又は他の副作用によって投与を終了、干渉、又は調整する方法及び時期を承知していることに留意すべきである。逆に、主治医は、臨床反応が適切でない場合により高いレベルに治療を調整する方法も承知しているであろう。目的の障害の管理における投与量の規模は、治療すべき容態の重症度及び投与経路によって変化する。容態の重症度を、例えば、標準的な予後評価方法によって一部を評価することができる。更に、用量及びおそらく投与頻度も、各患者 (動物への適用が含まれる) の年齢、体重、及び応答によって変化する。

【0120】

従って、本発明によれば、インフルエンザウイルス感染の治療及びインフルエンザウイルス感染の防止のための治療方法及び薬学的組成物を更に提供する。治療は、このような治療を必要とする患者に薬学的キャリア及び治療有効量の本発明の任意の組成物又はその薬学的に許容可能な塩を投与するステップを含む。

【0121】

1つの好ましい投与計画では、吸入器、鼻内噴霧、又は経口ロゼンジによって適切な投薬量を各患者に投与する。しかし、任意の特定の患者のために特定の投与レベル及び投薬頻度を変化させることができ、これらは、種々の要因 (使用される特定の塩又は他の形態の活性、化合物の代謝安定性及び作用期間、年齢、体重、一般的健康状態、性別、食事、投与様式及び投与時間、排泄速度、薬物の組み合わせ、特定の容態の重症度、並びに治療を受ける宿主が含まれる) が含まれる) に依存すると理解される。

【0122】

VI. アレルギー反応及び炎症反応を軽減、防止、又は治療する方法

本発明はまた、被験体のアレルギー反応及び炎症反応を軽減、防止、又は治療する方法を含む。

【0123】

1つの態様では、本方法は、シアリダーゼ活性を含むタンパク質ベースの化合物を含む本発明の薬学的組成物で被験体のアレルギー反応及び炎症反応を防止又は治療するステップを含む。いくつかの好ましい実施形態では、本方法は、治療有効量の本発明の薬学的組成物を被験体の上皮細胞に適用するステップを含む。シアリダーゼ活性は、単離された天然に存在するシアリダーゼタンパク質又は天然に存在するシアリダーゼの少なくとも一部と実質的に相同な組換えタンパク質であり得る。好ましい薬学的組成物は、A. ビスコサスシアリダーゼ (A. viscosus sialidase) (配列番号12) と実質的に相同なシアリダーゼを含む。治療すべき被験体は、動物又はヒト被験体であり得る。

【0124】

更に別の態様では、本方法は、シアリダーゼ触媒ドメインを含むタンパク質ベースの化合物を含む本発明の薬学的組成物で被験体のアレルギー反応及び炎症反応を防止又は治療するステップを含む。いくつかの好ましい実施形態では、本方法は、治療有効量の本発明の薬学的組成物を被験体の上皮細胞に適用するステップを含む。シアリダーゼ触媒ドメインは、好ましくは、天然に存在するシアリダーゼの触媒ドメインと実質的に相同であり得る。好ましい薬学的組成物は、A. ビスコサスシアリダーゼ (A. viscosus s

ialidase) (配列番号12)のアミノ酸274~666と実質的に相同なシアリダーゼ触媒ドメインを含む。治療すべき被験体は、動物又はヒト被験体であり得る。

【0125】

アレルギー反応及び炎症反応は、急性又は慢性容態であり、非限定的な例として、喘息、呼吸困難を引き起こす他のアレルギー反応、アレルギー性鼻炎、湿疹、乾癬、植物毒素若しくは動物毒素への曝露、又は自己免疫性容態が含まれ得る。

【0126】

いくつかの好ましい実施形態では、本発明の化合物を、吸入薬又は鼻内噴霧として送達させて、気道の炎症(喘息及びアレルギー性鼻炎が含まれるが、これらに限定されない)を防止又は治療することができる。シアリダーゼ活性を含む本発明の化合物(シアリダーゼ触媒ドメインタンパク質及びシアリダーゼ融合タンパク質が含まれる)を、点眼液、点耳剤、若しくは噴霧剤、又は皮膚に適用される軟膏、ローション、若しくはゲルとして投与することもできる。別の態様では、本方法は、静脈内注射又は局所注射として投与するシアリダーゼ活性を含む本発明で炎症性疾患患者を治療するステップを含む。

【0127】

投薬量

当業者に容易に明らかとなるように、投与すべき有用な *in vivo* 投薬量及び特定の投与様式は、治療を受ける患者の年齢、体重、及び型、使用される特定の薬学的組成物、及び薬学的組成物が使用される特定の用途によって変化する。所望の結果を達成するために必要な用量レベルである有効投薬レベルを、当業者は、上記で考察された日常的方法を使用して決定することができる。非ヒト動物研究では、薬学的組成物の適用を、より高い用量レベルで開始し、所望の効果がもはや達成されなくなるか、副作用が減少又は消滅するまで投薬量を減少させる。本発明の化合物の投薬量は、所望の効果、治療指標(therapeutic indication)、投与経路、並びに化合物の純度及び活性に広く依存した範囲であり得る。典型的には、生成物のヒト臨床適用を、より低い投薬量レベルで開始し、所望の効果が達成されるまで投薬量レベルを増加させる。或いは、許容可能な *in vivo* 研究を使用して、試験化合物の有用な用量及び投与経路を確立することができる。典型的には、投薬量は、約1 ng/kgと約10 mg/kgとの間、好ましくは約10 ng/kgと約1 mg/kgとの間、より好ましくは約100 ng/kgと約100 マイクログラム/kgとの間であり得る。

【0128】

正確な処方、投与経路、及び投薬量を、患者の条件を考慮して、各医師が選択することができる(Fingle et al., in The Pharmacological Basis of Therapeutics (1975)を参照)。主治医は、毒性、臓器機能障害、又は他の副作用によって投与を終了、干渉、又は調整する方法及び時期を承知していることに留意すべきである。逆に、主治医は、臨床反応が適切でない場合により高いレベルに治療を調整する方法も承知しているであろう。目的の障害の管理における投与量の規模は、治療すべき容態の重症度及び投与経路によって変化する。容態の重症度を、例えば、標準的な予後評価方法によって一部を評価することができる。更に、用量及びおそらく投与頻度も、各患者(動物への適用が含まれる)の年齢、体重、及び応答によって変化する。

【0129】

いくつかの好ましい投与計画では、吸入器、鼻内噴霧、又は局所への塗布によって適切な投薬量を各患者に投与する。しかし、任意の特定の患者のために特定の投与レベル及び投薬頻度を変化させることができ、これらは、種々の要因(使用される特定の塩又は他の形態の活性、化合物の代謝安定性及び作用期間、年齢、体重、一般的健康状態、性別、食事、投与様式及び投与時間、排泄速度、薬物の組み合わせ、特定の容態の重症度、並びに治療を受ける宿主が含まれる)に依存すると理解される。

【0130】

VII．組換えウイルスベクターによる遺伝子送達を増強する方法

10

20

30

40

50

本発明はまた、組換えウイルスベクターによる遺伝子送達方法を含む。1つの態様では、本方法は、少なくとも1つの組換えウイルスベクターの投与前又は投与と組み合わせて少なくとも1つの細胞に治療有効量のシアリダーゼ活性を有するタンパク質を含む本発明の化合物を投与するステップを含む。本発明の組成物を、少なくとも1つの組換えウイルスベクターとして同一の処方物中に含めることができるか、個別の処方物中に含めることができる。

【0131】

いくつかの好ましい実施形態では、本方法は治療有効量の本発明の組成物及び組換えウイルスベクターを被験体の細胞に適用するステップを含む。治療すべき被験体は、動物又はヒト被験体であり得る。特に好ましい実施形態では、組換えウイルスベクターを使用して、遺伝子治療のために被験体の上皮標的細胞に形質導入する。例えば、組換えウイルスベクターを使用して、嚢胞性線維症の被験体の気道上皮細胞に形質導入することができる。この場合、本発明の化合物を、吸入器によって投与することができる。治療遺伝子を含む組換えウイルスを、同時又は個別に投与することができる。

10

【0132】

他の実施形態では、細胞を、*in vitro*又は「*ex vivo*」で（すなわち、形質導入後に被験体に移植すべき被験体から取り出した細胞）、本発明の化合物及び組換えウイルスベクターで治療することができる。

【0133】

シアリダーゼ活性は、単離された天然に存在するシアリダーゼタンパク質又は天然に存在するシアリダーゼの少なくとも一部と実質的に相同な組換えタンパク質（シアリダーゼ触媒ドメインが含まれる）であり得る。好ましい薬学的組成物は、A．ビスコサスシアリダーゼ（*A. viscosus sialidase*）（配列番号12）と実質的に相同なシアリダーゼを含む。

20

【0134】

本発明の化合物を、組換えウイルス投与の1日前から2時間後までに標的細胞に投与することができる。好ましくは、本発明の化合物を、組換えウイルス投与の4時間～10分前に標的細胞に投与する。投与は、・・・であり得る。

【0135】

組換えウイルスは、好ましくは、哺乳動物細胞（好ましくは、ヒト細胞等）に遺伝子を導入するために使用することができる組換えウイルスであり得る。例えば、組換えウイルスは、レトロウイルス（レンチウイルスが含まれる）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、又は単純ヘルペスウイルス1型であり得る。組換えウイルスは、標的細胞に導入されるべき少なくとも1つの外因性遺伝子を含む。遺伝子は、好ましくは、治療遺伝子であるが、必ずしもそうではない。例えば、遺伝子は、細胞に印をつけるか、薬物耐性を付与するために使用される遺伝子であり得る。

30

【0136】

好ましい実施形態では、本発明は、遺伝子治療ベクターの有効性を改良する方法を含む。本方法は、同一又は個別の処方物中で組換えベクターと共にシアリダーゼ活性を含む本発明の化合物で患者を治療するステップを含む。シアリダーゼ活性を有する本発明の化合物を、組換えベクターの投与前、同時、又は更に投与後に患者に投与することができる。1つの実施形態では、シアリダーゼは、A．ビスコサスシアリダーゼ（*A. viscosus sialidase*）（配列番号12）又はその一部と実質的に相同である。1つの好ましい実施形態では、シアリダーゼは、A．ビスコサスシアリダーゼ（*A. viscosus sialidase*）の触媒ドメインを含む。別の実施形態では、組換えウイルスはAAVである。更に別の実施形態では、疾患は、嚢胞性線維症である。更に別の実施形態では、組換えウイルスは、嚢胞性線維症膜通過伝導制御因子（CFTR）遺伝子を含む。

40

【0137】

投薬量

50

当業者に容易に明らかとなるように、投与すべき有用な *in vivo* 投薬量及び特定の投与様式は、治療を受ける患者の年齢、体重、及び型、使用される特定の薬学的組成物、及び薬学的組成物が使用される特定の用途によって変化する。所望の結果を達成するために必要な用量レベルである有効投薬レベルを、当業者は、上記で考察された日常的方法を使用して決定することができる。非ヒト動物研究では、薬学的組成物の適用を、より高い用量レベルで開始し、所望の効果がもはや達成されなくなるか、副作用が減少又は消滅するまで投薬量を減少させる。本発明の化合物の投薬量は、所望の効果、治療指標 (therapeutic indication)、投与経路、並びに化合物の純度及び活性に広く依存した範囲であり得る。典型的には、生成物のヒト臨床適用を、より低い投薬量レベルで開始し、所望の効果が達成されるまで投薬量レベルを増加させる。或いは、許容可能な *in vivo* 研究を使用して、試験化合物の有用な用量及び投与経路を確立することができる。典型的には、投薬量は、約 1 ng/kg と約 10 mg/kg との間、好ましくは約 10 ng/kg と約 1 mg/kg との間、より好ましくは約 100 ng/kg と約 100 マイクログラム/kg との間であり得る。

【0138】

正確な処方、投与経路、及び投薬量を、患者の条件を考慮して、各医師が選択することができる (Fingle et al., in The Pharmacological Basis of Therapeutics (1975) を参照)。主治医は、毒性、臓器機能障害、又は他の副作用によって投与を終了、干渉、又は調整する方法及び時期を承知していることに留意すべきである。逆に、主治医は、臨床反応が適切でない場合により高いレベルに治療を調整する方法も承知しているであろう。目的の障害の管理における投与量の規模は、治療すべき容態の重症度及び投与経路によって変化する。容態の重症度を、例えば、標準的な予後評価方法によって一部を評価することができる。更に、用量及びおそらく投与頻度も、各患者 (動物への適用が含まれる) の年齢、体重、及び応答によって変化する。

【0139】

いくつかの好ましい投与計画では、吸入器、鼻内噴霧、又は局所への塗布によって適切な投薬量を各患者に投与する。しかし、任意の特定の患者のために特定の投与レベル及び投薬頻度を变化させることができ、これらは、種々の要因 (使用される特定の塩又は他の形態の活性、化合物の代謝安定性及び作用期間、年齢、体重、一般的健康状態、性別、食事、投与様式及び投与時間、排泄速度、薬物の組み合わせ、特定の容態の重症度、並びに治療を受ける宿主が含まれる) に依存すると理解される。

【0140】

実施例

実施例 1: アプロチニン (aprotinin gene) の合成、アプロチニン融合タンパク質の精製及び試験

序論

インフルエンザウイルスタンパク質血球凝集素 (HA) は、主なインフルエンザエンベロープタンパク質である HA はウイルス感染において重要な役割を果たす。HA の重要性は、HA が宿主免疫応答によって産生された防御中和抗体の主な標的であるという事実によって証明されている (Hayden, F.G. (1996) In Antiviral drug resistance (ed. D.D. Richman), pp. 59-77. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd.)。HA はウイルス感染において 2 つの異なる機能を有することが現在明らかである。第 1 に、HA は、シアル酸細胞受容体へのウイルスの付着を担う。第 2 に、HA は、ウイルスエンベロープの細胞膜との融合の誘発による標的細胞へのウイルスの侵入を媒介する。

【0141】

HA は、前駆体タンパク質 (HA0) として合成され、これが三量体細胞複合体としてゴルジ装置を介して細胞表面に移動される。HA0 は更に切断されて、C 末端 HA1 (は 0 の残基 328) 及び HA0 の N 末端を生成する。一般に、細胞表面又は放出されたウイ

ルス上で切断が起こると考えられる。HA0のHA1/HA2への切断は、HAのシアル酸受容体への結合に必要なが、ウイルス感染力に不可欠である(Klenk, HD and Rott, R. (1988) Adv Vir Res. 34: 247-281; Kido, H, Niwa, Y, Beppu, Y and Towatari, T. (1996) Advan Enzyme Regul 36: 325-347; Skehel, J J and Wiley, DC. (2000) Annu Rev Biochem 69: 531-569)。

【0142】

宿主プロテアーゼに対するHA0の感受性を、HA0分子の外部ループ中のタンパク質分解部位によって決定する。タンパク質分解部位は、R-X-K/R-Rモチーフ中に1つのArg又はLys残基(一塩基切断部位)又はいくつかのLys及び/又はArg残基(多塩基切断部位)を含むことができる。インフルエンザA型ウイルスサブタイプH5及びH7のみが、多塩基切断部位を保有するHAタンパク質を有する。他の全てのインフルエンザA型、B型、及びC型ウイルスは、一塩基切断部位を有するHAタンパク質を含む。多塩基切断部位を含むインフルエンザA型ウイルスは、より感染力が強く、宿主の全身感染を誘導する一方で、一塩基HA部位を有するウイルスは哺乳動物の気道又はトリ種の気道及び腸管のみで感染を開始する(概説については、Klenk, HD and Garten W. 1994. Trend Micro 2: 39-43)。幸いにも、多塩基切断部位を保有する強毒性トリインフルエンザA型H5及びH7サブタイプによるヒト感染は、今までのところ、ほとんどが香港で発見されたほんの一握りの症例のみで起きている。大部分のインフルエンザ感染は、一塩基切断部位で切断されるHAタンパク質を有するウイルスに起因する。

【0143】

多塩基切断部位を含むインフルエンザウイルスHAサブタイプ5及び7は、フリン(furin)(サブチリシン様エンドプロテアーゼメンバー又はプレタンパク質コンバーターゼファミリー)によって活性化される。フリン(furin)はウイルスを細胞内で切断し、多数の細胞型に遍在し、このようなウイルスと共に認められる強毒性の全身感染を可能にする(Klenk, HD and Garten W. 1994. Trend Micro 2: 39-43; Nakayama, K. 1997. Biochem 327: 625-635)。一塩基切断部位を有するHAを有する全ての他のインフルエンザウイルスは、分泌されたトリプシン様セリンプロテアーゼによって活性化される。インフルエンザウイルス活性化に関与している酵素には以下が含まれる: プラスミン(Lazarowitz SG, Goldberg AR and Choppin PW. 1973. Virology 56: 172-180)、ミニプラスミン(Murakami M, Towatari T, Ohuchi M, Shiota M, Akao M, Okumura Y, Parry MA and Kido H. (2001) Eur J Biochem 268: 2847-2855)、トリプターゼ・クララ(Kido H, Chen Y and Murakami M. (1999) In B. Dunn(ed.), Proteases of infectious agents, p. 205-217, Academic Press, New York, N.Y)、カリクレイン、ウロキナーゼエ、トロンピン(Scheiblaue H, Reinacher M, Tashiro M and Rott R. (1992) J Infect Dis 166: 783-791)、血液凝固因子Xa(Gotoh B, Ogasawara T, Toyoda T, Inocencio N, Hamaguchi M and Nagai Y. (1990) EMBO J 9: 4189-4195)、アクロシン(Garten W, Bosch FX, Linder D, Rott R and Klenk HD. (1981) Virology 115: 361-374.)、ヒト呼吸器洗浄物由来のプロテアーゼ(Barbey-Morel CL, Oeltmann TN, Edwards KM and Wright PF. (1987) J Infect Dis 155: 667-672)、黄色ブドウ球菌由来の細菌プロテアーゼ(Tashi

ro M, Ciborowski P, Reinacher M, Pulverer G, Klenk HD and Rott R. (1987) *Virology* 157: 421-430)、及び緑膿菌由来の細菌プロテアーゼ (Callan RJ, Hartmann FA, West SE and Hinshaw VS. (1997) *J Virol* 71: 7579-7585)。宿主セリンプロテアーゼによるインフルエンザウイルスの活性化は、一般に、原形質膜又は細胞からのウイルス放出後に細胞外で起こると考えられる。

【0144】

トラシロール又はウシ膵臓トリプシンインヒビター (BPTI) ととも呼ばれるアプロチニンは、58アミノ酸を有するポリペプチドである。これは、Kunitz型インヒビターファミリーに属し、広範なセリンプロテアーゼ (トリプシン、キモトリプシン、プラスミン、及び血漿カリクレインが含まれる) を競合的に阻害する。アプロチニンは、長い間、ヒト治療薬として使用されている (膵臓炎、ショック症候群の種々の状態、高線維素溶解性出血、及び心筋梗塞等)。開心術 (心肺バイパス手術が含まれる) で失血を減少させるためにも使用されている (Fritz H and Wunderer G. (1983) *Arzneim-Forsch* 33: 479-494)。

10

【0145】

ヒトにおけるアプロチニンの安全性は、何年にもわたる臨床適用によって十分に立証されている。更に、アプロチニン特異的抗体がヒト血清でこれまで認められていないので、アプロチニンは、明らかに非常に弱い免疫原である (Fritz H and Wunderer G. (1983) *Arzneim-Forsch* 33: 479-494)。薬物候補としてのアプロチニンの別の所望の特徴は、優れた安定性である。これは、室温で少なくとも18ヶ月間いかなる活性の喪失もなく保持することができる ((Fritz H and Wunderer G. (1983) *Arzneim-Forsch* 33: 479-494))。

20

【0146】

実施された動物研究で有意なウイルス感染を達成するために、アプロチニンを高用量で投与した。例えば、280マイクログラム～840マイクログラム/日のアプロチニンを各マウスに6日間腹腔内注射した (Zhirnov OP, Ovcharenko AV and Bukrinskaya AG. (1984) *J Gen Virol* 65: 191-196)。エアゾール吸入にはより低い投薬量しか必要ないが、それでも、63～126マイクログラムを6日間投与した (Ovcharenko AV and Zhirnov OP. (1994) *Antiviral Res* 23: 107-118)。マウスデータからの外挿に基づいて、ヒトでは非常に高用量のアプロチニンが必要であろう。従って、ヒトでより良好な有効性を達成するために、アプロチニン分子の効力を、有意に改善する必要がある。

30

【0147】

アプロチニンは、主に宿主気道上皮細胞の表面上に存在するセリンプロテアーゼの競合的阻害によって機能する。従って、宿主プロテアーゼ周辺のアプロチニンの局所濃度は、アプロチニンの競合的利点を決定づける重要な要因である。我々は、気道上皮表面上のアプロチニンの競合的利点を増大させるように相乗的に作用する2つのアプローチを使用する。

40

【0148】

第1に、アプロチニンの親和力 (avidity) (機能的親和性) は、リンカーを介して連結した2つ、3つ、又はそれを超えるアプロチニタンパク質からなる多価アプロチニン融合タンパク質によって増加する。このような分子は、多価様式で膜プロテアーゼに結合することができ、アプロチニン単量体を超える有意な動態的利点を有する。単量体アプロチニンは、ウシトリプシンと非常に強固に結合し、その解離定数 (K_i) は、 $6.0 \times 10^{-14} \text{ mol/l}$ である。しかし、他のプロテアーゼ (キモトリプシン、プラスミン、及びカリクレイン等) と比較したインフルエンザウイルスの活性化に関与している

50

その親和性はより低く、 K_i は $10^{-8} \sim 10^{-9} \text{ mol/l}$ のレベルである (Fritz Hand Wunderer G. (1983) *Arzneim - Forsch* 33: 479 - 494)。多量体化により、これらのプロテアーゼに対するアプロチニンの親和性を指数関数的に増加させることができる。

【0149】

第2に、我々は、アプロチニンを気道上皮アンカードメインと融合する。アンカードメインは、アプロチニンを宿主の膜結合プロテアーゼの近傍に局在指せ、上皮表面上のアプロチニンの高局所濃度を保持する。アンカードメインはまた、気道上皮上の薬物の保持時間を増加させる。

【0150】

クローニング

アプロチニンは、58個のアミノ酸残基及び3つの鎖内ジスルフィド結合を有する一本鎖ポリペプチドである (配列番号1)。アプロチニンのアミノ酸配列を、図1に示す。アプロチニン及びアプロチニン融合タンパク質をコードする遺伝子を、テンプレートとして大腸菌発現のために至適化したコドンとの重複オリゴヌクレオチドを使用したPCRによって合成する。PCR産物を、pCR2.1-TOPOベクター (Invitrogen) にクローン化する。配列決定後、遺伝子を、発現ベクターpQE (Qiagen) にサブクローン化する。ベクターは、組換えタンパク質を容易に精製するための精製タグ (His₆) を保有する。コンストラクトを使用して、大腸菌を形質転換する。LB-アンピシリン培地中で中対数期まで成長させた形質転換細胞を、標準的プロトコールに従ってIPTGによって誘導する。細胞をペレット化し、超音波処理によってリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) に溶解する。His₆ 精製タグを有する酵素を、ニッケルカラム (Qiagen) を使用して精製する。

【0151】

以下のアプロチニン融合タンパク質を作製する。

1. 二量体及び三量体のアプロチニン。以下のコンストラクトのように、2つ又は3つのアプロチニンを、可動性リンカーを介して連結する。

アプロチニン - (GGGGS (配列番号10))_n (n = 3、4、又は5) - アプロチニン ;
及び

アプロチニン - (GGGGS (配列番号10))_n (n = 3、4、又は5) - アプロチニン - (GGGGS (配列番号10))_n (n = 3、4、又は5) - アプロチニン。
リンカー配列の長さにより、多量体アプロチニンの三次元可動性が決定づけられ、それにより、分子の機能的親和性に影響を与え得る。従って、種々の長さのリンカーを有するコンストラクトが作製される。

【0152】

完全に機能的な組換え単量体アプロチニンが、大腸菌中で産生されている (Auerwald EA, Horlein D, Reinhardt G, Schroder W and Schnabel E. (1988). *Biol Chem Hoppe-Seyler Vol 369, Suppl.*, pp 27 - 35)。従って、我々は、大腸菌細胞中で多価アプロチニンタンパク質が適切に折り畳まれると予想する。種々の一般的な大腸菌細胞株 (BL21、JM83等) 中でのタンパク質発現に加えて、多価アプロチニンタンパク質は、Origami (商標) 細胞 (Novagen, Bad Soden, Germany) でも発現する。Origami (商標) 細胞株はチオレドキシン及びグルタチオンを持たず、それにより、酸化細胞質を有する。この細胞株を使用して、ジスルフィド結合を含む多数のタンパク質が首尾よく発現されている (Bessette PH, Aslund F, Beckwith J and Georgiou G. (1999) *Pro Natl Acad Sci USA* 96: 13703 - 13708 ; Venturi M, Seifert C and Hunte C. (2001) *J Mol Biol* 315: 1 - 8.)。

10

20

30

40

50

【0153】

2. 上皮細胞アンカーアプロチニン。上皮細胞アンカー配列を、アプロチニンと融合させる。上皮アンカー配列は、上皮細胞表面に対して親和性を有する任意のペプチド又はポリペプチド配列であり得る。我々は、以下の3つのヒトGAG結合配列を選択した：PF4 (aa 47～70；配列番号2)、IL-8 (aa 46～72；配列番号3)、及びAT III (aa 118～151；配列番号4) (図2)。これらの配列は、ナノモルレベルの親和性でヘパリン/ヘパラン硫酸に結合する(表1)。ヘパリン/ヘパラン硫酸は、機上上皮上に遍在する。個別のコンストラクトでは、GAG結合配列は、以下のコンストラクトとして、一般的リンカー配列GGGGSを介してN末端及びC末端上のアプロチニン遺伝子と融合する。

(GAGドメイン - GGGGS (配列番号10) - アプロチニン)；及び
(アプロチニン - GGGGS (配列番号10) - GAGドメイン)

【0154】

表1：ヘパリンに対する親和性

タンパク質	Kd nM (ref)	
PF4	27	(44)
IL-8	<5	(43)
ATIII	11	(42)
ApoE	620	(45)

【0155】

測光トリプシン阻害アッセイ

アプロチニン及びアプロチニン融合タンパク質のトリプシン阻害活性を、以前に詳述されている測光アッセイによって測定する(Fritz Hand Wunderer G. (1983) *Arzneim-Forsch* 33: 479-494)。簡単に述べれば、このアッセイでは、アプロチニンは、Na-ベンゾイル-L-アルギニン-p-ニトロアニリド(BzArgpNA又はL-BAPA)(Sigma)のトリプシン触媒加水分解を阻害し、これを、405nmで測光的に追跡する。他のトリプシン単位(U_{BAPA})は、1分間あたりの1 μ molの基質の加水分解に対応する。1阻害単位(IU_{BAPA})は、2つのトリプシン単位の活性を50%減少させ、これは、1 U_{BAPA} のトリプシンの阻害に数学的に対応する。アプロチニンの比活性を、 IU_{BAPA}/mg ポリペプチドで示す。

【0156】

表面プラズモン共鳴アッセイ

標的としてヒトプラスミンを使用した表面プラズモン共鳴アッセイ(すなわち、BIAcore分析(BIAcore, Piscataway, NJ))を使用して、種々のリンカーに対する二量体及び三量体アプロチニンの親和性を、単量体アプロチニンと比較する。同様に、標的としてヘパリンを使用したBIAcoreアッセイを使用して、GAG結合アプロチニン融合タンパク質とヘパリンとの間の親和性を分析する。

【0157】

標的としてプラスミンを使用する場合、精製ヒトプラスミン(Sigma)を、製造者の説明書(BIAcore, Piscataway, NJ)に従って、CM5チップ状に固定する。以前に記載のように、ヘパリンが標的である場合、ビオチン化アルブミン及びアルブミン-ヘパリン(Sigma)がストレプトアビジンコーティングBIAcore SAチップ上に捕捉される(Xiang Y and Moss B. (2003) *J Virol* 77: 2623-2630)。

【0158】

実施例2：インフルエンザウイルス感染の研究のための改良された組織培養モデルの確立。

インフルエンザウイルスのストック

インフルエンザウイルス株を、ATCC及びSt. Jude Children's Research Hospitalの貯蔵所から入手する。インフルエンザウイルスに関連する全ての実験を、生物安全レベルIIで行う。

【0159】

記載のように、9日齢のニワトリ胚の尿膜腔への注射によって、ウイルスを増殖させる (Zhirnov OP, Ovcharenko AV and Bukrinskaya AG. (1985) J Gen Virol 66:1633-1638)。或いは、ウイルスストックを、0.3%ウシ血清アルブミン及び0.5マイクログラムトリプシン/mlを補足した最少基本培地(MEM)中にてMadin-Darbyイヌ腎臓(MDCK)細胞上で成長させる。48~72時間のインキュベーション後、培養培地を低速遠心分離によって明澄化する。ウイルス粒子を、25%スクロースクッションによる超遠心によってペレット化する。精製ウイルスを、50%グリセロール-0.1M Tris緩衝液(pH 7.3)に懸濁し、-20℃で保存する。

【0160】

ブランクアッセイ

ウイルスストックの感染力及び力価を、2種のブランクアッセイ(従来のアッセイ及び修正したアッセイ)によって決定する(Tobita, K, Sugiura, A, Enomoto, C and Furuyama, M. (1975) Med Microbiol Immunol 162:9-14; Zhimov OP, Ovcharenko AV and Bukrinskaya AG. (1982) Arch Virol 71:177-183)。従来のブランクアッセイは、ウイルス滴定法として日常的に使用されている。これは、MDCK単層へのウイルス感染直後に外因性のトリプシンを添加した寒天を重層する必要がある(Tobita, K, Sugiura, A, Enomoto, C and Furuyama, M. (1975) Med Microbiol Immunol 162:9-14)。この方法は、非切断HAを有する全てのウイルス粒子の活性化によって試験されるウイルスストックの感染力を人為的に増加させる。

【0161】

Zhirnov et al. は、感染24時間後に添加される第2の層にトリプシンを含む、二重寒天重層からなる修正ブランクアッセイをデザインした(Zhirnov OP, Ovcharenko AV and Bukrinskaya AG. (1982) Arch Virol 71:177-183)。感染3日後に、細胞を10%ホルムアルデヒド溶液で固定し、アガロース層を除去し、ヘマトキシリン-エオシン溶液で固定細胞を染色し、ブランクを計数する。修正ブランクアッセイにより、切断HA及び非切断HAの両方を含むウイルスストックの真の感染力が正確に決定される。従来のブランクアッセイと修正ブランクアッセイの両方由来の結果を組み合わせ、切断HA又は非切断HAを含むウイルスを区別し、ウイルスストックの感染力とHA切断状態とを相関させることができる。

【0162】

ヒト細胞培養モデル

1. 初代ヒト上皮細胞の短期間培養。従来のin vitroインフルエンザウイルス感染を、主に培養培地に外因性トリプシンを添加したMDCK細胞で行う。トリプシンがin vivoでインフルエンザウイルスを活性化するプロテアーゼではないので、これは生理学的にかけ離れており、本明細書中で提案した研究には不適切である。これまで報告されている外因性プロテアーゼを使用しないでインフルエンザウイルスの成長を支持することができるin vitro組織培養モデルは非常に限られており、腎臓起源の霊長類細胞を含む初代培養物、孵化卵の尿膜腔及び羊膜腔を裏打ちする細胞、胎児気管臓器培養

、及び初代ヒトアデノイド上皮細胞である (Endo Y, Carroll KN, Ikizler MR and Wright PF. (1996) J Virol 70: 2055 - 2058)。これらのうち、初代ヒトアデノイド上皮細胞を使用した最も最近の研究がヒト条件に最も近い。この場合、Endo et al. (Endo Y, Carroll KN, Ikizler MR and Wright PF. (1996) J Virol 70: 2055 - 2058) は、ヒトアデノイドの手術サンプルから上皮細胞を単離し、上皮細胞をコラーゲンマトリクス (Vitrogen 100, Cellatrix Laboratories, Palo Alto, California) を含むトランスウェルインサート (Transwell insert) (Costar, Cambridge, Mass) 上で培養した。細胞を、成長因子及び微量元素を補足した 50% Ham F12 及び 50% 得イーグル最初基本培地中で維持した。細胞は、10 ~ 14 日目でコンフルエンスに達し、大部分が単層として維持されたが、繊毛細胞の不連続なパッチも存在し、通常の繊毛活動をコンフルエンス到達後 1 ~ 3 週間維持された。この系では、インフルエンザ A 型ウイルスは 10^6 PFU/ml の力価且つ 0.001 の感染多重度で成長した (Endo Y, Carroll KN, Ikizler MR and Wright PF. (1996) J Virol 70: 2055 - 2058)。感染中、進行性の細胞変性効果も認められた。この系の最も大きな欠点は、新鮮なヒトアデノイド組織が必要なことである。

【0163】

この問題を解決するために、初代ヒトアデノイド上皮細胞を、市販の初代ヒト機上上皮細胞 (Cambrex) に置換し、細胞を同一条件下で成長させる。初代ヒト気道上皮細胞のこのような短期培養は、確立するのが比較的早く、ほとんどの *in vitro* 感染及び抗ウイルス実験のための最初の実験モデルとして有用である。

【0164】

2. 十分に分化したヒト気道上皮 (WD - HAE)。ヒト気道の *in vivo* 条件を最良に模倣するために、十分に分化したヒト気道上皮 (WD - HAE) モデルを使用する。WD - HAE は、正常なヒト気道上皮 (機能的繊毛細胞及び粘液分泌細胞が含まれる) の全分化細胞を有する層状上皮である。従って、このモデル系では、インフルエンザウイルスは、生理学的に関連する宿主プロテアーゼによって活性化される可能性が最も高い。WD - HAE は、呼吸器ウイルス感染 (呼吸器合胞体ウイルス (RSV) Zhang L, Peeples ME, Boucher RC, Collins PL and Pickles RJ. (2002) J Virol 76: 5654 - 5666)、麻疹ウイルス (Sinn PL, Williams G, Vongpunsawad S, Cattaneo R and McCray PB. (2002) J Virol 76: 2403 - 2409)、又はヒトライノウイルス等) を研究するために広く使用されているが、インフルエンザウイルスを研究するためには以前に使用されていなかった。

【0165】

WD - HAE の詳細なプロトコールは以前に記載されている (Krunksky TM, Fischer BM, Martin LD, Jones N, Akley NJ and Adler KB. (2000) Am J Respir Cell Mol Biol 22: 685 - 692)。簡単に述べれば、市販の初代ヒト気管支上皮細胞 (Cambrex) を、ラット尾コラーゲン I を薄くコーティングしたトランスウェル - クリア培養インサート (Transwell - clear culture insert) (Costar) 上で培養する。細胞を、最初の 5 ~ 7 日間、気管支上皮細胞成長培地 (BEGM) (Cambrex) と成長因子を補足した高グルコース含有 DMEM との 1 : 1 混合物を含む培地中に浸漬して培養する (Krunksky TM, Fischer BM, Martin LD, Jones N, Akley NJ and Adler KB. (2000) Am J Respir Cell Mol Biol 22: 685 - 692)。培養物が 70% コンフルエントである場合 (5 ~ 7 日目)、先端の培養物を除去し、細胞を培地のその基底面のみに曝露することによって大気 - 液体界面を作

製する。細胞を、大気 - 液体界面で更に 14 日間培養し (全部で 21 日間)、その後に実験準備をする。分化した上皮を、*in vivo* で数週間保持することができる。

【0166】

上皮の形態及び分化の程度は、日常的な組織学によって立証する (Endo Y, Carroll KN, Ikizler MR and Wright PF. (1996) J Virol 70:2055-2058)。簡単に述べれば、10% 緩衝化ホルマリンでの固定後、上皮細胞を、パラフィンに包埋し、切片にし、ヘマトキシリン及びエオシンで染色し、粘膜分泌細胞については、定期的な酸 - Schiff 染色を行う。

【0167】

分化細胞への 0.001 ~ 1 MOI のウイルスの添加によって、インフルエンザ感染を上記の 2 つのモデル系で行う。上清中のウイルスの力価及び感染力は、3 ~ 7 日間にわたって続く。インフルエンザウイルスの増殖レベル及びインフルエンザウイルスの感染力を、従来のブランクアッセイ及び修正ブランクアッセイを使用して評価する。

【0168】

実施例 3: *in vitro* でのアプロチニン融合タンパク質機能の比較
アプロチニン融合タンパク質の抗ウイルス効果

1. 感染前の処置。アプロチニン融合タンパク質を、種々の濃度で初代ヒト細胞培養物に添加し、細胞を 1 時間インキュベートする。細胞を新鮮な培地で洗浄し、直ちに 0.01 ~ 1 の MOI のインフルエンザウイルスと共にインキュベートする。1 時間後に細胞を再度洗浄し、3 ~ 5 日間培養する。種々の時点の上清中のウイルスの力価及び感染力を、2 つのブランクアッセイによって測定する。ウイルス感染に起因する細胞変性効果を、生きた細胞のクリスタルバイオレットによる染色及び実験終了時の 570 nm での吸光度の測定による定量によって評価する。アプロチニン融合タンパク質による細胞防御率を、 $100 \times \{ (\text{アプロチニン処置サンプル} - \text{非処置感染サンプル}) / (\text{非感染コントロール} - \text{非処置感染サンプル}) \}$ によって計算する。細胞防御についての薬物有効性を、50% の細胞保護を達成するその有効濃度 (EC_{50}) によって記載する。HA 活性化は、新規の放出されたウイルス粒子に対してのみ起こるので、最初のウイルス感染ラウンドは正常に起こり、ウイルス力価は感染後 24 時間で上昇する。しかし、第 2 ラウンドの開始から、ウイルスの感染力は低下し、ウイルス力価はアプロチニン処置の結果として漸減する。この実験の結果により、1 回の予防的処置でのその有効性によって種々の異なるアプロチニン融合タンパク質型が識別される。

【0169】

或いは、最初のウイルス接種のタイミングを、アプロチニン処置直後から処置後 2 ~ 24 時間に変更する。ウイルス力価、感染力、及び細胞変性効果を、上記のように感染 3 ~ 5 日後に測定する。これらの実験の結果により、1 回の予防的処置後に有効期間 (effective window) の長さによって種々のアプロチニン融合タンパク質が識別される。

【0170】

2. 感染後の処理。複数回投与処置のために、細胞を、最初に 0.001 ~ 0.1 MOI で 1 時間のウイルス接種によって感染させる。その直後に種々の濃度のアプロチニン融合タンパク質を添加し、感染から最初の 48 時間は、8 時間間隔で更なる処置を適用する。感染 7 日後まで細胞を培養する。培地中のウイルスの力価及び感染力は、全過程で持続する。実験終了時に細胞変性効果を評価する。

【0171】

単回投与処置のために、細胞を、最初に 0.001 ~ 0.1 MOI で 1 時間のウイルス接種によって感染させる。種々の濃度のアプロチニン融合タンパク質処置を感染から最初の 48 時間の異なる時点で適用するが、各細胞サンプルには全実験を通して 1 回のみ処置する。感染 7 日後まで細胞を培養する。培地中のウイルスの力価及び感染力は、全過程で持続する。実験終了時に細胞変性効果を評価する。これらの実験の結果により、その治療可能性について異なるアプロチニン融合タンパク質型が識別される。

【0172】

アプロチニン融合タンパク質によるHA切断の阻害

アプロチニン融合タンパク質がインフルエンザHAタンパク質の切断の阻害によってインフルエンザウイルス感染を阻害することを証明するために、ヒト初代上皮細胞培養物を、MOI 1にてインフルエンザウイルスに感染させる。アプロチニン融合タンパク質を、ウイルス接種直前又はウイルス感染直後のいずれで培養物に添加する。感染6.5時間後、培養物を、冷メチオニンを欠き、且つ100 μ Ci/ml (パルス)の濃度の³⁵S標識メチオニン (Amersham)を含むMEM中で1時間インキュベートする。その後、細胞を、10倍濃度の冷メチオニンを含むMEMで2回洗浄し、MEM中で更に3時間インキュベートする(追跡)。標識後、細胞を放射免疫沈降アッセイ(RIPA)緩衝液に溶解し、HAを、感染のために使用したウイルスの特定の株に対する抗血清(抗インフルエンザ血清は、ATCC及びCenter of Disease Control and Preventionから入手することができる)によって沈殿させ、免疫複合体を、プロテインG-Sepharose (Amersham)によって精製する。サンプルを、SDS-PAGEによって分画し、オートラジオグラフィを行う。アプロチニン融合タンパク質で処置されていないサンプルでは、HA1及びHA2が主なHA種であると予想される一方で、アプロチニン処理サンプルでは、HA0が存在する主なHA型であると予想される。

10

【0173】

実施例4: 5つのシアリダーゼ遺伝子の合成並びにシアリダーゼタンパク質の発現及び精製
序論

20

インフルエンザウイルスは、RNAウイルスのオルトミクソウイルス科ファミリーに属する。A型及びB型は共に、宿主細胞に由来する脂質エンベロープ中に封入された8つのセグメント化マイナス鎖RNAゲノムを有する。ウイルスエンベロープは、以下の3つのタンパク質から構成されるスパイクで覆われている: 宿主細胞受容体にウイルスを付着させてウイルスと細胞膜との融合を媒介する血球凝集素(HA); 宿主細胞からの新規のウイルスの放出を促進するノイラミニダーゼ(NA); 及びイオンチャネルとしての機能を果たす少数のM2タンパク質。インフルエンザA型ウイルスについて、HA及びNAは共に抗原連続変異及び抗原不連続変異を受け、ウイルスサブタイプを、そのHAタンパク質とNAタンパク質との間の血清学的相違によって識別する。全部で15のHA型(H1~H15)及び9つのNA型(N1~N9)が存在し、これまでに3つのHA(H1~H3)及び2つのNA(N1及びN2)のみが、ヒトインフルエンザA型ウイルスで見出されている(Granoff, A. & Webster, R. G., ed. Encyclopedia of Virology, 2nd Edition, Vol. 2)。インフルエンザA型ウイルスと対照的に、インフルエンザB型ウイルスでは異なる抗原サブタイプは認められない。

30

【0174】

インフルエンザB型ウイルスがヒトのみにおいて循環する一方で、インフルエンザA型ウイルスを全動物宿主(ブタ、ウマ、ニワトリ、カモ、及び他の鳥類等)から単離することができ、これは、インフルエンザA型ウイルスが遺伝子再集合して抗原不連続変異を引き起こすことを示す。野生の水生鳥類は鳥類及び哺乳動物種の全インフルエンザウイルスの根源となる貯蔵所と見なされる。水生鳥類と他の種(ブタ及びウマが含まれる)との間のウイルスの伝播及びブタを介したヒトへの間接的伝播についての多数の証拠が存在する。ブタ又はニワトリからヒトへの直接伝播も立証されている(Ito, T. (2000) Microbiol Immunol 44(6): 423-430)。

40

【0175】

インフルエンザウイルスの宿主細胞受容体は、細胞表面シアル酸である。シアル酸は、通常、糖タンパク質及び糖脂質に付着するオリゴサッカリド鎖の最も外側の位置で見出される9炭素骨格を有するアルファケート酸である。主なシアル酸型の1つは、ほとんどの他

50

の型の生合成前駆体であるN - アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) である。Neu5Acと炭水化物側鎖の最後から2番目のガラクトース残基との間の2つの主な結合は、事実上、Neu5Acアルファ(2,3)-Gal及びNeu5Acアルファ(2,6)-Galで見出される。Neu5Acアルファ(2,3)-Gal分子及びNeu5Acアルファ(2,6)-Gal分子の両方は、受容体としてインフルエンザA型ウイルスによって認識され得るが(Schauer, R. (1982) Adv. Carbohydrate Chem & Biochem 40:131-235)、ヒトウイルスはNeu5Acアルファ(2,6)-Galを好むようであり、トリウイルス及びウマウイルスは、主にNeu5Acアルファ(2,3)-Galを認識する(Ito, T. (2000) Microbiol Immunol 44(6):423-430)。

10

【0176】

インフルエンザA型ウイルス及びB型ウイルスの感染は、典型的には、上気道の粘膜面で開始される。ウイルスの複製は、主に上気道に限定されるが、下気道に拡大して気管支肺炎を引き起こして死に至り得る。死亡リスクは、感染者10,000に1人であるが、心肺疾患を罹患した高リスク群及び流行中に免疫学的にナイーブな個体では有意に高くなる。

【0177】

両方の受容体シアル酸(Neu5Acアルファ(2,6)-Gal及びNeu5Acアルファ(2,3)-Gal)を有効に分解することができるシアリダーゼを含む治療化合物は、最も広範囲のインフルエンザウイルス(動物ウイルスが含まれる)に対して防御することができる。ウイルス株が毎年変化する場合でも、有効性を保持し得る。シアリダーゼがウイルスよりもむしろ宿主細胞をターゲティングし、ウイルス生活環の「チョーキングポイント(choking point)」で作用するので、耐性ウイルスは生成されそうにない。タンパク質結合シアル酸は、33時間の半減期で細胞表面上で均一に代謝回転する(Kreisel, W, Voik, BA, Buchsel, R. and Reutter, W. (1980) Proc Natl Acad Sci USA 77:1828-1831)。従って、我々は、1日1回又は1日2回のシアリダーゼの投与によってインフルエンザから十分に防御すると推定する。

20

【0178】

シアリダーゼは高等真核生物、更に、いくつかの大部分が病原性の微生物(ウイルス、細菌、及び原生動物が含まれる)で見出される。ウイルス及び細菌シアリダーゼは十分に特徴づけられており、そのいくつかの三次元構造が決定されている(Crennell, SJ, Garman, E, Laver, G, Vimr, E and Taylor, G. (1994) Structure 2:535-544; Janakiraman, MN, White, CL, Laver, WG, Air, GM and Luo, M. (1994) Biochemistry 33:8172-8179; Pshezhetsky, A, Richard, C, Michaud, L, Igdoora, S, Wang, S, Elslinger, M, Qu, J, Leclerc, D, Gravel, R, Dallaire, L and Potier, M. (1997) Nature Genet 15:316-320)。いくつかのヒトシアリダーゼも近年クローン化されている(Milner, CM, Smith, SV, Carrillo MB, Taylor, GL, Hollinshead, M and Campbell, RD. (1997) J Bio Chem 272:4549-4558; Monti, E, Preti, A, Nesti, C, Ballabio, A and Borsani G. 1999. Glycobio 9:1313-1321; Wada, T, Yoshikawa, Y, Tokuyama, S, Kuwabara, M, Akita, H and Miyagi, T. (1999) Biochem Biophys Res Commun 261:21-27; Monti, E, Bassi, MT, Papini, N, Riboni, M, Manzoni, M, Veneranodo, B, Croci, G, Preti, A, Ballabio, A, Tettamanti, G and Borsani, G. (2000) Bic

30

40

50

hem J 349:343-351)。特徴づけられた全てのシアリダーゼは、アミノ末端部分に4つのアミノ酸モチーフ及びその後タンパク質によって3~5回反復したAspボックスを共有している(Monti, E, Bassi, MT, Papini, N, Riboni, M, Manzoni, M, Veneranodo, B, Croci, G, Preti, A, Ballabio, A, Tettamanti, G and Borsani, G. (2000) *Biochem J* 349:343-351; Copley, RR, Russell, RB and Ponting, CP. (2001) *Protein Sci* 10:285-292)。シアリダーゼスーパーファミリーの全アミノ酸同一性が約20~30%と比較的低い一方で、分子(具体的には、触媒アミノ酸)の全折り畳みは著しく類似している(Wada, T, Yoshikawa, Y, Tokuyama, S, Kuwabara, M, Akita, H and Miyagi, T. (1999) *Biochem Biophys Res Commun* 261:21-27; Monti, E, Bassi, MT, Papini, N, Riboni, M, Manzoni, M, Veneranodo, B, Croci, G, Preti, A, Ballabio, A, Tettamanti, G and Borsani, G. (2000) *Biochem J* 349:343-351; Copley, RR, Russell, RB and Ponting, CP. (2001) *Protein Sci* 10:285-292)。

【0179】

シアリダーゼは、一般に、以下の2つのファミリーに分類される:「小」シアリダーゼは、分子量が約42kDaであり、活性を最大にするために2価の金属イオンを必要としない;「巨大」シアリダーゼは、分子量が約65kDaであり、活性のために2価の金属イオンを必要とし得る(Wada, T, Yoshikawa, Y, Tokuyama, S, Kuwabara, M, Akita, H and Miyagi, T. (1999) *Biochem Biophys Res Commun* 261:21-27; Monti, E, Bassi, MT, Papini, N, Riboni, M, Manzoni, M, Veneranodo, B, Croci, G, Preti, A, Ballabio, A, Tettamanti, G and Borsani, G. (2000) *Biochem J* 349:343-351; Copley, RR, Russell, RB and Ponting, CP. (2001) *Protein Sci* 10:285-292)。

【0180】

15種を超えるシアリダーゼタンパク質が精製されており、これらは互いに基質特異性及び酵素動力学が非常に異なる。インフルエンザウイルスに対して広範に防御するために、シアリダーゼは、アルファ(2,6)-Gal結合及びアルファ(2,3)-Gal結合並びに糖タンパク質及びいくつかの糖脂質中のシアル酸を有効に分解する必要がある。ウイルスシアリダーゼ(インフルエンザAウイルス、家禽ペストウイルス、及びニューカッスル病ウイルス由来のシアリダーゼ)は、一般に、Neu5Acアルファ(2,3)-Galに特異的であり、Neu5Acアルファ(2,6)-Galを非常に非効率的にしか分解しない。小細菌シアリダーゼは、一般に、糖タンパク質及び糖脂質中のシアル酸との反応性が低い。対照的に、巨大細菌シアリダーゼは、ほとんどの天然基質中のアルファ(2,6)-Gal結合及びアルファ(2,3)-Gal結合を有効に切断することができ(図4; Vimr, DR. (1994) *Trends Microbiol* 2:271-277; Drzeniek, R. (1973) *Histochem J* 5:271-290; Roggentin, P, Kleinedam, RG and Schauer, R. (1995) *Biol Chem Hoppe-Seyler* 376:569-575; Roggentin, P, Schauer, R, Hoyer, LL and Vimr, ER. (1993) *Mol Microb* 9:915-921)。その広い基質特異性のために、巨大細菌シアリダーゼがより良好な候補である。

【0181】

図4に示す公知の基質特異性を有する巨大細菌シアリダーゼのうち、コレラ菌シアリダーゼは、活性のためにCa²⁺が必要であり、あまり好ましくない。より好ましいシアリダーゼには、ウエルシュ菌(*C. perfringens*)由来の71kDaの酵素、アクチノミセス・ビスコサス(*Actinomyces viscosus*)由来の113kDaの酵素、及びアルスロバクター・ウレアファシエンス(*Arthrobacter ureafaciens*)のシアリダーゼが含まれる。第3のシアリダーゼ(ミクロモノスポラ・ビリジファシエンス(*Micromonospora viridifaciens*)由来の68kDaの酵素)は、インフルエンザウイルス受容体を破壊することが公知であり(Air, GM and Laver, WG. (1995) *Virology* 211: 278 - 284)、これも候補である。

10

【0182】

これらの酵素は、高い比活性を有し(ウエルシュ菌(*C. perfringens*)については600 U/mgタンパク質(Corfield, AP, Veh, RW, Weimber, M, Michalski, JC and Schauer, R. (1981) *Biochem J* 197: 293 - 299)及びA.ビスコサス(*A. viscosus*)については680 U/mgタンパク質(Teufel, M, Roggentin, P. and Schauer, R. (1989) *Biol Chem Hoppe Seyler* 370: 435 - 443))、2価の金属イオンを用いずに完全に活性であり、大腸菌由来の組換えタンパク質としてクローン化及び精製されている(Roggentin, P, Kleineidam, RG and Schauer, R. (1995) *Biol Chem Hoppe - Seyler* 376: 569 - 575, Teufel, M, Roggentin, P. and Schauer, R. (1989) *Biol Chem Hoppe Seyler* 370: 435 - 443, Sakurada, K, Ohta, T and Hasegawa, M. (1992) *J Bacteriol* 174: 6896 - 6903)。更に、ウエルシュ菌(*C. perfringens*)は、2~8の溶液中で数週間安定であり、アルブミンの存在下では4で2年を超えて安定である(Wang, FZ, Akula, SM, Pramod, NP, Zeng, L and Chandran, B. (2001) *J Virol* 75: 7517 - 27)。A.ビスコサス(*A. viscosus*)は、凍結及び融解に対して不安定であるが、0.1M酢酸緩衝液(pH5)中では4で安定である(Teufel, M, Roggentin, P. and Schauer, R. (1989) *Biol Chem Hoppe Seyler* 370: 435 - 443)。

20

30

【0183】

タンパク質が上気道で局所的に使用されて全身に吸収されないので、細菌シアリダーゼを使用して免疫反応を誘導する機会は非常に低い、ヒト酵素はヒト被験体での長期使用により望ましい。

【0184】

これまで、以下の4つのシアリダーゼ遺伝子がクローン化されている: NEU1/G9/リソソームシアリダーゼ(Pshezhetsky, A, Richard, C, Michaud, L, Igourd, S, Wang, S, Elsliger, M, Qu, J, Leclerc, D, Gravel, R, Dallaire, L and Potier, M. (1997) *Nature Genet* 15: 316 - 320, Milner, CM, Smith, SV, Carrillo MB, Taylor, GL, Hollinshead, M and Campbell, RD. (1997) *J Bio Chem* 272: 4549 - 4558); NEU3(ヒト脳から単離された膜結合シアリダーゼ)(Wada, T, Yoshikawa, Y, Tokuyama, S, Kuwabara, M, Akita, H and Miyagi, T. (1999) *Biochem Biophys Res Commun* 261: 21 - 27, Monti, E, Bassi, MT, Papini, N, Riboni, M, Manzoni, M, Venera nodo, B, Croci, G, Preti, A, Ballabio, A, Tettam

40

50

anti, G and Borsani, G. (2000) *Biochem J* 349: 343-351)、NEU2 (ヒト骨格筋で非常に低レベルで発現される42 kDaのシアリダーゼ) (Monti, E, Preti, A, Nesti, C, Ballabio, A and Borsani G. (1999) *Glycobiol* 9: 1313-1321)、及びNEU4 (試験した全ヒト脳で発現した497アミノ酸タンパク質) (Genbank NM080741) (Monti, E, Preti, A, Venerando, B and Borsani, G. (2002) *Neurochem Res* 27: 646-663)。

【0185】

アミノ酸配列比較により、NEU2 (配列番号8) 及びNEU4 (配列番号9) が共に細胞質シアリダーゼであることが明らかである。ネズミチフス菌 (*S. Typhimurium*) シアリダーゼの触媒部位を形成する12個のアミノ酸残基のうちの9残基がNEU2及びNEU4の両方で保存されている (Monti, E, Preti, A, Nesti, C, Ballabio, A and Borsani G. (1999) *Glycobiol* 9: 1313-1321、図3)。更に、NEU4はまた、公知の哺乳動物シアリダーゼでは固有であると思われる約80アミノ酸残基 (aa 294~373) のストレッチを示す (Monti, E, Preti, A, Venerando, B and Borsani, G. (2002) *Neurochem Res* 27: 646-663)。選択された巨大細菌シアリダーゼと異なり、NEU2及びNEU4の基質特異性は未知である。NEU2及びNEU4がインフルエンザウイルス受容体を有効に分解することができるかどうかを試験する必要がある。

【0186】

シアリダーゼアッセイ

NEU2、NEU4、及びM. ピリジファシエンス (*M. viridifaciens*) の酵素をPBS及び50%グリセロール中にて-20℃で保存する。ウエルシュ菌 (*C. perfringens*) 及びA. ビスコサス (*A. viscosus*) の酵素を、10mM酢酸緩衝液 (pH5) 中にて4℃で保存する。タンパク質調製物 (prep) を、HPLC及びSDS-PAGE電気泳動によって特徴づける。酵素の比活性及び安定性を、シアリダーゼアッセイによってモニタリングする。

【0187】

シアリダーゼの酵素活性を、基質としての2'- (4-メチルウンベリフェリル) - アルファ-D-N-アセチルノイラミン酸 (4Mu-NANA) (Sigma) の蛍光測定によって決定する。具体的には、400マイクログラムウシ血清アルブミンの存在下での最終体積が100マイクロリットルの0.2mM 4MU-NANAを含む0.1Mクエン酸ナトリウム/リン酸緩衝液 (pH5.6) 中における反応物を2連で準備し、37℃で5~10分間インキュベートした。1mlの0.2Mグリシン/NaOH (pH10.2) の添加によって反応を停止させる。4-メチルウンベリフェロン (4-MU) を使用して、365nmでの励起及び445nmでの発光を使用した蛍光光度計で蛍光発光を測定して、検量線を得る。

【0188】

実施例5: *in vitro*でのシアリダーゼ機能の比較及び更なる研究のためのシアリダーゼの選択

1. インフルエンザウイルスのストック

インフルエンザウイルス株を、ATCC及びSt. Jude Children's Research Hospitalの貯蔵所から入手する。ウイルスストックを、0.3%ウシ血清アルブミン及び0.5マイクログラムトリプシン/mlを補足した最少基本培地 (MEM) 中にてMadin-Darbyイヌ腎臓 (MDCK) 細胞上で成長させる。48~72時間のインキュベーション後、培養培地を低速遠心分離によって明澄化する。ウイルス粒子を、25%スクロースクッションによる超遠心によってペレット化する。精製ウイルスを、50%グリセロール-0.1M Tris緩衝液 (pH 7.3) に懸

濁し、 -20°C で保存する。ウイルス力価を、ブランクアッセイ (Tobita, K, Sugiyama, A, Enomoto, C and Furuyama, M. (1975) Med Microbiol Immunol 162: 9-14) 又は50%のMDCK細胞が感染する必要があるウイルスの用量であるTCID₅₀によって決定する。

【0189】

以下のNeu5Acアルファ(2,6)-Gal又はNeu5Acアルファ(2,3)-Galに対する親和性を有し、且つ受容体に対して高い親和性を有する選択されたヒト及び動物のインフルエンザA型株を、*in vitro*試験のために選択する。

1. 受容体Neu5Acアルファ(2,6)-Galを認識する株には、ヒト単離物A/aichi/2/68、A/Udorn/307/72、A/Prot Chaimers/1/73、及びA/Victoria/3/75等が含まれる(Connor, RJ, Kawaoka, Y, Webster, RG and Paulson JC. (1994) Virology 205: 17-23)。

10

2. Neu5Acアルファ(2,3)-Galを有する株には、具体的には、動物単離物A/duckUkraine/1/63、A/duckMemphis/928/74、A/duckhokk/5/77、A/eq/Miami/1/63、A/eq/Ur/1/63、A/eq/Tokyo/71、A/eq/Prague/71等が含まれる(Connor, RJ, Kawaoka, Y, Webster, RG and Paulson JC. (1994) Virology 205: 17-23)。

【0190】

20

2. 血球凝集アッセイ

このアッセイを使用して、各酵素が受容体Neu5Acアルファ(2,6)-Gal及びNeu5Acアルファ(2,3)-Galを破壊する効率を迅速に決定する。

【0191】

具体的には、6mlのニワトリ赤血球(SPAFAS Inc., Norwich, CT)を、2倍体積のPBSで希釈し、 $500\times g$ で5分間遠心分離し、元の体積のPBS中に再懸濁する。種々の濃度のシアリダーゼをニワトリ赤血球に添加し、室温で30分間インキュベートする。次いで、細胞を3回洗浄してシアリダーゼタンパク質を除去し、PBSで6mlに再懸濁する。コントロール細胞をBSAと共にインキュベートし、洗浄する。上記列挙の受容体としてNeu5Acアルファ(2,6)-Gal又はNeu5Acアルファ(2,3)-Galのいずれかを認識する種々のインフルエンザウイルス株を、元のウイルスストックのPBSでの連続希釈物(100マイクロリットル)としてマイクロタイタープレート中に調製する。シアリダーゼ処置又はコントロールのニワトリ赤血球懸濁液(上記で調製した100マイクロリットルの0.5%溶液)を、4で各ウェルに添加する。2時間後にプレートを読み取る。血球を凝集させる最も低い濃度のウイルスを、1血球凝集単位と定義する。我々は、全ウイルス株による血球凝集を有効に無効にする酵素を検索する。

30

【0192】

3. ウイルス阻害アッセイ

MDCK細胞のコンフルエントな単層を、種々の濃度のシアリダーゼで1時間処置し、緩衝液で2回洗浄し、種々のインフルエンザウイルス株を感染させる。1時間のインキュベーション後、細胞を再度洗浄して非結合ウイルスを除去する。細胞表面上のウイルス結合部位の減少を確立するために、細胞に寒天を重層し、 37°C でインキュベートする。シアリダーゼ処置細胞中のブランク数を、コントロール細胞と比較する。或いは、細胞を通常の培地中で 37°C で培養し、培養培地中のウイルス力価を、TCID₅₀として種々の培養期間で測定する。

40

【0193】

シアリダーゼ処置によって既存の感染を阻害することができることを証明するために、MDCK単層を、最初に低力価のウイルスで感染させる。非結合ウイルスを洗い流した後、細胞をシアリダーゼの存在下で培養する。新鮮なシアリダーゼを、細胞培養物に24時

50

間毎に添加する。培養培地中のウイルス力価を、72時間にわたって測定する。

【0194】

4. 細胞傷害性アッセイ

初代ヒト気管支上皮細胞を購入し (Clonetics)、製造者の説明書に従って、添加最少培地で培養する。種々の濃度のシアリダーゼを培養培地に添加する。7~10日間にわたって細胞成長を測定する。また、細胞を、微視的細胞変性効果について定期的に観察する。

【0195】

実施例6：シアリダーゼ融合タンパク質の構築及び試験

1. アンカードメインとしてのGAG結合配列の選択

全ての性質 (抗ウイルス活性、毒性、安定性、産生の容易さ等が含まれる) が最良である1つのシアリダーゼを選択する。次いで、我々は、これをGAG結合配列を遺伝学的に連結し、pQEベクターに融合遺伝子をサブクローン化し、大腸菌由来の融合タンパク質を発現及び精製する。

【0196】

我々は、以下の6つの可能なヒトGAG結合配列を選択した：PF4 (aa 47~70) (配列番号2)、IL-8 (aa 46~72) (配列番号3)、及びAT III (aa 118~151) (配列番号4)、ApoE (aa 132~165) (配列番号5)、アンフィレグリン (aa 25~45) (配列番号6)、及びヒト血管関連遊走タンパク質 (human angio-associated migratory p
rotein) (AAMP) (aa 14~25) (配列番号7) (図2)。これらの配列は、一般に、ナノモルレベルの親和性でヘパリンに結合するが、その親和性は、互いに非常に異なり得る (表1)。アンカードメインがシアリダーゼを最も有効に機能させることができるかどうかは明らかではないので、4つ全てのGAG結合配列を、以下のコンストラクトとして、一般的リンカー配列GGGGSを介してN末端及びC末端上のシアリダーゼ遺伝子と融合する。

(GAG結合ドメイン - GGGGS (配列番号10) - シアリダーゼ) ; 及び

(シアリダーゼ - GGGGS (配列番号10) - GAG結合ドメイン)

【0197】

修正ウイルス阻害アッセイによって異なる融合タンパク質を比較する。具体的には、MDC細胞のコンフルエントな単層を、同量の各融合タンパク質で限られた期間処理する (30分間等)。次いで、細胞を緩衝液で2回洗浄して非結合シアリダーゼ融合タンパク質を除去し、培養培地中で更に1時間インキュベートする。その後、細胞にインフルエンザウイルス株1時間添加し、細胞を再度洗浄して非結合ウイルスを除去する。培養培地中のウイルス力価を、TCID₅₀として72時間の培養中に測定する。このアッセイで、非融合シアリダーゼタンパク質を使用して、融合タンパク質と比較する。結果が近すぎて全ての融合タンパク質をランク付けすることができない場合、我々は、融合タンパク質の処置期間 (treatment window) の短縮、タンパク質濃度の減少、及びウイルス攻撃誘発レベルの増加によってアッセイをよりストリンジェントにする。

【0198】

2. 融合タンパク質コンストラクトの至適化

初期の実験から最良の融合タンパク質を選択した後、コンストラクトを、異なるリンカー長の試験によって更に至適化する。これに関して、以下のコンストラクトを作製する。

(シアリダーゼ - (GGGGS (配列番号10))_n (n = 0, 1, 2, 3, 又は4) - GAG結合ドメイン)

上記のように、タンパク質を発現及び精製し、修正ウイルス保護アッセイで比較する。

【0199】

更に、初期のデータがヘパリン硫酸に対する融合タンパク質のより高い親和性によって有効性がより高くなることを示す場合、我々はまた、GAG結合親和性の増加によって有効性を更に改良することができるかどうかを試験することを計画する。以下のようなコン

10

20

30

40

50

ストラクト中の融合タンパク質の多価 G A G 結合機構の作製によってこれを行うことができる。

(シアリダーゼ - (G G G G S (配列番号 1 0)) n - H S 結合ドメイン - G A G 結合ドメイン) ;

又は

(G A G 結合ドメイン - (G G G G S (配列番号 1 0)) n - シアリダーゼ - (G G G G S (配列番号 1 0)) n - G A G 結合ドメイン)

【 0 2 0 0 】

上記のように、精製融合タンパク質を、修正ウイルス保護アッセイでのその活性に基づいてランク付けする。

【 0 2 0 1 】

3 . 細胞傷害性アッセイ

正常な細胞成長及び形態に対する融合タンパク質の効果を、種々の濃度の融合タンパク質との初代ヒト気管支上皮細胞との培養、細胞の成長曲線の追跡、及び任意の微視的細胞変性効果の観察によってモニタリングする。

【 0 2 0 2 】

実施例 7 : 他の感染性微生物に対する融合タンパク質

機能ドメイン及びアンカードメインから構成される融合タンパク質を、多数のより異なる適用のためにデザインする。多数の他の感染性微生物 (パラミクソウイルス (W a s s i l e w a , L . (1 9 7 7) A r c h V i r o l 5 4 : 2 9 9 - 3 0 5) 、コロナウイルス (V l a s a k , R . , L u y t j e s , W . , S p a a n , W . a n d P a l e s e , P . (1 9 8 8) P r o c N a t l A c a d S c i U S A 8 5 : 4 5 2 6 - 4 5 2 9) 、ロタウイルス (F u k u d o m e , K . , Y o s h i e , O . a n d K o n n o , T . (1 9 8 9) V i r o l o g y 1 7 2 : 1 9 6 - 2 0 5) 、緑膿菌 (R a m p h a l , R . a n d P y I e , M . (1 9 8 3) I n f e c t I m m u n 4 1 : 3 3 9 - 4 4) 等) も細胞受容体としてシアル酸を使用することが公知であるので、例えば、本明細書中で提案したシアリダーゼ融合タンパク質を、インフルエンザに加えて他のウイルス及び細菌による感染に対する治療薬 / 予防薬としても使用することができる。例えば、ヘパリン結合ドメインに融合したアプロチニン、インフルエンザに加えて、パラインフルエンザウイルス等の活性化に宿主セリンプロテアーゼを必要とする他のウイルスの感染を防止 / 治療するために使用される融合タンパク質を作製することができる。

【 0 2 0 3 】

実施例 8 : シアリダーゼ触媒ドメイン融合タンパク質のクローニング

巨大細菌シアリダーゼに関する公開された論文によれば、51 k D a のアルスロバクター・ウレアファシエンス (A r t h r o b a c t e r u r e a f a c i e n s) シアリダーゼ、ウエルシュ菌 (C . p e r f r i n g e n s) 由来の 71 k D a のシアリダーゼ、及びアクチノミセス・ビスコサス (A c t i n o m y c e s v i s c o s u s) 由来の 113 k D a のシアリダーゼは、種々のシアル酸抱合体に対する比活性及び広範な基質特異性が類似しているようである (B i o l o g y o f t h e S i a l i c A c i d s (1 9 9 5) , 2 7 0 - 2 7 3 ; C o r f i e l d e t a l . , B i o c h e m . J . , (1 9 8 1) 1 9 7 (2) , 2 9 3 - 2 9 9 ; R o g g e n t i n e t a l . , B i o l . C h e m . H o p p e S e y l e r , (1 9 9 5) 3 7 6 (9) , 5 6 9 - 5 7 5 ; T e u f e l e t a l . , B i o l . C h e m . H o p p e S e y l e r , (1 9 8 9) 3 7 0 (5) , 4 3 5 - 4 4 3) 。第 3 のシアリダーゼ (ミクロモノスポラ・ビリジファシエンス (M i c r o m o n o s p o r a v i r i d i f a c i e n s) 由来の 68 k D a の酵素) は、インフルエンザウイルス受容体を破壊することも公知である (A i r a n d L a v e r , V i r o l o g y , (1 9 9 5) 2 1 1 (1) , 2 7 8 - 2 8 4 ; (1 9 9 5) , 2 7 0 - 2 7 3) 。

【 0 2 0 4 】

A . ビスコサス (A . v i s c o s u s) は、ヒト口腔及び胃腸管の正常な細菌叢の一部である (S u t t e r , R e v . I n f e c t . D i s . , (1 9 8 4) 6 S u p p l 1 , S 6 2 - S 6 6) 。 A . ビスコサス (A . v i s c o s u s) 由来のシアリダーゼが通常はヒト粘膜表面上を宿主とする細菌によって分泌されるので、ヒト粘膜免疫系に耐性を示すはずである。従って、ヒト気道表面に局所的に送達した場合、A . ビスコサスシアリダーゼ (A . v i s c o s u s s i a l i d a s e) は免疫原性を示す可能性が低い。我々は、この特徴により、A . ビスコサスシアリダーゼ (A . v i s c o s u s s i a l i d a s e) が治療薬として良好な候補となると考える。

【 0 2 0 5 】

我々は、アミノ酸 2 7 4 からアミノ酸 6 6 7 までにわたる A . ビスコサスシアリダーゼ (A . v i s c o s u s s i a l i d a s e) がシアリダーゼの触媒ドメイン (A v C D と呼ばれる) を含むはずであり、そのままで完全に活性であるはずであると判断した。その後、我々は、A v C D フラグメントをクローン化し、この A v C D フラグメント及び A . ビスコサスシアリダーゼ (A . v i s c o s u s s i a l i d a s e) タンパク質配列 (配列番号 1 2) の少なくともアミノ酸 2 9 0 ~ 6 6 6 (アミノ酸 2 7 4 からアミノ酸 6 8 1 までにわたるフラグメント、アミノ酸 2 7 4 からアミノ酸 6 6 6 までにわたるフラグメント、アミノ酸 2 9 0 からアミノ酸 6 6 6 までにわたるフラグメント、及びアミノ酸 2 9 0 からアミノ酸 6 8 1 までにわたるフラグメント等) を含む他の A . ビスコサスシアリダーゼ (A . v i s c o s u s s i a l i d a s e) フラグメントがシアリダーゼ活性を有することを証明した。

【 0 2 0 6 】

A . ビスコサスシアリダーゼ (A . v i s c o s u s s i a l i d a s e) タンパク質及び遺伝子の完全な配列を、GenBank から得た (A 4 9 2 2 7 及び L 0 6 8 9 8) 。公知の三次元構造 (M . ビリジファシエンス (M . v i r i d i f a c i e n s) 及びネズミチフス菌 (S . T y p h i m u r i u m)) を有するシアリダーゼとの相同性に基いて、我々は、アミノ酸 2 7 4 ~ 6 6 7 (配列番号 1 6) の間に局在するように、触媒ドメイン (C D) 配列を割り当てた。A . ビスコサスシアリダーゼ (A . v i s c o s u s s i a l i d a s e) (A v C D) の触媒ドメインをクローン化するために、A . ビスコサスシアリダーゼ (A . v i s c o s u s s i a l i d a s e) 遺伝子のこの領域を、大腸菌における発現のために至適化されたコドン (配列番号 1 5) を使用して操作した。A . ビスコサスシアリダーゼ (A . v i s c o s u s s i a l i d a s e) のアミノ酸 2 7 4 ~ 6 6 7 をコードするコドン至適化 A v C D ヌクレオチド配列 (配列番号 1 5) を、アニーリングし、P C R 増幅し、発現ベクター p T r c 9 9 a (A m e r s h a m , N e w J e r s e y , U S A) にクローン化した重複オリゴヌクレオチドの化学合成によって産生した。

【 0 2 0 7 】

標準的な分子クローニング法を使用して、シアリダーゼ融合コンストラクトを作製した。His 6 - A v C D コンストラクトを、A v C D 配列の N 末端残基への 6 つのヒスチジン (H i s 6) の融合によって作製した。His 6 - A R コンストラクトは、配列番号 1 7 のヌクレオチド配列及び配列番号 1 8 の翻訳アミノ酸配列を有する。これらの配列を、図 7 に示す。

【 0 2 0 8 】

A R - A v C D コンストラクトを作製するために、アンカードメインを、A v C D 配列の N 末端残基に直接融合した。A R と呼ばれるアンカードメインは、ヒトアンフィレグリン (h u m a n a m p h i r e g u l i n) 前駆体の G A G 結合配列 (G e n B a n k 番号 A A H 0 9 7 9 9) に由来していた。ヒトアンフィレグリン (h u m a n a m p h i r e g u l i n) 前駆体のアミノ酸 1 2 5 ~ 1 4 5 をコードするヌクレオチド配列 (図 2 、 配列番号 7) を、2 つの重複オリゴヌクレオチドとして化学合成した。A R - A v C D コンストラクトは、配列番号 1 9 のヌクレオチド配列及び配列番号 2 0 の翻訳アミノ酸配列を有する。

【0209】

別のコンストラクト (AR - G4S - AvCD) を、AR - AvCD コンストラクトで
使用した AR コード配列と 5 アミノ酸リンカー (GGGGS ; 配列番号 10) をコードす
る配列と融合し、その後、翻訳産物中でリンカーが A . ビスコサスシアリダーゼ (A . v
i s c o s u s s i a l i d a s e) の触媒ドメインの N 末端に融合するように AvC
D 配列と融合することによって作製した。このコンストラクトのヌクレオチド配列 (配列
番号 34) 及び翻訳アミノ酸配列 (配列番号 35) を図 9 に示す。全コンストラクトを、
pTrc99a 発現ベクターにクローン化した。

【0210】

更に、A . ビスコサスシアリダーゼ (A . v i s c o s u s s i a l i d a s e) の
触媒ドメインを AR の N 末端 (ヒトアンフィレグリン (h u m a n a m p h i r e g u
l i n) の GAG 結合ドメイン ; 配列番号 7) に融合した 4 つのコンストラクトを作製し
た。コンストラクト番号 4 (配列番号 27) では、配列番号 12 のアミノ酸 274 ~ 66
6 からなる A . ビスコサスシアリダーゼ (A . v i s c o s u s s i a l i d a s e) の
触媒ドメインを、アンフィレグリンの GAG 結合ドメイン (配列番号 7) と融合した。
コンストラクト番号 5 (配列番号 29) では、配列番号 12 のアミノ酸 274 ~ 681 から
なる A . ビスコサスシアリダーゼ (A . v i s c o s u s s i a l i d a s e) の触
媒ドメインを、アンフィレグリンの GAG 結合ドメイン (配列番号 7) と融合した。コン
ストラクト番号 6 (配列番号 31) では、配列番号 12 のアミノ酸 290 ~ 666 からな
る A . ビスコサスシアリダーゼ (A . v i s c o s u s s i a l i d a s e) の触媒ド
メインを、アンフィレグリンの GAG 結合ドメイン (配列番号 7) と融合した。コンスト
ラクト番号 7 (配列番号 33) では、配列番号 12 のアミノ酸 290 ~ 681 からなる A
. ビスコサスシアリダーゼ (A . v i s c o s u s s i a l i d a s e) の触媒ドメイ
ンを、アンフィレグリンの GAG 結合ドメイン (配列番号 7) と融合した。全てのこれら
のコンストラクトは、アッセイで類似のシアリダーゼ活性を示した。

【0211】

実施例 9 : シアリダーゼ触媒ドメイン融合タンパク質の産生

シアリダーゼ融合タンパク質を産生するために、発現コンストラクトを、大腸菌 B L 2
1 に形質転換した。1 つのコロニーを、2 . 5 m l の L B ブロスに接種し、震盪しながら
37 °C で一晩成長させた。午前中に、2 m l の一晩培養物を 500 m l の T B 培地を含む
2 リットルの震盪フラスコに接種し、培養物を、OD₆₀₀ = 4 . 0 まで (2 ~ 4 時間)
、震盪しながら 37 °C で成長させた。最終濃度が 1 m M の IPTG の添加によってタンパ
ク質発現を誘導し、攪拌しながら 3 時間継続した。5 , 000 × g で 10 分間の遠心分離
によって細胞を採取した。細胞を 1 回洗浄し (P B S 中に再懸濁し、再度遠心分離する)
、15 m l の溶解緩衝液に再懸濁した。

【0212】

タンパク質の発現及び精製で使用した培地及び緩衝液の組成

タンパク質発現用 T B 培地

溶液 1

B a c t o - トリプトン - 12 g

酵母抽出物 - 24 g

H₂O で 800 m l にする

溶液 2

K H₂ P O₄ (無水) - 2 . 3 g

K₂ H P O₄ (無水) - 12 . 5 g

H₂O で 100 m l にする

【0213】

溶液 1 及び 2 を個別に加圧滅菌し、冷却し、混合し、以下を添加する。

60 ml の 20 % グリセロール (濾過滅菌済)
20 ml の 20 % グルコース (濾過滅菌済)

溶解緩衝液

50 mM リン酸 (pH 8.0)
10 % グリセロール
300 mM NaCl

【0214】

溶解緩衝液に懸濁した細菌細胞を超音波処理によって溶解し、遠心分離によって細胞破片を除去した。明澄化溶解物を、SP-Sephacryl S-200 カラム (ベッド体積 15 ml、流速 120 cm/時間) に通した。内毒素の除去中にフルダーゼが確実に良好に保持されるように、カラムをより低い pH 及び塩を含む 1 体積の PBS に対して再馴化した。1 % Triton X-100、0.5 % デオキシコール酸ナトリウム、及び 0.1 % SDS を含む 5 体積の PBS でのカラムの洗浄によって内毒素を除去した。3 体積の PBS 及び 3 体積の溶解緩衝液を使用して、界面活性剤を洗い流した。タンパク質を、0.8 M NaCl を含む溶解緩衝液を使用してカラムから溶離した。SP-Sephacryl S-200 から溶離した画分を、1.9 M (NH₄)₂SO₄ に調整し (このステップで、ほとんどの含有タンパク質が塩析される)、遠心分離によって明澄化した。上清を、ブチル-Sephacryl S-200 カラムにロードした (流速 120 cm/時間)。カラムを 2 体積の 1.3 M (NH₄)₂SO₄ で洗浄し、融合物を 0.65 M (NH₄)₂SO₄ で溶離した。最終ステップのために、PBS 緩衝液で平衡化した Sephacryl S-200 にて流速 25 cm/時間でサイズ排除クロマトグラフィを行った。以下の段落に記載のように、4-MU-NANA に対するシアリダーゼ活性を決定した。Bio-Rad の Bradford キットを使用してタンパク質濃度を決定した。タンパク質の純度を、SDS-PAGE によって評価し、98 % を超えると推定された。酵素の比活性は、約 937 U/mg であった。最終調製物中の内毒素を、LAL 試験 (Cambrex) を使用して測定し、0.5 EU/ml 未満であると推定された。

【0215】

His6 含有融合タンパク質の精製のために、SP-Sephacryl S-200 による陽イオン交換を、Ni-NTA による金属キレートアフィニティクロマトグラフィで行った。0.25 M イミダゾールを含む溶解緩衝液によって Ni-NTA からの溶離を行ったことを除き、緩衝液は全て同一のままであった。

【0216】

実施例 10: シアリダーゼ触媒ドメイン融合タンパク質の活性を測定するためのシアリダーゼアッセイ

コンストラクト番号 2 によってコードされた AR-AvCD タンパク質のシアリダーゼ活性をアッセイし、ウエルシュ菌 (*C. perfringens*) (Sigma, St. Louis, MO) 及び A. ウレアファシエンス (*A. ureafaciens*) (Prozyme, San Leandro, CA) から精製した天然のシアリダーゼの活性と比較した。更に、アンフィレグリン GAG 配列 (配列番号 7) を Neu2 ヒトシアリダーゼ (配列番号 8) と融合したコンストラクトから産生された融合タンパク質もシアリダーゼ活性についてアッセイした。

【0217】

単位 / mg シアリダーゼとして示したシアリダーゼ活性を、人工的な蛍光発生基質 4-MU-NANA (Sigma) を使用したシアリダーゼアッセイによって測定した。1 単位のシアリダーゼを、0.2 ml の 20 nM の 4-MU-NANA を含む反応物中における 37 °C で 10 分間に 10 nM の 4-MU-NANA から放出される酵素の量 (50 mM CH₃COOH-NaOH 緩衝液 (pH 5.5)) と定義する。1 ml の 0.2 M グリシン / NaOH (pH 10.2) の添加によって反応を停止させる。4-メチル

10

20

30

40

50

ウンベリフェロン (4 - M U) を使用して、365 nmでの励起及び445 nmでの発光を使用した蛍光光度計で蛍光発光を測定して、検量線を得る (Potier et al . , Anal . Biochem . , (1979) 94 (2) , 287 - 296) 。
【 0 2 1 8 】

表2: シアリダーゼの比活性(単位/mg)

シアリダーゼ	比活性
AR-NEU2	8
AR-AvCD	937
ウエルシュ菌	333
A. ウレアファシエンス	82

10

【 0 2 1 9 】

我々の結果は、AvCD融合タンパク質 (AR - AvCD) が試験した全てのシアリダーゼのうちで最も高い比活性を有することを示す (表 2) 。 AR - AvCDの比活性は、ヒトシアリダーゼ融合物 (AR - NEU2) の比活性の100倍超であり、ウエルシュ菌 (C . perfringens) シアリダーゼの比活性の2倍超である。シアリダーゼの安定性を比較した実験結果は、AR - AvCDが非常に高い安定性を示す。25 又は4 の溶液中で20週間後にAR - AvCDの活性の喪失は検出されなかった。比較すると、AR - NEU2溶液は、それぞれ25 及び37 で保存した場合の半減期は5週間及び2週間であった。

20

【 0 2 2 0 】

実施例 1 1 : シアリダーゼ触媒ドメイン融合タンパク質のN末端の至適化

AR - AvCD融合タンパク質のN末端は、一定の条件下で部分的に切断され、程度は小さいが精製AR - AvCD調製物中のタンパク質が不均一になる。この問題を解決するために、我々は、シアリダーゼ融合タンパク質のN末端を至適化するためのアプローチをデザインした。N末端に無作為なアミノ酸を有するAR - AvCDを含むライブラリーを、以下のように構築した。AR - AvCDを、遺伝子の5'末端上にアニーリングするプライマーがアミノ酸2及び3に対応する位置に無作為化配列を含むプライマー対を使用したPCRによって増幅した。プライマーのヌクレオチド配列及びコードされるアミノ酸配列を以下に示す。

30

t t t t c g t c t c c c a t g v n n v n n a a g c g c a a a a a a a a g g c g g c a (配列番号 3 2)

Met X x X x x L y s A r g L y s L y s L y s G l y G l y (配列番号 3 3)

【 0 2 2 1 】

配列番号 3 2 では、「n」は、任意のヌクレオチド (a、c、g、又はt) を示し、「v」はヌクレオチド a、g、又はcを示す。このような方法での配列デザインにより (コドンの最初の位置にヌクレオチドtは不可能である) 、我々は、終始コドン並びに芳香族アミノ酸 (P h e、T y r、T r p) 及びC y sの移入を回避した。NcoI適合性オーバーハングが生成されるようにEsp3I制限エンドヌクレアーゼ部位 (太字で示す) を移入した。遺伝子の3'末端にアニーリングするプライマーは、終始コドンの後にHindIII部位を保有していた。Esp3I - HindIIIで消化したPCR産物を、NcoI - HindIIIで消化したpTrc99a発現ベクターにライゲーションした。ライゲーション混合物を、大腸菌で形質転換し、細胞を、アンピシリンを含む液体培養にて一晩成長させた。

40

【 0 2 2 2 】

翌日、培養物を、新鮮な培地で希釈し、OD₆₀₀ = 0.8まで成長させ、IPTGで2時間誘導した。細胞を採取し、ホモジナイズし、融合物を液体クロマトグラフィによって2ステップ精製に供した。明澄化した溶解物を、溶解緩衝液 (50 mM HEPES、

50

pH 8.0、0.3 M NaCl、10%グリセロール)で平衡化したSP-Sepharoseにロードした。カラムを、0.45 M NaClで洗浄し、融合物を0.9 M NaClで溶離した。溶離物を、10%グリセロールで希釈して、NaCl濃度を0.2 Mにし、Heparin-Sepharoseカラムにロードした。カラムを、直線勾配のNaClで展開した。シアリダーゼ活性を含む画分を、SDS-PAGEで分離し、PVDF膜にエレクトロブロットイングし、43 kDaのバンドを、アミノ末端配列決定に供した。

【0223】

単離シアリダーゼ融合タンパク質の主なN末端残基は、Val又はGlyのいずれかであり、その後ARタグのN末端残基が存在する。次いで、我々は、コンストラクト番号2及び3によってコードされる最初の6つのアミノ酸が(Met-Val-Lys-Arg-Lys-Lys(配列番号23))であるように、AR配列の前にValを移入することによって新規のシアリダーゼ融合コンストラクト(コンストラクト番号2及び3)を合成した。これらの新規の融合コンストラクトから作製したタンパク質のN末端配列は100%相同であり、開始Metが完全に除去されており(治療タンパク質として望ましい)、Valは最初のN末端残基であり、その後のARタグ配列が存在する。これらのデータは、タンパク質のN末端アミノ酸残基の融合物としてのN末端プロセッシング及びタンパク質安定性の共通規則を報告した以前の刊行物と一致する(Hirel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., (1989) 86(21), 8247-8251; Varshavsky, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., (1996) 93(22), 12142-12149)。

【0224】

新規の融合コンストラクト番号2(至適化N末端を有するAR-AvCD)のヌクレオチド配列(配列番号24)及びそのアミノ酸配列翻訳物(配列番号25)を図10に示す。新規の融合コンストラクト番号3(至適化N末端を有するAR-G4S-AvCD)のヌクレオチド配列(配列番号36)及びそのアミノ酸配列翻訳物(配列番号37)を図11に示す。コンストラクト番号2を感染させた大腸菌から単離したプロセッシングされたタンパク質のアミノ酸配列を本明細書中に配列番号38として提供し、コンストラクト番号3を感染させた大腸菌から単離したプロセッシングされたタンパク質のアミノ酸配列を本明細書中に配列番号39として提供する。

【0225】

実施例12: アンカードメインを含むか含まないシアリダーゼコンストラクトの活性の比較

ARコンストラクトが実際にシアリダーゼ融合タンパク質の細胞表面活性を改善するかどうかを評価するために、我々は、コンストラクト番号2(図7に示す配列番号24)又はコンストラクト番号1(His6-AvCD、図5に示す配列番号17)で形質転換した大腸菌から精製したタンパク質を初代ヒト気管支上皮細胞とインキュベートし、十分な洗浄後に細胞結合シアリダーゼ活性を測定した。コンストラクト番号2タンパク質(配列番号25)とインキュベートした細胞について、10%までのシアリダーゼが細胞に結合していることが見出され、細胞結合シアリダーゼ活性は、コンストラクト番号2タンパク質の投入濃度によって用量依存的様式で増加した。しかし、コンストラクト番号1タンパク質(配列番号18)とインキュベートした細胞は、バックグラウンドレベルのシアリダーゼ活性しか示さなかった。更に、我々は、コンストラクト番号2タンパク質又はコンストラクト番号1タンパク質のいずれかでMDC細胞を処理し、細胞表面上の残存アルファ(2,6)結合シアル酸レベルを測定した(図8)。100 mU/ウェル未満の酵素活性と同一レベルで、コンストラクト番号2タンパク質は、コンストラクト番号1タンパク質より顕著に高い有効性を示した。これらの結果は、ARドメインが実際にシアリダーゼ機能を増強させることを示す。

【0226】

実施例13: シアリダーゼ融合タンパク質のin vitro活性

インフルエンザウイルスのストック

インフルエンザウイルス株を、ATCC及びSt. Jude Children's Research Hospitalの貯蔵所から入手する。インフルエンザウイルスに
関与する全ての実験を、生物安全レベルIIで行う。

【0227】

ウイルスを、0.3%ウシ血清アルブミン及び0.5マイクログラム トリプシン/mlを補足した最少基本培地(MEM)中にてMadin-Darbyイヌ腎臓(MDCK)細胞上で成長させる。48~72時間のインキュベーション後、培養培地を低速遠心分離によって明澄化する。ウイルス粒子を、25%スクロースクッションによる超遠心によってペレット化する。精製ウイルスを、50%グリセロール-0.1M Tris緩衝液(pH 7.3)に懸濁し、-20℃で保存する。

10

【0228】

細胞防御アッセイ

コンストラクト番号2AR-AvCDタンパク質がインフルエンザウイルスから細胞を防御する能力を評価するために、我々は、最初にMDCK細胞をコンストラクト番号2から作製したAR-AvCD又はA.ウレアファシエンス(A. ureafaciens)から単離した広範な細菌シアリダーゼで処置し、広範囲に選択したヒトインフルエンザウイルス(IFV)(ヒトIFV AのH1、H2、及びH3サブタイプ、ヒトIFV Bが含まれる)及びトリIFV株で細胞を攻撃した。図9に示すように、コンストラクト番号2から作製した融合タンパク質は、80~100%の細胞防御を示し、これは、A.ウ
レアファシエンス(A. ureafaciens)シアリダーゼの効果に匹敵していた。

20

【0229】

アッセイを実施するために、MDCK細胞を、10mUのAR-AvCDタンパク質(1コンストラクト番号2を使用して作製)又はA.ウレアファシエンス(A. ureafaciens)の単離シアリダーゼにて37℃で2時間処置した。その後、細胞を、MOI 0.1のインフルエンザウイルスで1時間攻撃した。細胞を洗浄し、0.2%ITS(GIBCO)及び0.6マイクログラム/mlアセチル化トリプシン(Sigma)を補足した新鮮なDMEM:F12中でインキュベートした。細胞を、0.5%クリスタルバイオレット及び20%メタノールで5分間染色し、水道水で洗浄処理した。各ウェル中の生きた細胞のレベルを、70%エタノールによるクリスタルバイオレットの抽出及び5
70nMでの読み取りによって定量した。細胞防御を、 $100 \times \{ (\text{シアリダーゼ処置サンプル} - \text{ウイルスのみ}) / (\text{非感染サンプル} - \text{ウイルスのみ}) \}$ によって計算した。

30

【0230】

IFV阻害アッセイ

我々は、細胞ベースのELISA法を使用して、AR-AvCDタンパク質(コンストラクト番号2を使用して作製)及びAR-G₄S-AvCDタンパク質(コンストラクト番号3を使用して作製)によってIFV増幅阻害を評価した(Belshenet al., J Virol., (1988) 62(5), 1508-1512)。

【0231】

アッセイを実施するために、96ウェルプレート中のMDCK単層を、16mUのコンストラクト番号2から作製したシアリダーゼAR-AvCD、或いはコンストラクト番号3から作製したAR-G₄S-AvCDを含むEDB/BSA緩衝液(10mM酢酸ナトリウム、150mM NaCl、10mM CaCl₂、0.5mM MgCl₂、及び0.5% BSA)にて37℃で2時間処置した。シアリダーゼ処置及び非処置コントロール細胞(EDB/BSA緩衝液のみで処置)の両方を、0.1MOIのウイルスに感染させた。1時間後、細胞をPBSで2回洗浄し、0.2%ITS(GIBCO)及び0.6マイクログラム/mlアセチル化トリプシン(Sigma)を補足したDMEM:F12中でインキュベートした。感染から40時間~48時間後、細胞結合ウイルスレベルを、細胞ベースのELISAアッセイの使用によって決定した。具体的には、細胞を、0.05%グルタルアルデヒドを含むPBSで固定し、50マイクロリットルの抗インフルエ

40

50

ンザ A N P 抗血清又は抗インフルエンザ B (F i t z g e r a l d I n c .) を含む 0 . 5 % B S A の 10^3 希釈物並びに P B S と 37 ° で 1 時間インキュベートした。洗浄後、各ウェルを、H R P - タンパク質 G を含む 0 . 5 % B S A 及び P B S と 1 時間インキュベートした。最終洗浄後、50 マイクロリットルの 0 . 02 % 3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン二塩酸 (S i g m a) 及び 0 . 01 % 過酸化水素を含む 25 mM クエン酸ナトリウム (p H 4 . 5) を、細胞と室温で 5 分間反応させた。50 マイクロリットルの 1 M H_2SO_4 の添加によって反応を停止させ、450 nm での光学密度の測定によって定量した。ウイルス複製阻害率を、 $100\% \times \{ (\text{ウイルスのみのサンプル} - \text{シアリダーゼ処置サンプル}) / (\text{ウイルスのみのサンプル} - \text{非感染サンプル}) \}$ によって計算した。

10

【0232】

種々のヒトインフルエンザ A 型ウイルス及びインフルエンザ B 型ウイルス並びにウマインフルエンザウイルスにおけるコンストラクト番号 2 から作製された組換えシアリダーゼ融合タンパク質 A R - A v C D 及びコンストラクト番号 3 から作製された A R - G₄ S - A v C D についてのウイルス複製阻害、細胞防御 E C 50、及び選択指標に関するデータを図 12 に示す。

【0233】

図 10 に示すように、シアリダーゼ融合タンパク質は、広範に選択されたインフルエンザウイルスの増幅を強く阻害した。とりわけ、シアリダーゼ処置では最大で 70 ~ 80 % の細胞表面シアル酸が除去されたが (図 8)、80 ~ 100 % のウイルス阻害 (図 10) 及び細胞防御 (図 9) が達成された。この所見により、本発明のシアリダーゼ融合タンパク質での処置による所望の治療効果を達成するために、細胞表面シアル酸を完全に排除する必要がないことが証明された。残存する 20 ~ 30 % の表面シアル酸は、シアリダーゼ融合タンパク質が接近不可能である一方で、おそらく、インフルエンザウイルスも接近不可能である。

20

【0234】

シアリダーゼ融合タンパク質の細胞傷害性

A R - A v C D 又は A R - G₄ S - A v C D タンパク質 (コンストラクト番号 2 及び 3 から作製) の細胞傷害性を評価するために、M D C K 細胞を、低密度で 96 ウェルプレートに播種し、10 % F B S、及び、ウェルあたり 20 U までの A R - A v C D タンパク質、又は A R - G₄ S - A v C D タンパク質を含む D M E M 中で 5 日間培養した (両シアリダーゼは、全実験中に完全な活性を保持していた)。A R - A v C D 又は A R - G₄ S - A v C D 処置ウェル又はコントロールウェル中の細胞密度を、クリスタルバイオレットでの細胞の染色及び 570 nm での吸光度の測定によって毎日決定した。最も高い濃度の A R - A v C D 又は A R - G₄ S - A v C D (100 U / m l) を含む培養物でさえも、細胞成長は阻害されなかった。従って、A R - A v C D 又は A R - G₄ S - A v C D の I C₅₀ (細胞成長が 50 % 阻害される薬物濃度である) は、約 100 U / m l である。

30

【0235】

実施例 14 : シアリダーゼ触媒ドメイン融合タンパク質の *in vivo* 活性

フェレットに、ヒト非適合インフルエンザウイルスを感染させてヒトに匹敵する疾患の徴候を得て、ザナミビル (R e l e n z a) 等の抗ウイルス化合物で処置することができる (M e n d e l e t a l . , A n t i m i c r o b A g e n t s C h e m o t h e r , (1998) 42 (3) , 640 - 646 ; S m i t h a n d S w e e t , R e v . I n f e c t . D i s . , (1988) 10 (1) , 56 - 75 ; R e u m a n e t a l . , J . V i r o l . M e t h o d s , (1989) 24 (1 - 2) , 27 - 34)。我々の化合物の *in vivo* 有効性を評価するために、我々は、フェレットモデルにおける A R - A v C D タンパク質 (コンストラクト番号 2 から作製) を試験した。具体的には、試験によって血清中の抗血球凝集素抗体の存在について陰性であった 24 匹の幼若メスフェレット (0 . 5 ~ 0 . 8 k g) (M a r s h a l l F a r m s , N o r t h R o s e , N Y) を、本研究に含めた。2 種の動物を各ケージに入れ、試験前に

40

50

3日間馴化させた。動物を、以下の3つの群に無作為に分けた：8匹を、薬物希釈緩衝液及びウイルス攻撃で処置し、12匹をAR-AvCD及びウイルス攻撃で処置し、4匹をAR-AvCDのみで処置した。500U/mlのシアリダーゼ活性及び0.7mg/mlのタンパク質濃度のリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)に溶解したAR-AvCDの調製物を本研究で使用した。薬物処置群の動物に、合計で約1mg/kgの投薬量レベルに達する各用量の1mlのAR-AvCDを投与した。

【0236】

フェレットを麻酔し、AR-AvCD又はPBSを鼻腔内に(各鼻孔に0.5ml)全部で7日間(ウイルス攻撃の2日前からウイルス接種の5日後まで)毎日2回(午前8時及び午後6時)接種した。フェレットを、薬物適用後に不耐性の徴候について観察した。3日目の午前10時と11時との間にウイルス接種を行った。10⁵TCID₅₀の用量の(10⁴を超えるフェレットID₅₀)ヒトA/BzYern/7/95(H1N1)様ウイルスを使用してウイルス攻撃を行った。全動物から鼻洗浄物を回収し、これを、AR-AvCD処置の2日後から開始し、7日目まで続けた。鼻洗浄物を回収するために、1mlのPBSを鼻腔内投与し、鼻水(sneezed liquid)を採取し、その体積を記録した。鼻洗浄物を遠心分離した。ペレット化した細胞を再懸濁し、血球計にて顕微鏡下で計数した。上清を回収し、等分し、-80℃で保存した。無細胞鼻洗浄物中のタンパク質濃度を、製造者の説明書にしたがったBio-Radタンパク質試薬(Bio-Rad, Hercules, CA)の使用によって決定した。鼻洗浄物のウイルス滴定のために、接種したMDCK細胞を、CO₂インキュベーター中、36℃で3日間インキュベートした。単層を、細胞変性効果(CPE)について視覚的に検査し、各ウェル由来の細胞培養上清のアリコートを用いた標準的な血球凝集アッセイによってウイルスの存在について試験した。ウイルス力価を、Spearman Karber法(1996)によって決定した。

【0237】

鼻腔内AR-AvCDを投与した非感染動物(n=4)では、鼻洗浄物中の炎症細胞数及びタンパク質濃度に対する明らかな効果は認められなかった(図15A及びB)。これらの動物由来の鼻洗浄物を、7日間追跡し、ウイルス排出(viral shedding)について全て陰性であった。これらの動物において、本研究で使用した薬物用量では薬物関連毒性の徴候は検出されなかった。賦形剤処置群では、8匹の全フェレットの鼻上皮中でウイルスが複製された。ウイルス排出(viral shedding)は、攻撃から1~2日後に4.4~5.9log₁₀TCID₅₀(平均ピーク力価は4.9)のピーク値に達し、時間と共に減少し、5日目までに陰性になった(図13)。それに反して、12匹のAR-AvCD処置フェレットのうちのわずか3匹が攻撃から1日後にウイルス排出(viral shedding)についての陽性であり(図13)、その鼻ウイルス力価は、賦形剤動物の訳1/100であった(平均2.4±0.3対4.4±0.4log₁₀TCID₅₀)(図13)。1日後、AR-AvCDに対する反応は実質的に変化した。動物は、感染、疾患の徴候、及び炎症反応から完全に防御された(図13、フェレットタグ番号803、805、806)。攻撃から14日後のセロコンバージョンの欠如によっても防御を確認した。1匹のフェレット(タグ番号780)は、攻撃後の最初の3日間にウイルスは排出されなかったが、関連しない損傷によって感染4日目に死亡した。残りの8匹のフェレットにおける排出は、一連の感染の間に変化し、その範囲は、1日間のみウイルスを排出したフェレット番号812から5日間ウイルスを排出したフェレット番号791までであった。

【0238】

少なくとも1日間ウイルスを排出したフェレットの感染を、攻撃後抗HA抗体力価(セロコンバージョン)の16倍を超える増加によって確認した。攻撃後、血清の抗HA力価に対するAR-AvCD処置の明らかな効果は認められなかった(320-1280対160-1280、それぞれ賦形剤処置群及び薬物処置群)。

【0239】

10

20

30

40

50

AR - AvCDで処置したにも関わらずウイルスを排出したフェレット (n = 8) では、常に昏睡状態で熱のある未処置のフェレットと比較して、炎症反応が減少し、動物がより機敏且つ活動的なようであった。感染したこの8匹の群について (AR - AvCD処置動物)、鼻タンパク質濃度について計算した平均AUC (曲線下面積) 値は、賦形剤処置感染動物と比較して、約40%減少した (2.68対4.48、任意の単位) (図11B)。賦形剤処置感染動物では、攻撃から2日後の鼻洗浄物中の炎症細胞数は、非感染動物の約100倍に増加した。これらのレベルは、更に4日間持続した。AR - AvCD処置動物は、鼻洗浄物中の炎症細胞数が有意に減少した。具体的には、細胞数についてのAUC値は、賦形剤処置感染動物と比較して、AR - AvCD処置動物で約1/3に減少した (1965対674、任意の単位、図11A)。炎症反応で認められた減少は、感染の初期段階でウイルス複製の阻害の重要性を示す。

10

【0240】

実施例15：シアリダーゼ融合タンパク質による細菌細胞接着の阻害

細菌

肺炎球菌 (S. pneumoniae)：異なる血清型の10種の被包性株を、ATCCに寄託されている臨床分離株から選択する。細菌を凍結ストックとして維持し、3%ヒツジ血液 (Difco & Micropure Medical Inc.) を含むトリプシンダイズ寒天プレート上に5%CO₂下にて37℃で18時間継代した。肺炎球菌 (S. pneumoniae) を放射性同位体で標識するために、1~2日目のプレート培養物から接種物を取り、70μCiの[³H]リジン/mlを含むリジン欠損トリプシンダイズブロスに添加し、5%CO₂下にて37℃でインキュベートした。各培養物の成長を、595nmでの光の吸収によってモニタリングする。対数後期で細菌を採取し、遠心分離 (13,000rpm×3分) によって2回洗浄し、L-15培地 (フェノールレッドを含まない) + 0.1%BSA (L-15-BSA) に再懸濁した (Cundell and Tuomanen, Microb. Pathog., (1994) 17(6), 361-374) (Barthelsson et al., Infect. Immun., (1998) 66(4), 1439-1444)。

20

【0241】

インフルエンザ桿菌 (H. influenzae)：5種のb型株 (Hib) 及び10種の分類不可能な株 (NTHi) を、ATCCに寄託されている臨床分離株から選択する。全株を、ヘミン (ICN) 及びNAD (Sigma) を含む脳心臓浸出物 (BHI, Difco) 中にストックし、使用するまで凍結させ、その後、これらを、ヘミン及びNADを補足したBHI寒天上で培養し、5%CO₂下にて37℃で14時間成長させた。 (Kawakami et al., Microbiol. Immunol., (1998) 42(10), 697-702)。[³H]で細菌を標識するために、インフルエンザ桿菌 (H. influenzae) 細胞を、ヘミンNAD、及び250μCi/mlの[³H]ロイシンを含むBHIブロスに接種し、対数後期まで成長させ、洗浄し、L-15-BSAに再懸濁した (Barthelsson et al., Infect. Immun., (1998) 66(4), 1439-1444)。

30

【0242】

細胞接着アッセイ

全ての[³H]標識細菌を、洗浄後にL-15-BSAに懸濁し、Petroff-Hausserチャンパーでの目視による計数によって細菌の濃度を決定し、シンチレーションカウンティングによって放射能を決定し、[³H]標識細胞の比活性を計算する。7cpm/1000細胞又はそれを超える細菌の調製物を使用する。細菌を、5×10⁸細胞/mlに希釈する。BEAS-2B細胞単層を、5×10⁷細菌を含む[³H]標識細菌懸濁液と、5%CO₂下にて37℃でインキュベートした。30分後、非結合細菌を、L-15-BSAで5回の洗浄によって除去する。WD-HAE組織に付着した細菌を、シンチレーションカウンティングによって定量した。

40

【0243】

50

シアリダーゼ融合タンパク質による B E A S - 2 B 細胞の脱シアル及びインフルエンザ桿菌 (H . i n f l u e n z a e) 及び肺炎球菌 (S . p n e u m o n i a e) による細胞接着に対する効果

B E A S - 2 B 細胞を、1 ~ 5 0 m U の A R - A v C D と 2 時間インキュベートする。上記のように、インフルエンザ桿菌 (H . i n f l u e n z a e) 株及び肺炎球菌 (S . p n e u m o n i a e) 株を使用して、細胞接着アッセイを行う。正のコントロールとして偽処置細胞を使用する。A R - A v C D の有効性を、細菌付着に対して 5 0 % 阻害を達成するための酵素の量である E C ₅₀ として定量する。

【 0 2 4 4 】

実施例 1 6 : シアリダーゼ融合タンパク質を使用した A A V ベクターの形質導入効率の改良

i n v i t r o 実験

公開された手順と類似の方法で、A R - A v C D の効果を証明する実験を行う (B a l s e t a l . , J V i r o l . , (1 9 9 9) 7 3 (7) , 6 0 8 5 - 6 0 8 8) 。十分に分化した気道上皮 (W D A E) 細胞の単層を、t r a n s w e l l 中で維持する (K a r p e t a l . , M e t h o d s M o l . B i o l . , (2 0 0 2) 1 8 8 , 1 1 5 - 1 3 7 ; W a n g e t a l . , J V i r o l . , (1 9 9 8) 7 2 (1 2) , 9 8 1 8 - 9 8 2 6) 。細胞表面からシアル酸を排除するために、培養培地を、0 . 5 ~ 1 0 単位の A R - A v C D が溶解された無血清培地と置換する。細胞を、3 0 分間 ~ 6 時間処置する。細胞単層を洗浄し、A A V で形質導入し、形質導入効率を、標準的な手順を使用して推定する。いくつかの t r a n s w e l l を、コントロールの目的で用いるために培地のみ (A R - A v C D なし) で処置する (基本形質導入効率) 。更なるコントロールには、脱シアルの細胞傷害性効果を評価するための A R - A v C D のみで処置した t r a n s w e l l が含まれ得る。形質導入細胞の検出を容易にするためにレポーターウイルスを使用する。レポーター A A V 及びその使用の例は、文献に記載されており、A A V - C M V - e G F P 、 A A V 2 L a c Z (B a l s e t a l . , J V i r o l . , (1 9 9 9) 7 3 (7) , 6 0 8 5 - 6 0 8 8 ; W a n g e t a l . , H u m . G e n e T h e r , (2 0 0 4) 1 5 (4) , 4 0 5 - 4 1 3) 、及びアルカリホスファターゼ (H a l b e r t e t a l . , N a t . B i o t e c h n o l . , (2 0 0 2) 2 0 (7) , 6 9 7 - 7 0 1) が含まれる。効率を、固定し、適切な基質 (l a c Z 又は A P 含有ウイルスを使用する場合) で処置した細胞の光学顕微鏡法又は生きた細胞の蛍光顕微鏡法 (G F P を使用する場合) によって推定する。N H B E 初代上皮細胞 (C a m b r e x , W a l k e r s v i l e , M D) を使用して N e x B i o で行った実験に従って、t r a n s w e l l あたり 1 0 単位の A R - A v C D を使用した場合に 1 時間未満で最大量のシアル酸が除去される。使用した他の細胞株 (例えば、M D C K) は、はるかに少ない A R - A v C D の投与量で脱シアルするようになる (1 時間で 0 . 1 U) 。従って、我々は、1 0 U の A R - A v C D で 2 時間の W D A E 処理で接近可能なシアル酸を除去し、A A V での W D A E 細胞の形質導入を有意に増強するのに十分であると予想する。

【 0 2 4 5 】

動物モデルにおける A A V 形質導入に対する A R - A v C D 処置の効果の試験

動物モデルにおける A R - A v C D 処置の効果を証明するために、以前に記載の実験に類似の実験を行う (F l o t t e e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A , (1 9 9 3) 9 0 (2 2) , 1 0 6 1 3 - 1 0 6 1 7 ; H a l b e r t e t a l . , N a t . B i o t e c h n o l . , (2 0 0 2) 2 0 (7) , 6 9 7 - 7 0 1) 。A A V 投与の数時間前 (1 ~ 6 時間前) に、以前に公開されたプロトコールに従って、A R - A v C D を、エアゾール又は凍結乾燥 A R - A v C D 粉末の鼻吸入によってマウスの肺に送達させる (F l o t t e e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A , (1 9 9 3) 9 0 (2 2) , 1 0 6 1 3 - 1 0 6 1 7) 。前に記載のように、レポーター遺伝子 (アルカリホスファターゼ) を保有する A A V を鼻吸入によって送達し、4 週間後にマウスを安楽死させ、固定した肺中の形質導入細胞を検出す

る (Halbert et al., J Virol., (1998) 72 (12), 9795 - 9805)。

【0246】

実施例 17: シアリダーゼ処置により、気管中の肥満細胞機能及び平滑筋収縮が阻害される。

前に記載の実験方法を使用して (Cocchiara et al., J Neuroimmunol., (1997) 75 (1-2), 9-18)、本発明の化合物による処置により、肥満細胞によるヒスタミン放出を誘導する基質 P (SP) を妨害することを証明する。別の実験組を使用して (Stenton et al., J Pharmacol. Exp. Ther., (2002) 302 (2), 466-474)、本発明の化合物による処置により、2つの PAR 活性化ペプチドによって刺激された肥満細胞による -ヘキソサミニダーゼ放出が阻害される (PAR は、プロテイナーゼ活性化受容体を示す)。

【0247】

前に記載のように、本発明の化合物を、モルモットに気管内投与し、動物における気道反応性を評価する (Jarreau et al., Am. Rev. Respir. Dis., (1992) 145 (4 Pt 1), 906-910; Stenton et al., J Pharmacol. Exp. Ther., (2002) 302 (2), 466-474)。シアリダーゼ処置は、複数の誘導因子との反応によって判断される非特異的気道過敏症を誘導しないはずである。更に、シアリダーゼ処置により、基質 P 誘導性気管支収縮が軽減されるはずである。同様に、本発明の化合物を使用して、モルモット及びラットの気管及び肺を処置及び単離する (Kai et al., Eur. J. Pharmacol., (1992) 220 (2-3), 181-185; Stenton et al., J Pharmacol. Exp. Ther., (2002) 302 (2), 466-474)。また、組換えシアリダーゼ処置は、アセチルコリン、ヒスタミン、及び 5-ヒドロキシトリプタミンによって誘導された平滑筋収縮に影響を与えない。更に、これは、抗原 (オボアルブミン) 又は化合物 48 / 80 によって誘導された気管支収縮を阻害する。

【0248】

引例

Achyuthan, KE and Achyuthan AM. 2001. Comparative enzymology, biochemistry and pathophysiology of human exo a sialidases (neuraminidases). Comparative Biochem & Physiol part B 129: 29-64.

Air, GM and Laver, WG. 1995. Red cells bound to influenza virus N9 neuraminidase are not released by the N9 neuraminidase activity. Virology 211: 278-284.

Auerswald EA, Horlein D, Reinhardt G, Schroder W and Schnabel E. 1988. Expression, isolation and characterization of recombinant [Arg¹⁵, Glu⁵²]Aprotinin. Biol Chem Hoppe Seyler Vol 369, Suppl., pp 27-35.

Barbey Morel CL, Oeltmann TN, Edwards KM and Wright PF. 1987. Role of respiratory tract proteases in infectivity of influen

10

20

30

40

50

za A virus. J Infect Dis 155:667 672.

Besette PH, Aslund F, Beckwith J and Georgiou G. 1999. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. Proc Natl Acad Sci USA 96:13703 13708.

Callan RJ, Hartmann FA, West SE and Hinshaw VS. 1997. Cleavage of influenza A virus H1 hemagglutinin by swine respiratory bacterial proteases. J Virol 71:7579 7585. 10

Connor, RJ, Kawaoka, Y, Webster, RG and Paulson JC. 1994. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. Virology 205:17 23.

Copley, RR, Russell, RB and Ponting, CP. 2001. Sialidase like Asp boxes: sequence similar structures within different protein folds. Prot Sci 10:285 292. Corfield, AP, Vesh, RW, Wember, M, Michalski, JC and Schauer, R. 1981. The release of N acetyl and N glycolloyl neuraminic acid from soluble complex carbohydrates and erythrocytes by bacterial, viral and mammalian sialidases. Biochem J 197:293 299. 20

Crennell, SJ, Garman, E, Laver, G, Vimr, E and Taylor, G. 1994. Crystal structure of *Vibrio Cholerae* neuraminidase reveals dual lectin like domains in addition to the catalytic domain. Structure 2:535 544. 30

Drzeniek, R. Substrate specificity of neuraminidases. 1973. Histochem J 5:271 290.

Endo Y, Carroll KN, Ikizler MR and Wright PF. 1996. Growth of influenza virus in primary, differentiated epithelial cells derived from adenoids. J Virol 70:2055 2058. 40

Fritz H and Wunderer G. 1983. Biochemistry and applications of aprotinin, the kallikrein inhibitor from bovine organs. Arzneim Forsch 33:479 494.

Fukudome, K., Yoshie, O. and Konno, T. 1989. C 50

omparison of human, simian, and bovine rotaviruses for requirement of sialic acid in hemagglutination and cell adsorption. *Virology* 172:196-205.

Garten W, Bosch FX, Linder D, Rott R and Klenk HD. 1981. Proteolytic activation of the influenza virus hemagglutinin: the structure of the cleavage site and the enzymes involved in cleavage. *Virology* 115:361-374.

10

Goger, B, Halden, Y, Rek, A, Mosl, R, Pye, D, Gallagher, J and Kungl, AJ. 2002. Different affinities of glycosaminoglycan oligosaccharides for monomelic and dimeric interleukin 8: a model for chemokine regulation at inflammatory sites. *Biochem* 41:1640-1646.

20

Gotoh B, Ogasawara T, Toyoda T, Inocencio N, Hamaguchi M and Nagai Y. 1990. An endoprotease homologous to the blood clotting factor X as a determinant of viral tropism in chick embryo. *EMBO J* 9:4189-4195.

Granoff, A. & Webster, R. G., ed. *Encyclopedia of Virology*, 2nd Edition, Vol 2.

Gust, ID, Hampson, AW. and Lavanchy, D. 2001. Planning for the next pandemic. *Rev Med Virol* 11:59-70.

30

Hayden, FG. 1996. Amantadine and rimantadine mechanisms. In *Antiviral drug resistance* (ed. D. D. Richman), pp. 59-77. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd.

Hosoya M, Matsuyama S, Baba M, Susuki H and Shigeta S. 1992. Effects of protease inhibitors on replication of various myxoviruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36:1432-1436.

40

Ito, T. 2000. Interspecies transmission and receptor recognition of influenza A virus. *Microbiol Immunol* 44(6):423-430.

Janakiraman, MN, White, CL, Laver, WG, Air, GM and Luo, M. 1994. Structure of influenza v

50

irus neuraminidase B/lee/40 complexed with sialic acid and a dehydro analog at 1.8 Å resolution: implications for the catalytic mechanism. *Biochemistry* 33:8172-8179.

Kido, H, Niwa, Y, Beppu, Y and Towatari, T. 1996. Cellular proteases involved in the pathogenicity of enveloped animal viruses, human immunodeficiency virus, influenza virus A and sendai virus. *Adv Enzyme Regul* 36:325-347.

10

Kido H, Chen Y and Murakami M. 1999. Cellular proteinases and viral infection: influenza virus, sendai virus and HIV I, p. 205-217. In B. Dunn (ed.), *Proteases of infectious agents*. Academic Press, New York, N.Y. Klenk, HD and Rott, R. 1988. The molecular biology of influenza virus pathogenicity. *Adv Vir Res* 34:247-281.

20

Klenk, HD and Garten W. 1994. Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trend Micro* 2:39-43.

Kreisel, W, Volk, BA, Buchsel, R. and Reutter, W. 1980. Different half-lives of the carbohydrate and protein moieties of a 110,000 dalton glycoproteins isolated from plasma membranes of rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:1828-1831.

30

Krunkosky TM, Fischer BM, Martin LD, Jones N, Akley NJ and Adler KB. 2000. Effects of TNF on expression of ICAM-1 in human airway epithelial cells in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22:685-692.

Lazarowitz SG, Goldberg AR and Choppin P W. 1973. Proteolytic cleavage by plasmin of the HA polypeptide of influenza virus: host cell activation of serum plasminogen. *Virology* 56:172-180.

40

Lee, MK and Lander, AD. 1991. Analysis of affinity and structural selectivity in the binding of proteins to glycosaminoglycans: development of a sensitive electrophoretic approach. *Proc Natl Acad Sci USA* 88

50

: 2 7 6 8 2 7 7 2 .

Meltzer, MI, Cox, NJ and Fukuda, K. 1999. The economic impact of pandemic influenza in the United States: priorities for intervention. *Emerg Infect Dis* 5:659-671.

Meyer, FA, King, M and Gelman, RA., 1975. On the role of sialic acid in the rheological properties of mucus. *Biochimica et Biophysica Acta* 392:223-232.

10

Milner, CM, Smith, SV, Carrillo MB, Taylor, GL, Hollinshead, M and Campbell, RD. 1997. Identification of a sialidase encoded in the human major histocompatibility complex. *J Bio Chem* 272:4549-4558. Monti, E, Preti, A, Venerando, B and Borsani, G. 2002. Recent development in mammalian sialidase molecular biology. *Neurochem Res* 27:646-663.

20

Monti, E, Preti, A, Nesti, C, Ballabio, A and Borsani G. 1999. Expression of a novel human sialidase encoded by the NEU2 gene. *Glycobiol* 9:1313-1321.

Monti, E, Bassi, MT, Papini, N, Riboni, M, Manzoni, M, Venerando, B, Croci, G, Preti, A, Ballabio, A, Tettamanti, G and Borsani, G. 2000. Identification and expression of NEU3, a novel human sialidase associated to the plasma membrane. *Biochem J* 349:343-351.

30

Murakami M, Towatari T, Ohuchi M, Shiota M, Akao M, Okumura Y, Parry MA and Kido H. 2001. Mini plasmin found in the epithelial cells of bronchioles triggers infection by broad spectrum influenza A viruses and Sendai virus. *Eur J Biochem* 268:2847-2855.

40

Nakayama, K. 1997. Furin: a mammalian subtilisin/kex2p like endoprotease involved in process of a wide variety of precursor proteins. *Biochem* 327:625-635.

Ovcharenko AV and Zhirnov OP. 1994. Aprotinin aerosol treatment of influenza and paramyxovirus bronchopneumonia of mice. *Antiviral Res* 23:107-118.

50

Pshezhetsky, A, Richard, C, Michaud, L, Igdou
ra, S, Wang, S, Elsliger, M, Qu, J, Leclerc, D, Gr
avel, R, Dallaire, L and Potier, M. 1997. Clon
ing, expression and chromosomal mapping o
f human lysosomal sialidase and character
ization of mutations in sialidosis. *Nature*
Genet 15:316-320.

Ramphal, R. and Pyle, M. 1983. Evidence for
mucins and sialic acid as receptors for
Pseudomonas aeruginosa in the lower resp
iratory tract. *Infect Immun* 41:339-44. Rog
gentin, P, Kleineidam, RG and Schauer, R. 199
5. Diversity in the properties of two sia
lidase isoenzymes produced by *Clostridium*
perfringens spp. *Biol Chem Hoppe Seyle*
r 376:569-575.

10

Roggentin, P, Schauer, R, Hoyer, LL and Vimr
, ER. 1993. The sialidase superfamily and i
ts spread by horizontal gene transfer. *Mo*
l Microb 9:915-921.

20

Rosenberg A. ed. *Biology of the Sialic Ac*
ids. 1995. pp270-273.

Sakurada, K, Ohta, T and Hasegawa, M. 1992. C
loning, expression and characterization o
f the *Micromonospora viridifaciens* neura
minidase gene in *Streptomyces lividans*. *J*
Bacterid 174:6896-6903.

30

Schauer, S. ed., pp233. *Sialic Acids Chemis*
try, Metabolism and Function. Springer Ver
lag, 1982.

Schauer, R. 1982. Chemistry, metabolism, and
biological functions of sialic acids. *Adv*
. Carbohydrate Chem & Biochem 40:131-235

40

Scheiblaue H, Reinacher M, Tashiro M and
Rott R. 1992. Interactions between bacter
ia and influenza A virus in the developm
ent of influenza pneumonia. *J Infec Dis* 1
66:783-791.

Sinn PL, Williams G, Vongpunsawad S, Catta
neo R and McCray PB. 2002. Measles virus p

50

referentially transduces the basolateral surface of well differentiated human airway epithelia. *J Virol* 76:2403-2409.

Skehel, JJ and Wiley, DC. 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* 69:531-569. Tashiro M, Klenk HD and Rott R. 1987. Inhibitory effect of a protease inhibitor, leupeptin, on the development of influenza pneumonia, mediated by concomitant bacteria. *J Gen Virol* 68:2039-2043.

10

Tashiro M, Ciborowski P, Reinacher M, Pulverer G, Klenk HD and Rott R. 1987. Synergistic role of staphylococcal proteases in the induction of influenza virus pathogenicity. *Virology* 157:421-430.

20

Teufel, M, Roggentin, P. and Schauer, R. 1989. Properties of sialidase isolated from *Actinomyces viscosus* DSM43798. *Biol Chem Hoppe Seyler* 370:435-443.

Tobita, K, Sugiura, A, Enomoto, C and Furuyama, M. 1975. Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. *Med Microbiol Immunol* 162:9-14.

30

Venturi M, Seifert C and Hunte C. 2001. High level production of functional antibody Fab fragments in an oxidizing bacterial cytoplasm. *J Mol Biol* 315:1-8.

Vimr, DR. 1994. Microbial sialidases: does bigger always mean better? *Trends Microbiol* 2:271-277.

40

Vlasak, R., Luytjes, W., Spaan, W. and Palese, P. 1988. Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid containing receptors similar to those of influenza C viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4526-4529.

Wada, T, Yoshikawa, Y, Tokuyama, S, Kuwabara, M, Akita, H and Miyagi, T. 1999. Cloning, expression, and chromosomal mapping of a huma

50

n ganglioside sialidase. Biochem Biophys Res Commun 261:21-27. Wang, FZ, Akula, SM, Prasad, NP, Zeng, L and Chandran, B. 2001. Human herpesvirus 8 envelope glycoproteins K8.1A interaction with the target cells involves heparan sulfate. J Virol 75:7517-27

Wassilewa, L. 1977. Cell receptor for paramyxoviruses. Arch Virol 54:299-305.

10

Weisgraber, KH, Rail, SC, Mahley, RW, Milne, RW and Marcel, Y. 1986. Human apolipoprotein E, determination

Witt, DP and Lander AD. 1994. Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations. Curr Bio 4:394-400.

Wood, J. 2001. Developing vaccines against pandemic influenza. Phil Trans R Soc Lond B 356:1953-1960.

20

Xiang Y and Moss B. 2003. Molluscum contagiosum virus interleukin 18 (IL 18) binding protein is secreted as a full length form that bind cell surface glycosaminoglycans through the C terminal tail and a furin cleaved form with only the IL 18 binding domain. J Virol 77:2623-2630.

30

Zambon, M. 2001. The pathogenesis of influenza in humans. Rev Med Virol 11:227-241.

Zhang L, Peeples ME, Boucher RC, Collins PL and Pickles RJ. 2002. Respiratory syncytial virus infection of human airway epithelial cells is polarized, specific to ciliated cells, and without obvious cytopathology. J Virol 76:5654-5666.

40

Zhirnov OP, Ovcharenko AV and Bukrinskaya AG. 1982. Protective effect of protease inhibitors in influenza virus infected animals. Arch Virol 73:263-272. Zhirnov OP, Ovcharenko AV and Bukrinskaya AG. 1982. A modified plaque assay method for accurate analysis of infectivity of influenza viruses with uncleaved hemagglutinin. Arch Virol 71:177-183.

50

Zhirnov OP. 1983. Proteolytic activation of myxoviruses and a new strategy in the treatment of viral diseases. Problems Virol. 4:9-12. (In Russian).

Zhirnov OP, Ovcharenko AV and Bukrinskaya AG. 1984. Suppression of influenza virus replication in infected mice by protease inhibitors. J Gen Virol 65:191-196.

10

Zhirnov OP, Ovcharenko AV and Bukrinskaya AG. 1985. Myxovirus replication in chicken embryos can be suppressed by aprotinin due to the blockage of viral glycoprotein cleavage. J Gen Virol 66:1633-1638.

Zhirnov OP. 1987. High protection of animals lethally infected with influenza virus by aprotinin rimantadine combination. J Med Virol 21:161-167.

20

Zhirnov OP, Ikizler MR and Wright PF. 2002. Cleavage of influenza A virus hemagglutinin in human respiratory epithelium is cell associated and sensitive to exogenous antiproteases. J Virol 76:8682-8689.

Bartlett J.G., Breiman R.F., Mandell L.A., & File T.M., Jr. (1998) Community acquired pneumonia in adults: guidelines for management. The Infectious Diseases Society of America. Clin. Infect. Dis. 26, 811-838.

30

Andrews J., Nadjm B., Gant V., & Shetty N. (2003) Community acquired pneumonia. Curr. Opin. Pulm. Med. 9, 175-180.

File T.M. (2000) The epidemiology of respiratory tract infections. Semin. Respir. Infect. 15, 184-194. Macfarlane J. (1994) An overview of community acquired pneumonia with lessons learned from the British Thoracic Society Study. Semin. Respir. Infect. 9, 153-165.

40

Matsushima T., Miyashita N., & File T.M., Jr. (2002) Etiology and management of community acquired pneumonia in Asia. Curr. Opin. Infect. Dis. 15, 157-162.

50

Ball P. (1995) Epidemiology and treatment of chronic bronchitis and its exacerbations.

Faden H. (2001) The microbiologic and immunologic basis for recurrent otitis media in children. *Eur. J Pediatr.* 160, 407-413.

Garcia Rodriguez, JA and Martinez, MJF. Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. *J Antimicrob Chemother* 50 [Suppl S2], 59-73. 2002.

10

Soriano F. & Rodriguez Cerrato V. (2002) Pharmacodynamic and kinetic basis for the selection of pneumococcal resistance in the upper respiratory tract. *J Antimicrob Chemother* Sb Suppl S2, 51-58.

20

Mbaki N., Rikitomi N., Nagatake T., & Matsumoto K. (1987) Correlation between *Branhamella catarrhalis* adherence to oropharyngeal cells and seasonal incidence of lower respiratory tract infections. *Tohoku J Exp. Med.* 153, 111-121.

Zopf D. & Roth S. (1996) Oligosaccharide anti-infective agents. *Lancet* 347, 1017-1021.

30

Cundell D.R., Weiser J.N., Shen J., Young A., & Tuomanen E.I. (1995) Relationship between colonial morphology and adherence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 63, 757-761.

Karlsson K.A. (1998) Meaning and therapeutic potential of microbial recognition of host glycoconjugates. *Mol. Microbiol.* 29, 1-11. Andersson B., Porras O., Hanson L.A., Lagergard T., & Svanborg Eden C. (1986) Inhibition of attachment of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by human milk and receptor oligosaccharides. *J Infect. Dis.* 153, 232-237.

40

Bals R., Xiao W., Sang N., Weiner D.J., Megall R.L., & Wilson J.M. (1999) Transduction of well differentiated airway epithel

50

ium by recombinant adeno associated virus is limited by vector entry. J Virol. 73, 6085-6088.

Barthelsson R., Mobasser A., Zopf D., & Simon P. (1998) Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to respiratory epithelial cells is inhibited by sialylated oligosaccharides. Infect. Immun. 66, 1439-1444.

10

Cundell D.R. & Tuomanen E.I. (1994) Receptor specificity of adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human type II pneumocytes and vascular endothelial cells in vitro. Microb. Pathog. 17, 361-374.

Fakih M.G., Murphy T.F., Pattoli M.A., & Berenson C.S. (1997) Specific binding of *Haemophilus influenzae* to minor gangliosides of human respiratory epithelial cells. Infect. Immun. 65, 1695-1700.

20

Kawakami K., Ahmed K., Utsunomiya Y., Rikitomi N., Hori A., Oishi K., & Nagatake T. (1998) Attachment of nontypable *Haemophilus influenzae* to human pharyngeal epithelial cells mediated by a ganglioside receptor. Microbiol. Immunol. 42, 697-702.

Solzbacher D., Hanisch F.G., van Alphen L., Gilsdorf J.R., & Schrotten H. (2003) Mucin in middle ear effusions inhibits attachment of *Haemophilus influenzae* to mucosal epithelial cells. Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 260, 141-147.

30

Van Alphen L., Geelen van den Broek L., Blaas L., van Ham M., & Dankert J. (1991) Blocking of fimbria mediated adherence of *Haemophilus influenzae* by sialyl gangliosides. Infect. Immun. 59, 4473-4477.

40

Ahmed K., Matsumoto K., Rikitomi N., & Nagatake T. (1996) Attachment of *Moraxella catarrhalis* to pharyngeal epithelial cells is mediated by a glycosphingolipid receptor. FEMS Microbiol. Lett. 135, 305-309. Hazlett L.D., Moon M., & Berk R.S. (1986) In vivo identification of sialic acid as the ocular receptor for *Pseudomonas aeruginosa*.

50

s a . I n f e c t . I m m u n . 5 1 , 6 8 7 6 8 9 .

B a k e r N . , H a n s s o n G . C . , L e f f l e r H . , R i i s e
G . , & S v a n b o r g E d e n C . (1 9 9 0) G l y c o s p h i n g o l
i p i d r e c e p t o r s f o r P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s
a . I n f e c t . I m m u n . 5 8 , 2 3 6 1 2 3 6 6 .

S c h u l t z e B . , G r o s s H . J . , B r o s s m e r R . , & H e
r r l e r G . (1 9 9 1) T h e S p r o t e i n o f b o v i n e c o
r o n a v i r u s i s a h e m a g g l u t i n i n r e c o g n i z i n g
9 O a c e t y l a t e d s i a l i c a c i d a s a r e c e p t o
r d e t e r m i n a n t . J V i r o l . 6 5 , 6 2 3 2 6 2 3 7 .

10

W u p p e r m a n n F . N . , H e g e m a n n J . H . , & J a n t o s
C A . (2 0 0 1) H e p a r a n s u l f a t e l i k e g l y c o s a m i n
o g l y c a n i s a c e l l u l a r r e c e p t o r f o r C h l a m y
d i a p n e u m o n i a e . J I n f e c t . D i s . 1 8 4 , 1 8 1 1 8 7
.

B e s w i c k E J . , T r a v e l s t e a d A . , & C o o p e r M . D
. (2 0 0 3) C o m p a r a t i v e s t u d i e s o f g l y c o s a m i n
o g l y c a n i n v o l v e m e n t i n C h l a m y d i a p n e u m o n
i a e a n d C . t r a c h o m a t i s i n v a s i o n o f h o s t c
e l l s . J I n f e c t . D i s . 1 8 7 , 1 2 9 1 1 3 0 0 .

20

M a r t i n e z I . & M e l e r o J . A . (2 0 0 0) B i n d i n g o
f h u m a n r e s p i r a t o r y s y n c y t i a l v i r u s t o c
e l l s : i m p l i c a t i o n o f s u l f a t e d c e l l s u r f a c
e p r o t e o g l y c a n s . J G e n . V i r o l . 8 1 , 2 7 1 5 2 7 2 2
.

30

T h o m a s R J . & B r o o k s T J . (2 0 0 4) O l i g o s a c c h a
r i d e r e c e p t o r m i m i c s i n h i b i t L e g i o n e l l a
p n e u m o p h i l a a t t a c h m e n t t o h u m a n r e s p i r a t
o r y e p i t h e l i a l c e l l s . M i c r o b . P a t h o g . 3 6 , 8 3
9 2 .

H i r m o S . , K e l m S . , S c h a u e r R . , N i l s s o n B . ,
& W a d s t r o m T . (1 9 9 6) A d h e s i o n o f H e l i c o b a c
t e r p y l o r i s t r a i n s t o a l p h a 2 , 3 l i n k e d s
i a l i c a c i d s . G l y c o c o n j . J 1 3 , 1 0 0 5 1 0 1 1 .

40

S i m o n P . M . , G o o d e P . L . , M o b a s s e r i A . , & Z o
p f D . (1 9 9 7) I n h i b i t i o n o f H e l i c o b a c t e r p y
l o r i b i n d i n g t o g a s t r o i n t e s t i n a l e p i t h e l
i a l c e l l s b y s i a l i c a c i d c o n t a i n i n g o l i g
o s a c c h a r i d e s . I n f e c t . I m m u n . 6 5 , 7 5 0 7 5 7 .

M i l l e r P o d r a z a H . , B e r g s t r o m J . , M i l h M . A
. , & K a r l s s o n K . A . (1 9 9 7) R e c o g n i t i o n o f g l

50

glycoconjugates by *Helicobacter pylori*. Comparison of two sialic acid dependent specificities based on haemagglutination and binding to human erythrocyte glycoconjugates. *Glycoconj. J.* 14, 467-471. Crocker P. R. & Varki A. (2001) Siglecs, sialic acids and innate immunity. *Trends Immunol.* 22, 337-342.

Angata T. & Brinkman Van der Linden E. (2002) I-type lectins. *Biochim. Biophys. Acta* 1572, 294-316. 10

Lyczak J. B., Cannon C. L., & Pier G. B. (2002) Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 194-222.

Flotte T. R. & Carter B. J. (1998) Adeno-associated virus vectors for gene therapy of cystic fibrosis. *Methods Enzymol.* 292, 717-732. 20

Wagner J. A., Reynolds T., Moran M. L., Moss R. B., Wine J. J., Flotte T. R., & Gardner P. (1998) Efficient and persistent gene transfer of AAV-CFTR in maxillary sinus. *Lancet* 351, 1702-1703.

Martinez I. & Melero J. A. (2000) Binding of human respiratory syncytial virus to cells: implication of sulfated cell surface proteoglycans. *J. Gen. Virol.* 81, 2715-2722. 30

Park P. W., Pier G. B., Hinkes M. T., & Bernfield M. (2001) Exploitation of syndecan-1 shedding by *Pseudomonas aeruginosa* enhances virulence. *Nature* 411, 98-102.

Monti E., Preti A., Venerando B., & Borsani G. (2002) Recent development in mammalian sialidase molecular biology. *Neurochem. Res.* 27, 649-663. 40

(1995) *Biology of the Sialic Acids*, 270-273.

Roggentin P., Kleeneidam R. G., & Schauer R. (1995) Diversity in the properties of two sialidase isoenzymes produced by *Clostridium* 50

tridium perfringens spp. Biol. Chem. Hoppe
Seyler 376, 569 575.

Sutter V. L. (1984) Anaerobes as normal or
al flora. Rev. Infect. Dis. 6 Suppl 1, S62 S6
6.

Gaskell A., Crennell S., & Taylor G. (1995)
) The three domains of a bacterial sialid
ase: a beta propeller, an immunoglobulin m
odule and a galactose binding jelly roll
. Structure. 3, 1 197 1205. Alvarez P., Busca
glia C. A., & Campetella O. (2004) Improving
protein pharmacokinetics by genetic fus
ion to simple amino acid sequences. J. Bio
l. Chem. 279, 3375 3381.

10

Potier M., Mameli L., Belisle M., Dallaire
L., & Melancon S. B. (1979) Fluorometric as
say of neuraminidase with a sodium (4 me
thylumbelliferyl alpha D N acetylneurami
nate) substrate. Anal. Biochem. 94, 287 296.

20

Hirel P. H., Schmitter M. J., Dessen P., Fay
at G., & Blanquet S. (1989) Extent of N ter
minal methionine excision from Escherich
ia coli proteins is governed by the side
chain length of the penultimate amino a
cid. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 86, 8247 825
1.

30

Varshavsky A. (1996) The N end rule: funct
ions, mysteries, uses. Proc. Natl. Acad. Sci. U
. S. A 93, 12142 12149.

Belshe R. B., Smith M. H., Hall C. B., Betts
R., & Hay A. J. (1988) Genetic basis of resi
stance to rimantadine emerging during tr
eatment of influenza virus infection. J V
irol. 62, 1508 1512.

40

Mendel D. B., Tai C. Y., Escarpe P. A., Li W.
, Sidwell R. W., Huffman J. H., Sweet C, Jakem
an KJ., Merson J., Lacy S. A., Lew W., Willia
ms M. A., Zhang L., Chen M. S., Bischofberger
N., & Kim CU. (1998) Oral administration o
f a prodrug of the influenza virus neuro
minidase inhibitor GS 4071 protects mice
and ferrets against influenza infection
. Antimicrob Agents Chemother 42, 640 646.

50

Smith H. & Sweet C. (1988) Lessons for human influenza from pathogenicity studies with ferrets. *Rev. Infect. Dis.* 10, 56 75.

Reuman P.D., Keely S., & Schiff G.M. (1989) Assessment of signs of influenza illness in the ferret model. *J. Virol. Methods* 24, 27 34.

10

Virology Methods Manual. 1996. London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press, Harcourt Brace & Company. Karp P.H., Moninger T.O., Weber S.P., Nesselhauf T.S., Launspach J.L., Zabner J., & Welsh M.J. (2002) An in vitro model of differentiated human airway epithelia. *Methods for establishing primary cultures. Methods Mol. Biol.* 188, 1 15 137.

20

Wang G., Davidson B.L., Melchert P., Slepshkin V.A., van Es H.H., Bodner M., Jolly D.J., & McCray P.B., Jr. (1998) Influence of cell polarity on retrovirus mediated gene transfer to differentiated human airway epithelia. *J. Virol.* 72, 9818 9826.

Wang A.Y., Peng P.D., Ehrhardt A., Storm T.A., & Kay M.A. (2004) Comparison of adenoviral and adeno associated viral vectors for pancreatic gene delivery in vivo. *Hum. Gene Ther.* 15, 405 413.

30

Halbert C.L., Allen J.M., & Miller A.D. (2002) Efficient mouse airway transduction following recombination between AAV vectors carrying parts of a larger gene. *Nat. Biotechnol.* 20, 697 701.

Flotte T.R., Afione S.A., Conrad C, McGrath S.A., Solow R., Oka H., Zeitlin P.L., Guggino W.B., & Carter B.J. (1993) Stable in vivo expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno associated virus vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 10613 10617.

40

Halbert C.L., Standaert T.A., Wilson C.B., & Miller A.D. (1998) Successful readministration of adeno associated virus vector

50

s to the mouse lung requires transient immunosuppression during the initial exposure. *J Virol.* 72, 9795-9805.

Cocchiara R., Bongiovanni A., Albeggiani G., Azzolina A., Lampiasi N., Di Blasi F., & Geraci D. (1997) Inhibitory effect of neuraminidase on SP induced histamine release and TNF alpha mRNA in rat mast cells: evidence of a receptor independent mechanism. *J Neuroimmunol.* 75, 9-18.

10

Stenton G.R., Nohara O., Dery R.E., Vliagoftis H., Gilchrist M., John A., Wallace J.L., Hollenberg M.D., Moqbel R., & Befus A.D. (2002) Proteinase activated receptor (PAR) 1 and 2 agonists induce mediator release from mast cells by pathways distinct from PAR 1 and PAR 2. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 302, 466-474. Jarreau P.H., Harf A., Levaime M., Lambre C.R., Lorino H., & Macquin-Mavier I. (1992) Effects of neuraminidase on airway reactivity in the guinea pig. *Am. Rev. Respir. Dis.* 145, 906-910.

20

Kai H., Makise K., Matsumoto S., Ishii T., Takahama K., Isohama Y., & Miyata T. (1992) The influence of neuraminidase treatment on tracheal smooth muscle contraction. *Eur J. Pharmacol.* 220, 181-185.

30

【0249】

本出願、参考文献、及び添付物で言及された全ての刊行物（特許書類が含まれる）、Genbank配列データベースエントリー（ヌクレオチド配列及びアミノ酸配列並びに添付の情報が含まれる）、及び科学論文は、各刊行物が個別に参考として援用されるのと同じ範囲でその全体が参考として援用される。

【0250】

全ての見出しは、読み手に便宜を図ったものであり、特記しない限り、見出しに続く文章の意味を制限するために使用すべきではない。

【図面の簡単な説明】

【0251】

40

【図1】アプロチニンのアミノ酸の一次構造の略図である。

【図2】以下の4つのヒト遺伝子のGAG結合配列を示す図である：PF4（ヒト血小板因子4）；IL8（ヒトインターロイキン8）；AT-III（ヒトアンチトロンビンIII）；ApoE（ヒトアポリポプロテインE）；AAMP（ヒト血管関連遊走細胞タンパク質）；ヒトアンフィレグリン（human amphiregulin）。

【図3】ヒトシアリダーゼNEU2とNEU4との比較を示す図である。

【図4】細菌及び真菌のシアリダーゼの基質特異性を比較した表である。

【図5】His6-AvCDをコードするコンストラクト番号1のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す図である。pTrc99aへのクローニングのために使用したNcoI部位及びHindIII部位を太字で示す。

50

【図6】Ar - AvCDをコードするコンストラクト番号2のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す図である。pTrc99aへのクローニングのために使用したNcoI部位及びHindIII部位を太字で示す。

【図7】Ar - G₄S - AvCDをコードするコンストラクト番号3のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す図である。pTrc99aへのクローニングのために使用したNcoI部位及びHindIII部位を太字で示す。

【図8】Ar - タグがMDCK細胞からのアルファ(2, 6)結合シアル酸の除去を増強することを示す実験由来のデータのグラフを示す。Y軸は、組換えAvCD(コンストラクト番号1)(菱形)又は組換えAR - AvCD(コンストラクト番号2)(四角)の種々の希釈物を使用した処置後のMDCK細胞表面に残存するアルファ(2, 6)結合シアル酸の比率を示す。

10

【図9】コンストラクト番号2又はA.ウレアファシエンス(A. ureafaciens)の単離シアリダーゼから作製した組換えAR - AvCDタンパク質でのMDCK細胞の処置によって得られたインフルエンザウイルスに対する防御を示すグラフである。攻撃ウイルス株は以下である：A/WS/33(H1N1)；A/PR/8(H1N1)；A/Japan/305/57(H2N2)；A/Victoria/504/2000(H3N2)；A/HongKong/8/68(H3N2)；B/Lee/40；7.B/Maryland/1/59；及びTurkey/Wis/66(H9N2)。

【図10】組換えAR - AvCDシアリダーゼ及び組換えAR - G₄S - AvCDシアリダーゼによるインフルエンザウイルス増幅の阻害レベルを示すグラフである。攻撃ウイルス株は以下である：A/PR/8(H1N1)；A/WS/33(H1N1)；A/Japan/305/57(H2N2)；A/HongKong/8/68(H3N2)；B/Lee/40；7.B/Maryland/1/59；及びTurkey/Wis/66(H9N2)。

20

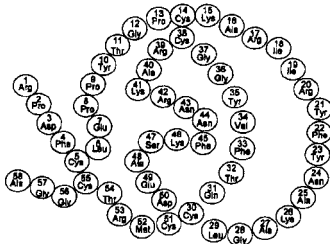
【図11】組換えAR - AvCDシアリダーゼ融合タンパク質の局所投与によってインフルエンザA(H1N1)ウイルスに感染したフェレットの炎症反応が軽減することを示すグラフである。(A)感染後に表示の時間で感染動物から得た鼻洗浄サンプル由来の炎小細胞の総数。(B)感染フェレットの無細胞鼻洗浄サンプルのタンパク質濃度を決定した。感染フェレットを、賦形剤で処置するか(四角)、コンストラクト番号2から作製した組換えAR - AvCDシアリダーゼ融合タンパク質で処置した(三角)。非感染動物も組換えAR - AvCDシアリダーゼ融合タンパク質で処置した(菱形)。実質的に有意な値を、* (p < 0.05) 及び** (p < 0.01) で標識する。

30

【図12】2つの本発明のシアリダーゼ触媒ドメイン融合タンパク質のウイルス複製の阻害、細胞防御EC50、及び選択指標(selective index)を示す表である。

【図13】本発明のシアリダーゼ触媒ドメイン融合タンパク質で処置したフェレット及びコントロール賦形剤で処置したフェレットの気道におけるウイルス複製を示す表である。

【 図 1 】



【圖 2】

PF4 (SEQ ID NO:2) : ⁴⁷NGRRICLDLQAPLYKKIIKKLLES⁷⁰
IL-8 (SEQ ID NO:3) : ⁴⁶GRELCLDPKNWVQRVVEFLKRAENS⁷²
ATIII (SEQ ID NO:4) : ¹¹⁸QHIFHFAKLNCRLRYKANKSSKLVSANRLFGDKS¹⁵¹
ApoE (SEQ ID NO:5) : ¹³²ELRVRLASHLRKLRLRLRDADDLQKRLAVYQAG¹⁶⁵
AAMP (SEQ ID NO:6) : ¹⁷RRLRRMESESES²⁵
Amphiregulin (SEQ ID NO:7) : ¹²⁵KRKKGKGGKNGKNRRNRKKKN¹⁴⁵

【圖 4】

[illegible]

各値は、II3Neu5AcLacに対する活性を100とした場合の相対シリアリダーゼ活性を示す。

【 図 3 】

```

NEU2 (SEQ ID NO:8) : 1 MASLPLVLQKE SVFQSGAKA- -YRIPLLALY PQGQSLLPFA EQRAKKKDEH
      A + +VLRG      YR+P+LL + P +LLAF EQR S D H
NEU4 (SEQ ID NO:9) : 1 MGVPRTTPQRT VLFERNETGL TVNVPVSLPV PPGPTLLIAF EQRLSPDSUH

NEU2: 49  ABLIVLRGDD YDAPTHQVQW QAQEVVAQAR LOGHRSMNCP PLDYAQGTGL FLFFIIAPGQ
      A + +VLRG      I R P + + F S DHO RTW G V + EGO+A
NEU4: 51  AHRVLYLRGT LAGGSV--RW GALHVLGTAA LAEHRSMNCP PVDHGTGTV FLFFIIVLGH

NEU2: 110 VTEQQLQQLTR ANVRTLKQST SDONGRWSS PRLDTAIG PAYREWSTFA VGPBGHCLQD
      E Q+T R N RLC V R G+H+S KEDLT+ AIG A +HMTTFA VGRH+ Q+L
NEU4: 109 TPDVQVIATG RNARAKLCVA SDAGLSWGS ARDLTETEAR GAQVQDNTFA VGGHGVQLP

NEU2: 170 DRARSLVPPA YAYRWLHP- - ---IQRPIS AFCLSLHDHG RTWARGHFA QD-TLECOVA
      R L+VLPFA I R P + + F S DHO RTW G V + EGO+A
NEU4: 169 S-GR-LIIPA YTVVRDLRE FGKICETAF STAFYSIOGS KTRVCGGLVP NLRSGEQFLA

NEU2: 224 EVETGEQRVV TL-NARSHAR ARWQAGSTDD GLDFQSGSLV RNLVSGPFG QCGGSVSCPL
      V S + + NRS L +RYVA ST+ + G F + + V I E G CQGS+ FF
NEU4: 227 AVDGGQAGCSF LYCNARSELG SRVQALSTDE GTSLPFAVY ASLPETAW-G CQGSVGFFA

NEU2: 283 P-----
NEU4: 286 PAFNRPKDDG WSVGPSRPLQ PFLGLGQVNE PEEEAADPDA GGQVGGGPF S RLQRCGDF

NEU2: 284 ----- --RSQGPSP QMLVLYTPTH SQRADQLAL LNPRPAPFA
      WLLY+HP R +G L+ P +P
NEU4: 346 RQPGPRGVS G DVGSLWALP MPFAAPPSP TMLVLYSRVP NRARLRMGIR LQSPSPLOS

NEU2: 321 WSEPVLLAKG SCAYSDLSQM GTPGGSPPLF GCLYEPANDY- --EEIFVFM TLQKAFRAY
      W+EP + + + YSDL S G P+G +F +CLYE +L+
NEU4: 406 WTEPMVIYEG PRGYSGLASI GRAPEGGLVF ACILYESGART SYDEISFCTI SLRVELNVV

NEU2: 378 LPQ

NEU4: 466 ASPKPPNLGD KPRGCKPFS

```

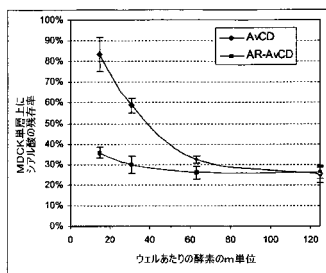
【 図 6 】

[illegible]

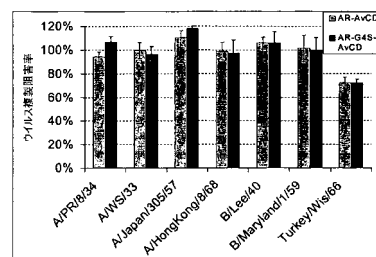
【圖 7】

caatgcttaagcgcaaaacaaagccggcgaaaaagcttaaaactctgctaaccgttaagaa
M V K R K A A K K G G W N G K N D P A A A A A A A A A A A A A A A A
aaaaactctggtgtgtgtgtgtgtgtgagatctctacacagctacacacagacctctaccca
K N P G
gatgcctacacagctgactccgcagcaagcatctctcaggtctcacgactcttcgcagcaaaatcgc
D A S T E L P A S M S Q A Q H L A A N T
gctcagtataattctcgactctcagcagcttacaacagctccgaattggtatctcagctatt
A D V Y R F A T T T A K N D P A A A A A A A A A A A A A A A A
agctatgtagagccgcgcgcagcaatcggaataagttgtgtctccagtcgactctccagat
S Y D E R P K D N G N G G S D A P N P N P
catattgtctcagctctcgcctacacagatggcggctaaaacttgagcgacccaacctatatt
H I V Q R R S T D G G K T W S A P T Y I
ctacagagctacgcagactccgcgaagaagctggatcttcgcgaacctcttatgtgtgtggat
I A G
catcaaaacggttaacatctctcaattctcagttgaataactgagctctctctggggaggt
H Q T T F I F N F H V K S Y D Q G G G
agccgtggggggaacagcccgccgaaaaacccgcgggatattctcgcagagaggtgtctacgcgc
S R G G G T D P E N A G E I I Q A E V S T S
acgataatggtctgagcgtggacacatccacacacccgcggatattacgaaacataaaa
T A
ctgtcgacagcagctctgttgggggtgagccgcgcgaactccgcagctatggggccgat
P W T A R F A A A S C G Q I Q I Q H F H
ggccgcgcctgtgtgcacagctataccattcgatcagccgcgtggagcggctgcagcgtgtga
A G R L V Q Q Y T I R T A G G A V Q A V
tcggttatctccagatcatggaagaaacgtgcaggcgtgcaccccgatctgggacgggt
S T G A S D D H G K K T T W Q A G T P I G T G
tvtggaacaaacagttgcagactctgcagctgcgtctgagctgctgagcgtgcgtgcg
M D P N N X V F L S D M W F A A
tcggagacagcagcggctcttgtaagttgcgcatacagctcattggttgggacagcctggtcc
S D G S G F R K V A R S T D G G C T W S
gaaacctgttcggaacaaactctgcggatctcgtgtgatataatccgagataattctgcgcg
E P V S D D K N L P D S V D N A Q I I R A
ttcttccatctgcgtcccccagctgcgcgcggcggaagaactctctcttgagctattccccca
F A
aatcatcagctctcgtgtgtccggagatcgtgtgacatagctatgtaagtctatgcagcgggc
N P R P W S R D R G T I S M S C D D G A
ctatgcagcaactccaagaattttttccacagcgttttggggtacacagactcttcagtt
S W T T S K V F H E F E V G Y T T I A V
cagagtatgagaagcatctgcgtctgcggagagcgacaaatggtgcgtcttatgtgt
G A
ggcatctggtctcgttaattatcagatagactcgtgtggagacacatggtgcgaacaaaacc
G I W Y R N F T M N W L G E G G Q K P
gogggaatagactt
A E - A

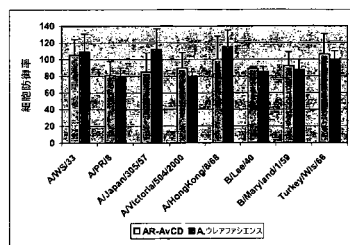
【圖 8】



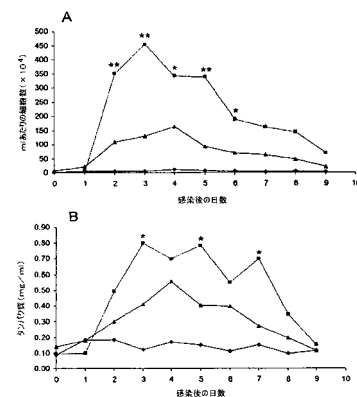
【 図 1 0 】



【图 9】



【圖 1 1】



【図 1 2】

ウイルス	AR-AvCD			AR-G ₄ S-AvCD		
	ウイルス複製の 阻害 (EC50)	選択指標	細胞毒性の 阻害 (EC50)	ウイルス複製の 阻害 (EC50)	選択指標	細胞毒性の 阻害 (EC50)
APR/8/34 (H1N1)	12.3 ± 7.4	>8183	50.3 ± 13.1	>1890	13.5 ± 1.4	>7407
AW/S/33 (H1N1)	5.5 ± 3.9	>15444	17.7 ± 13.9	>5696	12.2 ± 11.0	>8197
ANWS/33 (H1N1)	2.5	>20000	10.6 ± 12.4	>9302	2.5	>40000
A/Japan/325/57 (H2N2)	5.1 ± 3.4	>18512	11.3 ± 0.4	>8889	3.8 ± 1.8	>26987
A/Victoria/504/2003 (H3N2)	2.5 ± 0.0	>40000	18.3 ± 1.0	>5457	2.5 ± 0.2	>38095
A/HongKong/8/68 (H3N2)	2.5 ± 0.0	>40000	31.5 ± 38.2	>3175	2.5 ± 0.0	>40000
B/Lee/40	4.1 ± 1.3	>24540	11.4 ± 3.7	>8791	3.5 ± 1.3	>28986
B/Maryland/1/59	4.3 ± 2.5	>23392	2.5 ± 0.0	>40000	5.5 ± 4.2	>18265
Turkey/Wis/66 (H9N2)	3.9 ± 0.5	>29478	16.6 ± 16.2	>6033	7.1 ± 0.9	>14035
Equine/Prague/2/62 (H7N7)	n/a	n/a	15.8 ± 5.3	>6349	n/a	25.5 ± 5.7

【図 1 3】

番号	フレットタグ 番号	感染後日数におけるウイルス力価 log ₁₀ TCID ₅₀ /ml ^a					攻撃後のH1 力価
		1	2	3	4	5	
鼠形肺炎菌群							
1	728	5.7	4.2	4.2	1.7	-	640
2	784	3.9	4.9	1.9	1.9	-	640
3	793	4.4	4.2	2.4	3.9	-	640
4	794	4.9	5.9	1.4	-	-	160
5	789	4.4	4.2	3.4	3.4	-	640
6	799	3.7	4.4	3.4	-	-	320
7	811	4.4	4.4	-	-	-	1280
8	841	4.2	4.7	2.7	1.9	-	320
平均 ^b		4.4	4.7	2.7	3.7	-	
SD ^c		0.4	0.7	1.0	0.4	-	
検定/合計		6/8	6/8	7/8	5/8	0/8	
フルゲージ肺炎菌群							
1	780	-	-	-	NA	NA	NA
2	791	2.2	5.2	4.9	4.2	1.7	640
3	804	-	4.7	3.7	1.7	-	1280
4	803	-	-	-	-	-	510
5	806	-	-	-	-	-	510
6	806	-	-	-	-	-	510
7	810	2.2	4.7	3.2	2.9	-	160
8	812	-	-	4.4	-	-	640
9	813	-	3.2	4.4	4.7	-	160
10	819	2.7	5.2	-	-	-	320
11	828	-	4.9	1.9	1.7	-	320
12	843	-	4.4	4.9	4.9	3.4	320
平均 ^b		2.4	4.6	3.9	3.4	2.6	
SD ^c		0.3	0.7	1.1	1.5	1.2	
検定/合計		3/12	7/12	7/12	6/11	2/11	

^a - 攻撃から5日後に回収した全洗浄物は、ウイルスの存在について陰性であった。
ウイルスを抽出したフレットの平均値を計算した。非感染懸置フレットから回収した洗浄物は、ウイルスについて陰性であった(示さず)。
NA - 適用せず、フレットは感染4日後に事故によって死亡した。

【配列表】

0004764881000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 35/76	(2006.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 9/06	(2006.01)	A 6 1 K 9/06	
A 6 1 K 9/10	(2006.01)	A 6 1 K 9/10	
A 6 1 K 9/08	(2006.01)	A 6 1 K 9/08	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 31/16	(2006.01)	A 6 1 P 31/16	
A 6 1 P 27/16	(2006.01)	A 6 1 P 27/16	

- (72)発明者 ファン, ファン
 アメリカ合衆国 カルフォルニア州 9 2 1 3 0, サンディエゴ, コルテブレノベラーノ 1 1 1
 2 4
- (72)発明者 マラーホフ, マイケル
 アメリカ合衆国 カルフォルニア州 9 2 1 3 0, サンディエゴ, カミノラバー 1 1 5 3 0

審査官 長谷川 茜

- (56)参考文献 国際公開第2 0 0 4 / 0 4 7 7 3 5 (WO, A 1)
 特開昭6 4 - 0 2 0 0 9 4 (JP, A)
 Infection and Immunity, 1 9 9 3年, Vol.61, No.1, p.109-116
 Protein Expression and Purification, 1 9 9 6年, Vol.7, p.415-422
 Virus Research, 2 0 0 1年, Vol.79, p.177-185
 Journal of Virology, 1 9 9 9年, Vol.73, No.7, p.6085-6088
 Biochem. J., 1 9 9 0年, Vol.269, p.261-264
 J. Mol. Biol., 1 9 9 6年, Vol.255, p.349-355

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
 C12N 15/00-15/90
 C07K 14/00-16/46
 UniProt/GeneSeq
 PubMed
 CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)