

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-509943

(P2015-509943A)

(43) 公表日 平成27年4月2日(2015. 4. 2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 6
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-558089 (P2014-558089)	(71) 出願人	591100596
(86) (22) 出願日	平成25年2月20日 (2013. 2. 20)		アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ
(85) 翻訳文提出日	平成26年10月20日 (2014. 10. 20)		サンテ エ ドゥ ラ ルシエルシュ メ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/053388		ディカル
(87) 国際公開番号	W02013/124324		フランス国、エフー75013 パリ、リ
(87) 国際公開日	平成25年8月29日 (2013. 8. 29)		ュ・ドゥ・トルビアック 101
(31) 優先権主張番号	12305192.2	(71) 出願人	595040744
(32) 優先日	平成24年2月21日 (2012. 2. 21)		サントル・ナショナル・ドゥ・ラ・ルシエ
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		ルシュ・シャンティフィク
(31) 優先権主張番号	12306283.8		CENTRE NATIONAL DE
(32) 優先日	平成24年10月17日 (2012. 10. 17)		LA RECHERCHE SCIENT
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		IFIQUE
			フランス国、75016 パリ、リュ・ミ
			シェル・アンジュ 3
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウイルス侵入補助因子としてのTAMレセプター

(57) 【要約】

本発明は、ウイルス侵入補助因子、特にホスファチジルセリン保有ウイルス感染、例えばフラビウイルス感染を予防または治療するためのホスファチジルセリンとTAMレセプターとの間の相互作用の阻害剤の使用に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ウイルス感染を予防または治療するための使用のための、ホスファチジルセリンと T A M レセプターとの間の相互作用の阻害剤であって、該阻害剤が、

- (i) T A M レセプター阻害剤、
- (i i) G a s 6 阻害剤、および / または
- (i i i) ホスファチジルセリン結合タンパク質

である阻害剤。

【請求項 2】

前記 T A M レセプターが、 T Y R O 3、 A X L または M E R である、請求項 1 (i) 記載の使用のための阻害剤。 10

【請求項 3】

前記 T A M レセプター阻害剤が、抗 T A M レセプター抗体、アンチセンス核酸、模倣体または変異型 T A M レセプターである、請求項 1 (i) または 2 記載の使用のための阻害剤。

【請求項 4】

前記 G a s 6 阻害剤が、抗 G a s 6 抗体、アンチセンス核酸、模倣体または変異型 G a s 6 タンパク質である、請求項 1 (i i) または 2 記載の使用のための阻害剤。

【請求項 5】

前記ホスファチジルセリン結合タンパク質が、抗ホスファチジルセリン抗体またはアネキシン 5 である、請求項 1 (i i i) 記載の使用のための阻害剤。 20

【請求項 6】

前記 T A M レセプター阻害剤が、配列番号 1、2、3、または 4 の配列の s i R N A である、請求項 3 記載の使用のための阻害剤。

【請求項 7】

前記 G a s 6 阻害剤が、配列番号 19 の配列の変異型 G a s 6 タンパク質 G a s 6 G l a である、請求項 4 記載の使用のための阻害剤。

【請求項 8】

前記ウイルスが、ホスファチジルセリン保有ウイルスである、請求項 1 記載の使用のための阻害剤。 30

【請求項 9】

前記ホスファチジルセリン保有ウイルスが、アルファウイルスまたはフラビウイルスである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記載の使用のための阻害剤。

【請求項 10】

前記アルファウイルスが、チクングニヤウイルスである、請求項 9 記載の使用のための阻害剤。

【請求項 11】

前記フラビウイルスが、ウエストナイルウイルス、黄熱ウイルスまたはデング熱ウイルスである、請求項 9 記載の使用のための阻害剤。

【請求項 12】

前記阻害剤が、少なくとも 1 種の他の抗ウイルス化合物と組み合わせて経時または同時のいずれかでの投与用である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記載の使用のための阻害剤。 40

【請求項 13】

前記他の抗ウイルス化合物が、ホスファチジルセリンと T I M レセプターとの相互作用の阻害剤である、請求項 9 記載の使用のための阻害剤。

【請求項 14】

前記阻害剤が、薬学的に許容されうる組成物に製剤化される、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項記載の使用のための阻害剤。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記載の阻害剤および追加的に少なくとも 1 種の他の抗ウイ 50

ルス化合物を含む薬学的組成物。

【請求項 16】

前記少なくとも 1 種の抗ウイルス化合物が、ホスファチジルセリンと T I M レセプターとの相互作用の阻害剤である、請求項 12 記載の薬学的組成物。

【請求項 17】

細胞へのホスファチジルセリン保有ウイルス、特にフラビウイルスの侵入を阻害する *in vitro* 方法における、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記載の阻害剤の使用。

【請求項 18】

ウイルス感染、特に P t d S e r 保有ウイルス感染、例えばフラビウイルス感染を予防または治療するための方法であって、それを必要とする個体に、ホスファチジルセリンと T A M レセプターとの間の相互作用の阻害剤の治療有効量を投与することを含む方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、ウイルス感染を予防または治療するための、ホスファチジルセリンと T A M レセプターとの間の相互作用の阻害剤の使用に関する。

【0002】

発明の背景

ウイルス感染は、公衆衛生にとっての大きな脅威である。ウイルスによって引き起こされる生死に関わる疾患（例えば出血熱および脳炎）の出現および拡大は、まだ対処されていない従来の予防アプローチ（例えばワクチン）と共に、これらの致命的な病原体をターゲットにする新しい戦略を探究する必要性を浮き彫りにしている。

20

【0003】

例えばフラビウイルス属は、単一のプラス鎖 R N A ゲノムを収容している 70 種を超える小型エンベロープウイルスを包含している。デングウイルス（D V）、黄熱ウイルス（Y F V）、およびウエストナイルウイルス（W N V）などのこの属のいくつかのメンバーは、出血熱および脳炎を含めた多様な医学的に関連するヒト疾患を引き起こす蚊媒介ヒト病原体である（Gould and Solomon, 2008, Lancet, 371:200-509; Gubler et al., 2007, Fields Virology, 5th Edition, 1153-1252）。抗原的に関係する 4 つの血清型（D V 1 ~ D V 4）によって引き起こされるデング病は、この数十年間の世界的な健康問題として出現し、最も医学的に関連するアルボウイルス疾患の一つである。年間 5000 万 ~ 1 億のデング症例が発生し、25 億人を超える人々が感染のリスクに曝されていると推定されている。4 つの血清型のどれによる感染も、軽い発熱から生死に関わるデング出血熱（D H F）およびデングショック症候群（D S S）にわたる疾患を引き起こす。ヒト病原体としての D V の重要性および増え続ける発生率にかかわらず、現在のところ D V に対して利用できる認可されたワクチンはなく、抗ウイルス薬の欠如が治療法の選択肢をひどく制限している。

30

【0004】

デング病と闘うための今後の取り組みは、D V の生活環をよりよく理解することが必要とする。標的細胞内への D V の侵入は、宿主の範囲、細胞親和性およびウイルスの病原性の主な決定因子であるので、予防的抗ウイルス戦略と同様に治療的抗ウイルス戦略のための有望な標的である。D V は、一次感染時に、ウイルス糖タンパク質（E タンパク質）と細胞レセプターとの間の相互作用によって駆動される過程であるクラスリン媒介性エンドサイトーシスによって宿主細胞に侵入する。エンドソーム内で酸性環境が E タンパク質の不可逆的三量体化をトリガーし、それがウイルス膜と細胞膜との融合を招き、サイトゾル内にウイルスキャプシドおよびゲノム R N A を放出させる。現在までにウイルス侵入に至る D V - 宿主相互作用の分子的基盤はあまり理解されておらず、D V 細胞レセプター（一つまたは複数）の独自性に関してほとんど分かっていない。D V は広範囲の細胞型に感染することが分かっている。したがって、D V は標的細胞に応じて異なるレセプターを活用

40

50

するか、または広く発現されている侵入分子を利用する可能性がある。初期の研究から、D V ビリオンが細胞膜上のヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合することによって宿主と最初の接触を行うことが示された。これらの分子は、E タンパク質表面の正荷電した残基を認識する。そして、これらの分子は、標的細胞の表面にウイルスを集め、その後ウイルスが侵入因子と相互作用すると考えられている。熱ショックタンパク質 70 (HSP70)、HSP90、GRP78/Bip、リボ多糖レセプターCD14または37/67kDa高親和性ラミニンなどの数多くの細胞タンパク質が推定上のD V 侵入レセプターとして提唱されている。しかし、ウイルス侵入に果たすそれらの機能はあまり特徴づけられていないままであり、生理学的関連性が不明である。現在までに唯一はっきりと特徴づけられた、D V 侵入プログラムに能動的に関与する因子は、樹状細胞上に発現されるDC-SIGN、肝臓類洞内皮細胞上に発現されるL-SIGNおよびマクロファージ上に発現されるマンノースレセプター(MR)である。これらの分子はC型レクチンレセプターファミリーに属し、D V のE タンパク質上に発現した富マンノースN結合型グリカンと結合する。しかし、D V がDC-SIGN、MRまたはL-SIGNを発現しない細胞型に感染することは、他の関連侵入レセプター(一つまたは複数)が存在し、依然として特定されていないことを示している。

10

【0005】

細胞表面レセプターとE タンパク質の相互作用によって媒介される古典的細胞侵入経路に加えて、体液および組織中に存在する可溶性成分がD V 粒子と相互作用してウイルスの内部移行を増強するというのが妥当であるように思われる。この仮説を裏付けるものとして、最近の研究から、蚊細胞へのWNVの取り込みが分泌型のC型レクチンmosCTL-1によって媒介されることが示された。この可溶性因子は高い親和性でWNV粒子と結合し、推定によると、WNV粒子をその細胞レセプターmosPTP-1に架橋することでウイルスの侵入を促進する。別の例は、ヒトアデノウイルス(HAdV) V5によって代表され、そのウイルスはヒト血液凝固因子X(FX)と相互作用する結果として、HAdV5ベクター粒子の大規模な肝臓取り込みを担う主要なパラメーターであるFX-HAdV5複合体の形成を招く。上述の情報に基づくと、D V 侵入過程はおそらく以前に考えられていたよりも複雑である可能性がある。D V の付着および内部移行が、いくつかのレセプターと、可能性があることにはD V の細胞結合およびウイルス親和性に有利に働きうる体液中に循環する可溶性成分とを要する多段階過程であると仮定することが合理的である。

20

30

【0006】

現在、D V は世界的な問題になり、110ヶ国よりも多い国で地方病である。したがって、D V 感染の予防的処置または治療的処置の開発が必要とされる。

【0007】

そのうえ、D V の内部移行機構を明らかにすることも、他のウイルス感染の処置を開発する道を開く可能性がある。

【0008】

発明の説明

本発明者らは、D V 感染がD V ウイルスエンベロープ表面に存在するホスファチジルセリン(PtdSer)と宿主細胞表面に存在するTAMレセプターとの間の相互作用によって媒介され、および当該相互作用を遮断することによって宿主細胞内へのD V 侵入を阻害してD V 感染を予防できることを見いだした。

40

【0009】

さらに本発明者らは、ホスファチジルセリン(PtdSer)とTAMレセプターとの間のこの相互作用が、黄熱ウイルス(YFN)およびウエストナイルウイルス(WNV)などの他のフラビウイルスによってだけでなく、例えばチクングニヤウイルスによっても利用されることを見だし、これは、この相互作用が膜内にホスファチジルセリン(PtdSer)を組み入れているウイルスによって活用される一般メカニズムを表している。

50

【 0 0 1 0 】

したがって本発明は、ウイルス感染、特にフラビウイルス感染などのホスファチジルセリン (P t d S e r) 保有ウイルス感染を予防または治療するための使用のための、ホスファチジルセリンと T A M レセプターとの間の相互作用の阻害剤に関し、ここで該阻害剤は、好ましくは (i) T A M レセプター阻害剤、 (i i) G a s 6 阻害剤、および / または (i i i) ホスファチジルセリン結合タンパク質である。好ましくは、該相互作用は間接相互作用である。「ホスファチジルセリン保有ウイルス感染」は、特に「フラビウイルス感染」を意味する。「フラビウイルス感染」は、デングウイルス (D V)、ウエストナイルウイルス、ダニ媒介脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルスまたは黄熱ウイルスの感染を意味する。好ましくは、該 T A M レセプターは T Y R O 3、A X L または M E R である。好ましくは、該 T A M レセプター阻害剤は抗 T A M レセプター抗体、アンチセンス核酸、模倣体または変異型 T A M レセプターであり、より好ましくは、該 T A M レセプター阻害剤は s i R N A である。好ましくは、該 G a s 6 阻害剤は抗 G a s 6 抗体、アンチセンス核酸、模倣体または変異型 G a s 6 タンパク質である。好ましくは、該ホスファチジルセリン結合タンパク質は抗ホスファチジルセリン抗体またはアネキシン 5 である。

10

【 0 0 1 1 】

ホスファチジルセリンと T A M レセプターとの間の相互作用の阻害剤および追加的に少なくとも 1 種の他の抗ウイルス化合物を含む薬学的組成物も提供される。好ましくは、該少なくとも 1 種の他の抗ウイルス化合物は、ホスファチジルセリンと T I M レセプターとの間の相互作用の阻害剤である。

20

【 0 0 1 2 】

細胞へのウイルス、特にフラビウイルスなどの P t d S e r 保有ウイルスの侵入を阻害する方法における、ホスファチジルセリンと T A M レセプターとの間の相互作用の阻害剤の使用がさらに提供される。

【 0 0 1 3 】

ウイルス感染、特にフラビウイルス感染などの P t d S e r 保有ウイルス感染を予防または治療するための方法であって、それを必要とする個体に、ホスファチジルセリンと T A M レセプターとの間の相互作用の阻害剤の治療有効量を投与することを含む方法も提供される。

30

【 0 0 1 4 】

ウイルス感染、特に P t d S e r 保有ウイルス感染、特にフラビウイルス感染を予防または治療するための医薬を製造するための、ホスファチジルセリンと T A M レセプターとの間の相互作用の阻害剤の使用も提供される。

【 0 0 1 5 】

定義

「ホスファチジルセリン保有ウイルス感染」は、その膜に P t d S e r を発現または組み込んでいるエンベロープウイルスの感染を意味する。感染前に、ウイルス膜上の P t d S e r が宿主細胞のレセプターに曝される。P t d S e r を保有するエンベロープウイルスの例には、非限定的にフラビウイルス (デングウイルス、ウエストナイルウイルス、黄熱ウイルスなど)、アルファウイルス (例えばチクングニヤウイルス)、フィロウイルス (例えばエボラウイルス)、ポックスウイルス (Poxivirus) (例えば牛痘ウイルス) およびアレナウイルス (例えばラッサウイルス) が含まれる。

40

【 0 0 1 6 】

「ホスファチジルセリン保有ウイルス感染」には、例えば「フラビウイルス感染」が含まれる。「フラビウイルス感染」は、デングウイルス (D V)、ウエストナイルウイルス、ダニ媒介脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルスまたは黄熱ウイルスの感染を意味する (Sabin et al., 1952, A.B. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1:30-50; Hammon et al., 1960, Trans. Assoc. Am. Physicians 73:140-155; Smithburn, 1940, Am. J. Trop. Med., 20:471-492; Monath and Heinz, 1996, Flaviviruses, Fields Viro

50

logy, 3rd edition, p.961-1034; Gould and Solomon, 2008, Lancet, 371:500-509)。
デングウイルスは、任意の血清型、すなわち血清型 1、2、3 または 4 でありうる。

【0017】

「ホスファチジルセリンと T A M レセプターとの間の相互作用」は、好ましくは P t d S e r 保有ウイルスの表面に存在するホスファチジルセリンと宿主細胞の表面に存在する T A M レセプターとの間の間接相互作用を意味する。実際に、本発明者らは、ホスファチジルセリンと T A M レセプターとの間の相互作用が、例えば G a s 6 タンパク質でありうる架橋分子によって媒介されること、およびこの間接相互作用が宿主細胞への P t d S e r 保有ウイルスの感染または侵入を許すことを見いだした。

【0018】

「阻害剤」は、ホスファチジルセリンと T A M レセプターとの間の相互作用を減少または消失させることができる薬剤を意味する。該阻害剤は、また、T A M レセプターおよび / または G a s 6 などの架橋分子の発現を減少または消失させることができる場合がある。本発明によると、該阻害剤は、例えば (i) T A M レセプター阻害剤、(i i) G a s 6 もしくは他の架橋分子の阻害剤、および / または (i i i) ホスファチジルセリン結合タンパク質でありうる。

【0019】

好ましくは、該阻害剤は、ホスファチジルセリンと T A M レセプターとの間の相互作用、ならびに / または T A M レセプターおよび / もしくは架橋分子の発現を、少なくとも 10、20、30、40 %、より好ましくは少なくとも 50、60、70 %、最も好ましくは少なくとも 75、80、85、90、95、96、97、98、99、または 100 % 減少または消失させることができる。

【0020】

本明細書におけるポリペプチドおよび核酸への言及には、本明細書において開示されたアミノ酸配列および核酸配列と該配列の変異体との両方が含まれる。

【0021】

変異型タンパク質は、スプライス変異体、アレルおよびアイソフォームなどの天然変異体の場合があり、またはそれらは組み換え手段によって産生されうる。アミノ酸配列内の変異は、タンパク質のアミノ酸配列に変化を招く、タンパク質をコードする核酸配列への一つまたは複数のコドンの置換、欠失または挿入によって導入することができる。場合により、変異は、タンパク質中の 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 個またはそれよりも多いアミノ酸を任意の他のアミノ酸で置換することによる。追加的にまたは代替的に、変異は、タンパク質内に 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 個またはそれよりも多いアミノ酸を追加または欠失させることによる場合がある。

【0022】

変異型核酸配列には、中または高ストリンジェンシー条件で配列番号 1 ~ 4、6、9、10、12、16 ~ 18、21、23 ~ 25、28、31、32、33 ~ 36 の配列に特異的にハイブリダイゼーションする能力がある配列が含まれる。ストリンジェントな条件または高ストリンジェンシー条件は：(1) 洗浄に低イオン強度および高温、例えば 0 . 015 M 塩化ナトリウム / 0 . 0015 M クエン酸ナトリウム / 0 . 1 % ドデシル硫酸ナトリウムを 50 で採用する；(2) ハイブリダイゼーションの際にホルムアミドなどの変性剤、例えば 0 . 1 % ウシ血清アルブミン / 0 . 1 % フィコール / 0 . 1 % ポリビニルピロリドン / 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (p H 6 . 5) を 750 mM 塩化ナトリウム、75 mM クエン酸ナトリウムと共に、50 % (v / v) ホルムアミドを 42 で採用する；または (3) 50 % ホルムアミド、5 × S S C (0 . 75 M N a C l、0 . 075 M クエン酸ナトリウム)、50 mM リン酸ナトリウム (p H 6 . 8)、0 . 1 % ピロリン酸ナトリウム、5 × デンハート液、超音波処理サケ精子 D N A (50 μ g / m l)、0 . 1 % S D S、および 10 % 硫酸デキストランを 42 で採用し、0 . 2 × S S C (塩化ナトリウム / クエ

10

20

30

40

50

ン酸ナトリウム)中、42 でおよび50%ホルムアミド中55 で洗浄し、続いてEDTA含有0.1×SSCから成る高ストリンジェンシー洗浄を55 で行う条件によって特定することができる。中ストリンジェント条件は、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989によって記載されたように特定することができ、その条件は上記の条件よりもストリンジェントではない洗浄溶液およびハイブリダイゼーション条件(例えば温度、イオン強度および%SDS)の使用を含んでいる。中ストリンジェント条件の一例は、20%ホルムアミド、5×SSC(150mM NaCl、15mMクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハート液、10%硫酸デキストラン、および20mg/ml変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中37 で一晩インキュベーションに続き、約37~50 の1×SSC中でフィルターを洗浄することである。

10

【0023】

本明細書において開示されたタンパク質および変異型タンパク質のフラグメントもまた、本発明によって包含される。そのようなフラグメントは、例えば全長タンパク質に比べて、N末端もしくはC末端で切断されている場合があり、または内部残基を欠如している場合がある。ある種のフラグメントは、酵素活性に不可欠ではないアミノ酸残基を欠如している。好ましくは、該フラグメントは、少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、150、250、300、350、400、450、500またはそれよりも多いアミノ酸長である。

【0024】

本明細書において開示された核酸配列および変異体のフラグメントもまた、本発明によって包含される。そのようなフラグメントは、例えば全長核酸配列に比べて、3'もしくは5'末端で切断されている場合があり、または内部塩基を欠如している場合がある。好ましくは、該フラグメントは、少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、150、250、300、350、400、450、500またはそれよりも多い塩基長である。

20

【0025】

変異型タンパク質には、本明細書において開示されたポリペプチド配列と少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質が含まれる。好ましくは、変異型タンパク質は、本明細書において開示されたような全長ポリペプチド配列またはポリペプチド配列のフラグメントと少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%のアミノ酸配列同一性を有する。アミノ酸配列同一性は、いかなる保存的置換も配列同一性の一部として考慮せずに、最大の配列同一率(%)を達成するために配列をアライメントし、必要に応じてギャップを導入した後に、参照配列中のアミノ酸残基と同一な変異型配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。配列同一性は、変異型配列の全長、参照配列の全長、またはその両方にわたり決定することができる。

30

【0026】

変異型核酸配列には、本明細書において開示された核酸配列と少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する核酸配列が含まれる。好ましくは、変異型核酸配列は、本明細書において開示された全長核酸配列または核酸配列のフラグメントと少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%のアミノ酸配列同一性を有する。核酸配列同一性は、最大の配列同一率(%)を達成するために配列をアライメントし必要に応じてギャップを導入した後に、いかなる保存的置換も配列同一性の一部として考慮せずに参照配列中の核酸残基と同一な変異型配列中の核酸のパーセンテージとして定義される。配列同一性は、変異型

40

50

配列の全長、参照配列の全長、またはその両方にわたり決定することができる。

【 0 0 2 7 】

本発明の問い合わせアミノ酸配列と少なくとも例えば 95%「同一な」アミノ酸配列を有するポリペプチドは、対象ポリペプチドのアミノ酸配列が問い合わせ配列と同一であるが、但し、対象ポリペプチド配列が問い合わせアミノ酸配列のアミノ酸 100 個あたり最大 5 個のアミノ酸変化を含みうることを意味する。言い換えると、問い合わせアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一なアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るために、対象配列中のアミノ酸残基の最大 5% (100 個中 5 個) は挿入されている、欠失している、または別のアミノ酸によって置換されている場合がある。

【 0 0 2 8 】

本出願に関連して、同一パーセンテージはグローバルアライメント (すなわち 2 個の配列をそれらの全長にわたり比較する) を用いて計算される。2 個以上の配列の同一性を比較するための方法は、当技術分野において周知である。2 個の配列の全長を考慮する場合、それらの最適なアライメント (ギャップを含む) を見いだすために、例えば Needleman-Wunsch グローバルアライメントアルゴリズムを使用している「needle」プログラム (Needleman and Wunsch, 1970 J. Mol. Biol. 48:443-453) を使用することができる。needle プログラムは、例えばウェブサイト ebi.ac.uk から入手することができる。本発明による同一パーセンテージは、好ましくは EMBOSS:needle (グローバル) プログラムを使用して、「ギャップオープン」パラメーター = 10.0、「ギャップ伸長」パラメーター = 0.5、および Blosom62 マトリックスで計算される。

【 0 0 2 9 】

参照配列に「少なくとも 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% または 99% 同一な」アミノ酸配列から成るタンパク質は、参照配列に比べて欠失、挿入および/または置換などの突然変異を含みうる。置換の場合、参照配列と少なくとも 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% または 99% 同一なアミノ酸配列から成るタンパク質は、参照配列と別の種から得られた相同配列に該当しうる。

【 0 0 3 0 】

アミノ酸置換は、保存的または非保存的でありうる。好ましくは、置換は保存的置換であり、保存的置換では、アミノ酸 1 個を類似の構造的および/または化学的性質を有する別のアミノ酸の代わりに置換する。置換は、好ましくは下表に示されるような保存的置換に該当する。

【 0 0 3 1 】

【表 1】

保存的置換	アミノ酸の種類
Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Phe, Trp	脂肪族疎水性側鎖をもつアミノ酸
Ser, Tyr, Asn, Gln, Cys	非荷電であるが極性の側鎖をもつアミノ酸
Asp, Glu	酸性側鎖をもつアミノ酸
Lys, Arg, His	塩基性側鎖をもつアミノ酸
Gly	中性側鎖

【 0 0 3 2 】

用語「抗体」は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的活性部分、すなわち抗原と免疫特異的に結合する抗原結合部位を含む分子を表す。このように、抗体という用語は、抗体分子全体だけでなく抗体フラグメントおよびヒト化抗体などの誘導体を含めた抗体変異体も包含する。天然抗体では、2 本の重鎖がジスルフィド結合によって相互に結合し、各重鎖がジスルフィド結合によって軽鎖に結合している。軽鎖にはラムダ () およびカッパ () の 2 種類がある。抗体分子の機能的活性を決定する 5 種の主要重鎖クラス (またはアイソタイプ) : IgM、IgD、IgG、IgA および IgE がある。各鎖は、別個の配列ドメインを含有する。軽鎖は、2 個のドメイン、すなわち可変ド

10

20

30

40

50

メイン（V L）および定常メイン（C L）を含む。重鎖は、4個のドメイン、すなわち可変ドメイン（V H）および3個の定常ドメイン（C H 1、C H 2およびC H 3、まとめてC Hと呼ばれる）を含む。軽鎖（V L）および重鎖（V H）の両方の可変領域は、抗原への結合認識および特異性を決定する。軽鎖（C L）および重鎖（C H）の定常領域ドメインは、抗体鎖の会合、分泌、経胎盤移動性、補体結合、およびFcレセプター（Fc R）との結合などの重要な生物学的性質を付与する。Fvフラグメントは、免疫グロブリンのFabフラグメントのN末端部分であり、1本の軽鎖および1本の重鎖の可変部分から成る。抗体の特異性は、抗体結合部位と抗原決定基との間の構造相補性にある。抗体結合部位は、主に超可変領域または相補性決定領域（CDR）由来の残基から構成される。時に、非超可変領域またはフレームワーク領域（FR）由来の残基は、全体的なドメイン構造に、それ故に結合部位に影響する。相補性決定領域（CDR）は、一緒になってネイティブな免疫グロブリン結合部位の天然Fv領域の結合親和性および特異性を定義するアミノ酸配列を表す。免疫グロブリンの軽鎖および重鎖は、それぞれが各々L - CDR 1、L - CDR 2、L - CDR 3およびH - CDR 1、H - CDR 2、H - CDR 3と称される3個のCDRを有する。したがって、抗原結合部位は、重鎖V領域および軽鎖V領域のそれぞれ由来のCDRセットを含む6個のCDRを含む。

10

【0033】

Kabatら（Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991)）によって定義されたように、フレームワーク領域（FR）は、CDRの間に介在するアミノ酸配列を表し、すなわち単一種において異なる免疫グロブリンの間で相対的に保存されている、免疫グロブリン軽鎖および重鎖の可変領域の部分を表す。本明細書に使用される「ヒトフレームワーク領域」は、天然ヒト抗体のフレームワーク領域に実質的に（約85%以上、特に90%、95%、または100%）同一なフレームワーク領域である。

20

【0034】

本明細書に使用される用語「モノクローナル抗体」または「mAb」は、特異的抗原に対する単一アミノ酸組成の抗体分子であって、単クローンのB細胞またはハイブリドーマによって産生されうる抗体分子を表す。モノクローナル抗体は、また、リコンビナントの場合があり、すなわちタンパク質工学によって産生される場合がある。

30

【0035】

用語「キメラ抗体」は、非ヒト動物から得られた抗体のVHドメインおよびVLドメインが、別の抗体、特にヒト抗体のCHドメインおよびCLドメインと結合したものを含む加工抗体を表す。非ヒト動物として、マウス、ラット、ハムスター、ウサギなどの任意の動物を使用することができる。キメラ抗体は、また、少なくとも2種の異なる抗原に対して特異性を有する多重特異性抗体を意味しうる。

【0036】

用語「ヒト化抗体」は、フレームワーク領域または「相補性決定領域」（CDR）が改変されて、親免疫グロブリンのCDRと異なる特異性のドナー免疫グロブリン由来CDRを含むようになった抗体を表す。好ましい一態様では、「ヒト化抗体」を調製するために、マウスCDRがヒト抗体のフレームワーク領域に接ぎ合わされる。

40

【0037】

「抗体フラグメント」は、インタクトな抗体の部分、好ましくはインタクトな抗体の抗原結合領域または可変領域を含む。抗体フラグメントの例には、Fv、Fab、F(ab')₂、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)₂、二重特異性抗体および抗体フラグメントから形成された多重特異性抗体が含まれる。

【0038】

用語「Fab」は、分子量約50,000および抗原結合活性を有する抗体フラグメントであって、IgGをプロテアーゼであるパパインで処理することによって得られたフラグメントのうちH鎖のN末端側の約半分およびL鎖全体がジスルフィド結合を介して一緒に結合している抗体フラグメントを意味する。

50

【 0 0 3 9 】

用語「 $F(ab')_2$ 」は、分子量約100,000および抗原結合活性を有する抗体フラグメントであって、IgGをプロテアーゼであるペプシンで処理することによって得られたフラグメントのうち、Fabよりもわずかに大きな抗体フラグメントがヒンジ領域のジスルフィド結合を経由して結合している抗体フラグメントを表す。

【 0 0 4 0 】

用語「Fab'」は、 $F(ab')_2$ のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断することによって得られる、分子量約50,000および抗原結合活性を有する抗体フラグメントを表す。

【 0 0 4 1 】

単鎖Fv（「scFv」）ポリペプチドは、通常、ペプチドをコードするリンカーによって結合されたVHコード遺伝子およびVLコード遺伝子を含む遺伝子融合体から発現された共有結合型VH:VLヘテロ二量体である。本発明のヒトscFvフラグメントには、好ましくは遺伝子組換え技法を用いることによって適切なコンフォメーションに保持されたCDRが含まれる。「dsFv」はジスルフィド結合によって安定化されたVH:VLヘテロ二量体である。2価および多価抗体フラグメントは、1価scFvの会合によって自然に形成させることができ、または2価sc(Fv)₂のようにペプチドリinkerによって1価scFvを結合させることによって発生させることができる。

【 0 0 4 2 】

用語「二重特異性抗体」は、2個の抗原結合部位を有する小型抗体フラグメントであって、重鎖可変ドメイン（VH）が軽鎖可変ドメイン（VL）に結合して同じポリペプチド鎖になったものを含む抗体フラグメント（VH-VL）を表す。同じ鎖上の2個のドメインの間で対形成させるには短すぎるリンカーを使用することによって、これらのドメインは別の鎖の相補的ドメインと対形成するよう強制され、2個の抗原結合部位を創出する。

【 0 0 4 3 】

「アンチセンス核酸」は、RNA-RNAまたはRNA-DNAまたはRNA-PNA（タンパク質核酸；Egholm et al., 1993, Nature, 365: 566）相互作用により標的RNAに結合し、標的RNAの活性を変化させる非酵素的核酸分子を意味する（総説についてはStein and Cheng, 1993, Science, 261, 1004およびWoolfら、米国特許第5,849,902号を参照されたい）。典型的には、アンチセンス分子は、アンチセンス分子の単一連続配列に沿って標的配列と相補的である。しかし、ある態様では、アンチセンス分子は、基質分子がループもしくはヘアピンを形成するように基質に結合することができ、かつ/またはアンチセンス分子がループもしくはヘアピンを形成するように結合することができる。したがって、アンチセンス分子は、2、3、4、5、6、7、8、9、10もしくはそれよりも多い非連続基質配列に相補的な場合があり、またはアンチセンス分子の2、3、4、5、6、7、8、9、10もしくはそれよりも多い非連続配列部分が標的配列に相補的な場合があり、またはその両方である（例えばCrooke, 2000, Methods Enzymol., 313: 3-45参照）。加えて、アンチセンスDNAはDNA-RNA相互作用によりRNAをターゲティングすることによってRNAse H（二本鎖の標的RNAを消化する）を活性化するために使用することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的RNAのRNAse H切断を活性化する能力がある1個または複数のRNAse H活性化領域を含みうる。

【 0 0 4 4 】

アンチセンス核酸は、導入されると、通常RNA干渉（RNAi）経路と呼ばれる細胞経路に入る。用語「RNA干渉」または「RNAi」は、遺伝子サイレンシングとも呼ばれるRNAの選択的細胞内分解を表す。RNAiには、低分子干渉RNA（siRNA）による翻訳抑制も含まれる。RNAiは、長二本鎖RNA（dsRNA）もしくはsiRNAの導入、または例えばプラスミドもしくは導入遺伝子からのsiRNAの細胞内産生により開始して、1つ以上の標的遺伝子の発現をサイレンシングすることができる。または、RNAiは細胞内で自然に生じ、外来RNA、例えばウイルスRNAを除去する。自

10

20

30

40

50

然RNAiは、dicerが前駆dsRNAのフラグメント化を指揮し、分解メカニズムを他の同族RNA配列に向けることを介して進行する。

【0045】

いくつかの態様では、アンチセンス核酸は、長二本鎖RNA(dsRNA)、マイクロRNA(miRNA)および/または低分子干渉RNA(siRNA)でありうる。

【0046】

本明細書に使用される「長二本鎖RNA」または「dsRNA」は、ゲノムもしくは合成起源の、またはベクターの発現から得られた、改変または非改変のオリゴリボヌクレオチドまたはポリリボヌクレオチド、およびそのフラグメントまたは部分であって、部分二本鎖または完全二本鎖の場合があり、かつ平滑末端であるか、または5'および/もしくは3'オーバーハングを含む場合があり、また、二つ折りになって二本鎖領域が得られる一本鎖オリゴリボヌクレオチドを含むヘアピン形態でもありうるものを表す。いくつかの態様では、dsRNAは、150bpから3000bpに及ぶ、好ましくは250bpから2000bpに及ぶ、いっそうより好ましくは300bpから1000bpに及ぶ大きさを有する。いくつかの態様では、該dsRNAは、少なくとも150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1500bpの大きさを有する。いくつかの態様では、該dsRNAは、最大で3000、2500、2000、1500、1000、950、900、850、800、750、700、650、600、550、500、450、400、350、300bpの大きさを有する。

10

20

【0047】

「低分子干渉RNA」または「siRNA」は、関心がもたれる遺伝子にターゲティングされたRNA二本鎖のヌクレオチドである。RNA二本鎖は、RNA分子の2領域の間の相補的対形成によって形成される構造を表す。siRNAは、その二本鎖部分のヌクレオチド配列が、ターゲティングされた遺伝子のヌクレオチド配列と相補的であるような遺伝子にターゲティングされる。いくつかの態様では、siRNAの二本鎖長は、ヌクレオチド15個からヌクレオチド50個に及び、好ましくはヌクレオチド20個からヌクレオチド35個に及び、いっそうより好ましくはヌクレオチド21個からヌクレオチド29個に及び。いくつかの態様では、二本鎖は、少なくとも15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、40、45、50ヌクレオチド長でありうる。いくつかの態様では、二本鎖は、最大で45、40、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15ヌクレオチド長でありうる。siRNAのRNA二本鎖部分は、ヘアピン構造の部分でありうる。二本鎖部分に加えて、ヘアピン構造は、二本鎖を形成する二つの配列の間に位置するループ部分を含む。ループは、様々な長さでありうる。いくつかの態様では、ループは5、6、7、8、9、10、11、12、または13ヌクレオチド長である。ヘアピン構造は、また、3または5オーバーハング部分を含む。いくつかの態様では、オーバーハングは0、1、2、3、4、または5ヌクレオチド長の3'または5'オーバーハングである。

30

40

【0048】

細胞および生物へのアンチセンス核酸の注入およびトランスフェクションが、主な送達方法である。しかし、一過性および安定トランスフェクションされた哺乳動物細胞においてアンチセンス核酸を連続的に発現させるために、発現ベクターも使用することができる。(例えば、Brummelkamp et al., 2002, Science, 296:550-553; Paddison et al., 2002, Genes & Dev, 16:948-958参照)。

【0049】

アンチセンス核酸は、化学合成することができ、または例えばCaruthers et al., 1992

50

, Methods in Enzymology, 211:3-19 ; 国際 P C T 公報である国際公開公報第 9 9 / 5 4 4 5 9 号; Brennan et al., 1998, Biotechnol Bioeng. 61:33-45、および米国特許第 6 , 0 0 1 , 3 1 1 号に記載されている当技術分野において公知のプロトコルを用いて、一本鎖 D N A 発現ベクターもしくはその同等物の使用により発現させることができる。非限定的な一例では、394 Applied Biosystems, Inc. 合成装置で小規模合成を行う。または本発明のアンチセンス核酸分子を別々に合成し、合成後に、例えばライゲーションによって一緒につなぎ合わせることができる (国際 P C T 公報である国際公開公報第 9 3 / 2 3 5 6 9 号、Bellon et al., 1997, Bioconjugate Chem, 8:204) 。

【 0 0 5 0 】

本発明のアンチセンス核酸は、標的遺伝子、例えば T A M レセプターまたは G a s 6 タンパク質の発現を少なくとも 1 0 、 2 0 、 3 0 、 4 0 % 、より好ましくは少なくとも 5 0 、 6 0 、 7 0 % 、最も好ましくは少なくとも 7 5 、 8 0 、 8 5 、 9 0 、 9 5 、 9 6 、 9 7 、 9 8 、 9 9 、 1 0 0 % 低下させることができる。

【 0 0 5 1 】

「変異型 T A M レセプター」または「変異型 G a s 6 タンパク質」または「変異型 T I M レセプター」は、それぞれ T A M レセプターまたは G a s 6 タンパク質または T I M レセプターと 1 個または数個のアミノ酸が異なるレセプターまたはタンパク質を意味する。例えば、該変異型 T A M レセプターは、例えば突然変異 E 6 3 R 、 E 6 6 R もしくは T 8 4 7 R を保有する配列番号 7 もしくは 8 の配列の A X L レセプターのように、もはや G a s 6 タンパク質と結合できない点で、または例えば突然変異 K 5 5 8 M を保有する配列番号 7 の配列の A X L レセプターもしくは突然変異 K 5 6 7 M を保有する配列番号 8 の配列の A X L レセプターのように、もはやそのキナーゼ活性を有することができない点で、T A M レセプターと異なりうる。例えば、該変異型 G a s 6 タンパク質は、もはやホスファチジルセリンおよび / または T A M レセプターに結合できない点で G a s 6 タンパク質と異なりうる。例えば、該変異型 G a s 6 タンパク質は、配列番号 1 9 の配列の G a s 6 g l a (r m G a s 6 g l a と呼ばれる) でありうる。例えば、該変異型 T I M レセプターは、もはやホスファチジルセリンに結合できない点で、またはもはやそのキナーゼ活性を有することができない点で、T I M レセプターと異なりうる。

【 0 0 5 2 】

用語「対象」、「個体」または「宿主」は、互換的に使用され、例えばヒトまたは非ヒト哺乳動物でありうる。例えば対象は、コウモリ ; フェレット ; ウサギ ; ネコ科動物 (ネコ) ; イヌ科動物 (イヌ) ; 霊長類 (サル) 、ウマ科動物 (ウマ) ; 男性、女性、子供を含めたヒトである。

【 0 0 5 3 】

ホスファチジルセリンと T A M レセプターとの間の相互作用の阻害剤

ホスファチジルセリンは、リン酸基がセリンアミノ酸と結合しているリン脂質であって、C A S 番号 8 0 0 2 - 4 3 - 5 で参照されるリン脂質である。

【 0 0 5 4 】

「T A M レセプター」は、T y r o 3 / A x l / M e r ファミリーのチロシンキナーゼレセプターを意味する。好ましい態様では、該 T A M レセプターは T Y R O - 3 、 A X L または M E R レセプターである。

【 0 0 5 5 】

好ましくは、T Y R O - 3 レセプターは、

a) 配列番号 5 の配列 (N C B I 参照配列 N P _ 0 0 6 2 8 4 . 2 、 2 0 1 1 年 1 1 月 1 4 日更新) 、

b) 配列番号 6 の配列の核酸 (N C B I 参照配列 N M _ 0 0 6 2 9 3 . 3 、 2 0 1 2 年 1 月 1 4 日更新) によってコードされる配列、

c) a) または b) の配列と少なくとも 8 0 、 8 5 、 9 0 、 9 5 、 9 6 、 9 7 、 9 8 、 9 9 % 同一な配列

を含む、またはそれから成る。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 6 】

好ましくは、A X L レセプターは、

a) 配列番号 7 の配列 (N C B I 参照配列 N P __ 0 0 1 6 9 0 . 2、2 0 1 1 年 1 1 月 2 6 日更新)、

b) 配列番号 8 の配列 (N C B I 参照配列 N P __ 0 6 8 7 1 3 . 2、2 0 1 1 年 1 1 月 2 6 日更新)、

c) 配列番号 9 の配列の核酸 (N C B I 参照配列 N M __ 0 2 1 9 1 3 . 3、2 0 1 2 年 1 月 1 5 日更新) によってコードされる配列、

d) 配列番号 1 0 の配列の核酸 (N C B I 参照配列 N M __ 0 0 1 6 9 9 . 4、2 0 1 2 年 1 月 1 5 日更新) によってコードされる配列、

e) a) ~ d) の配列と少なくとも 8 0、8 5、9 0、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9 % 同一な配列

を含む、またはそれから成る。

10

【 0 0 5 7 】

好ましくは、M E R レセプターは、

a) 配列番号 1 1 の配列 (N C B I 参照配列 N P __ 0 0 6 3 3 4 . 2、2 0 1 1 年 1 2 月 2 4 日更新)、

b) 配列番号 1 2 の配列の核酸 (N C B I 参照配列 N M __ 0 0 6 3 4 3 . 2、2 0 1 1 年 1 2 月 2 4 日更新) によってコードされる配列、

c) a) または b) の配列と少なくとも 8 0、8 5、9 0、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9 % 同一な配列

を含む、またはそれから成る。

20

【 0 0 5 8 】

G a s 6 タンパク質は、ホスファチジルセリンと T A M レセプターとの間の相互作用を媒介する架橋分子である。

【 0 0 5 9 】

好ましくは、G a s 6 タンパク質は、

a) 配列番号 1 3 の配列 (N C B I 参照配列 N P __ 0 0 0 8 1 1 . 1、2 0 1 1 年 1 2 月 2 4 日更新)、

b) 配列番号 1 4 の配列 (N C B I 参照配列 N P __ 0 0 1 1 3 7 4 1 7 . 1、2 0 1 1 年 1 2 月 2 4 日更新)、

c) 配列番号 1 5 の配列 (N C B I 参照配列 N P __ 0 0 1 1 3 7 4 1 8 . 1、2 0 1 1 年 1 2 月 2 4 日更新)、

d) 配列番号 1 6 の配列の核酸 (N C B I 参照配列 N M __ 0 0 0 8 2 0 . 2、2 0 1 2 年 1 月 1 5 日更新) によってコードされる配列、

e) 配列番号 1 7 の配列の核酸 (N C B I 参照配列 N M __ 0 0 1 1 4 3 9 4 5 . 1、2 0 1 2 年 1 月 1 5 日更新) によってコードされる配列、

f) 配列番号 1 8 の配列の核酸 (N C B I 参照配列 N M __ 0 0 1 1 4 3 9 4 6 . 1、2 0 1 2 年 1 月 1 5 日更新) によってコードされる配列、

g) a) ~ f) の配列と少なくとも 8 0、8 5、9 0、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9 % 同一な配列

を含む、またはそれから成る。

30

40

【 0 0 6 0 】

いくつかの態様では、T A M レセプター阻害剤は、抗 T A M レセプター抗体、アンチセンス核酸、模倣体または変異型 T A M レセプターである。

【 0 0 6 1 】

好ましくは、該 T A M レセプター阻害剤はアンチセンス核酸であり、より好ましくは、該 T A M レセプター阻害剤は s i R N A である。該アンチセンス核酸は、配列番号 5、7、8、もしくは 1 1 の配列の T A M レセプターまたは配列番号 6、9、1 0、もしくは 1 2 の核酸によってコードされる配列の T A M レセプターの発現を阻害または減少させるこ

50

とができる配列を含むまたはそれから成りうる。該アンチセンス核酸は、TAMレセプターまたはそのフラグメントをコードする核酸、例えば配列番号6、9、10、または12の配列の核酸に相補的な配列を含むまたはそれから成りうる。一態様では、該siRNAは、配列番号1、2、3、または4の配列の少なくとも1種のsiRNAを含むまたはそれから成る。一態様では、該siRNAは、配列番号1、2、3、および4から成る群より選択される少なくとも2、3、または4種のsiRNAを含むまたはそれから成る。一態様では、該siRNAは、配列番号1、2、3、および4から成る群より選択される最大で4、3、または2種のsiRNAを含むまたはそれから成る。一態様では、該siRNAは、配列番号1、2、3、および4の配列の4種のsiRNAを含むまたはそれから成る。

10

【0062】

好ましくは、該模倣体は、TAMレセプターの細胞外ドメインを含むまたはそれから成る。例えば、該模倣体は、配列番号7または配列番号8のアミノ酸26～451番を含むまたはそれから成りうる。

【0063】

いっそうより好ましくは、該模倣体は、可溶性形態のTAMレセプター細胞外ドメインを含むまたはそれから成る。例えば該模倣体は、配列番号5のアミノ酸41～428番の配列、または配列番号7もしくは配列番号8のアミノ酸33～440番の配列を含むまたはそれから成りうる。

20

【0064】

好ましくは、該抗TAMレセプター抗体は、Gas6タンパク質へのTAMレセプターの結合部位に対する抗体である。好ましくは、該抗TAMレセプター抗体は、配列番号7または配列番号8の配列のアミノ酸63～84番に対するものである。

【0065】

いくつかの態様では、Gas6阻害剤は、抗Gas6抗体、アンチセンス核酸、模倣体または変異型Gas6タンパク質である。

【0066】

好ましくは、該Gas6阻害剤はアンチセンス核酸であり、より好ましくは該Gas6阻害剤はsiRNAである。該アンチセンス核酸は、配列番号13、14、もしくは15の配列のGas6タンパク質または配列番号16、17、もしくは18の核酸によってコードされる配列のGas6タンパク質の発現を阻害または減少させることができる配列を含むまたはそれから成りうる。該アンチセンス核酸は、Gas6またはそのフラグメントをコードする核酸、例えば配列番号16、17、または18の配列の核酸に相補的な配列を含むまたはそれから成りうる。

30

【0067】

好ましくは、該Gas6阻害剤は、配列番号19の配列の変異型Gas6タンパク質Gas6 Gluである。

【0068】

好ましくは、該Gas6模倣体は、配列番号13の残基53～94番のアミノ酸配列を含むもしくはそれから成りうるホスファチジルセリン認識部位を含むもしくはそれから成り、または該模倣体は、配列番号13の残基298～670番のアミノ酸配列を含むもしくはそれから成りうるレセプター結合部位を含むもしくはそれから成る。

40

【0069】

好ましくは、該抗Gas6抗体は、TAMレセプターへのGas6タンパク質の結合部位に対する抗体である。好ましくは、該抗Gas6抗体は、配列番号13の配列のアミノ酸304～312番、配列番号14の配列のアミノ酸31～39番、または配列番号15の配列のアミノ酸5～13番に対するものである。

【0070】

ホスファチジルセリン結合タンパク質は、ホスファチジルセリンに結合することができるが、Gas6タンパク質に結合できないタンパク質でありうる。好ましくは、該ホスフ

50

ァチジルセリン結合タンパク質は、抗ホスファチジルセリン抗体またはアネキシンVである。

【0071】

好ましくは、該抗ホスファチジルセリン抗体は、Gas6タンパク質へのホスファチジルセリンの結合部位に対する抗体である。例えば該抗体は、抗ホスファチジルセリン抗体クローン1H6（Upstate（登録商標））でありうる。

【0072】

好ましくは、該アネキシンVタンパク質は、

a) 配列番号20の配列（NCBI参照配列NP__001145.1、2012年2月1日更新）、

b) 配列番号21の配列の核酸（NCBI参照配列NM__001154.3、2011年12月18日更新）によってコードされる配列、

c) a) または b) の配列と少なくとも80、85、90、95、96、97、98、99%同一な配列を含むまたはそれから成る。

【0073】

抗ウイルス化合物

好ましい一態様では、本発明による阻害剤は、少なくとも1種の他の抗ウイルス化合物と組み合わせて、経時または同時のいずれかでの投与用である。

【0074】

経時的投与は、異なる（それでもなお重複しうる）時間または時点で成分が投与されることを示す。同時投与は、成分が同時に投与されることを示す。

【0075】

抗ウイルス化合物には、非限定的にノイラミニダーゼ阻害剤、ウイルス融合阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、DNAポリメラーゼ阻害剤、シグナル伝達阻害剤、逆転写酵素阻害剤、インターフェロン、ヌクレオシドアナログ、インテグラーゼ阻害剤、チミジンキナーゼ阻害剤、ウイルス糖または糖タンパク質合成阻害剤、ウイルス構造タンパク質合成阻害剤、ウイルス付着および吸着阻害剤、ウイルス侵入阻害剤およびそれらの機能的アナログが含まれうる。

【0076】

ノイラミニダーゼ阻害剤には、オセルタミビル、ザナミビルおよびペラミビルが含まれうる。ウイルス融合阻害剤には、シクロスポリン、マラビロク、エンフビルチド（enfuvirtide）およびドコサノールが含まれうる。

【0077】

プロテアーゼ阻害剤には、サキナビル、インジナビル、アンブレナビル、ネルフィナビル、リトナビル、チプラナビル、アタザナビル、ダルナビル、ザナミビルおよびオセルタミビルが含まれうる。

【0078】

DNAポリメラーゼ阻害剤には、イドクスウリジン、ビダラビン、ホスホノ酢酸、トリフルリジン、アシクロビル、ホスカルネット（foscarnet）、ガンシクロビル、ペンシクロビル、シドクロビル（cidofovir）、ファムシクロビル、バラシクロビルおよびバルガンシクロビルが含まれうる。

【0079】

シグナル伝達阻害剤には、レスベラトロールおよびリバビリンが含まれる。ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤（NRTI）には、ジドブジン（ZDV、AZT）、ラミブジン（3TC）、スタブジン（d4T）、ザルシタピン（ddC）、ジダノシン（2',3'-ジデオキシイノシン、ddI）、アバカビル（ABC）、エミリビン（emirivine）（FTC）、テノホビル（TDF）、デラビルジン（delaviradine）（DLV）、フゼオン（T-20）、インジナビル（IDV）、ロピナビル（LPV）、アタザナビル、コンビル（ZDV/3TC）、カレトラ（RTV/LPV）、アデホビルジビボキシルおよびトリ

10

20

30

40

50

ジビル (Z D V / 3 T C / A B C) が含まれうる。非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (N N R T I) には、ネビラピン、デラビルジン、U C - 7 8 1 (チオカルボキサニリド)、ピリジノン、T I B O、カラノリド A、カブラピリンおよびエファビレンツが含まれうる。

【 0 0 8 0 】

ウイルス侵入阻害剤には、フゼオン (T - 2 0)、N B - 2、N B - 6 4、T - 6 4 9、T - 1 2 4 9、S C H - C、S C H - D、P R O 1 4 0、T A K 7 7 9、T A K - 2 2 0、R A N T E S アナログ、A K 6 0 2、U K - 4 2 7、8 5 7、関連レセプターに対するモノクローナル抗体、シアノピリン - N、シクロデキストリン、カラゲナン (carreegeenan)、硫酸化またはスルホン化ポリマー、マンデル酸縮合ポリマー、A M D - 3 1 0 0、およびその機能的アナログが含まれうる。 10

【 0 0 8 1 】

好ましくは、該少なくとも 1 種の他の抗ウイルス化合物は、ホスファチジルセリンと T I M レセプターとの間の相互作用の阻害剤である。

【 0 0 8 2 】

「 T I M レセプター」は、T I M - 1、T I M - 3 または T I M - 4 レセプターを意味する。

【 0 0 8 3 】

いくつかの態様では、T I M - 1 レセプターは、

- a) 配列番号 2 2 の配列 (G e n B a n k 番号 A A H 1 3 3 2 5 . 1、2 0 0 3 年 1 0 月 4 日更新)、 20
 - b) 配列番号 2 3 の核酸 (N C B I 参照配列 N M __ 0 1 2 2 0 6 . 2、2 0 1 1 年 1 1 月 2 6 日更新) によってコードされる配列、
 - c) 配列番号 2 4 の核酸 (N C B I 参照配列 N M __ 0 0 1 0 9 9 4 1 4 . 1、2 0 1 1 年 1 1 月 2 6 日更新) によってコードされる配列、
 - d) 配列番号 2 5 の核酸 (N C B I 参照配列 N M __ 0 0 1 1 7 3 3 9 3 . 1、2 0 1 1 年 1 2 月 4 日更新) によってコードされる配列、
 - e) a) ~ d) の配列と少なくとも 8 0、8 5、9 0、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9 % 同一な配列
- を含むまたはそれから成る。 30

【 0 0 8 4 】

いくつかの態様では、T I M - 3 レセプターは、

- a) 配列番号 2 6 の配列 (G e n B a n k 番号 A A H 2 0 8 4 3 . 1、2 0 0 3 年 9 月 1 6 日更新)、
 - b) 配列番号 2 7 の配列 (G e n B a n k 番号 A A H 6 3 4 3 1 . 1、2 0 0 6 年 7 月 1 5 日更新)、
 - c) 配列番号 2 8 の核酸 (N C B I 参照配列 N M __ 0 3 2 7 8 2 . 4、2 0 1 1 年 1 2 月 2 5 日更新) によってコードされる配列、
 - d) a) ~ c) の配列と少なくとも 8 0、8 5、9 0、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9 % 同一な配列
- を含むまたはそれから成る。 40

【 0 0 8 5 】

いくつかの態様では、T I M - 4 レセプターは、

- a) 配列番号 2 9 の配列 (N C B I 参照配列 N P __ 6 1 2 3 8 8 . 2、2 0 1 1 年 1 2 月 2 4 日更新)、
- b) 配列番号 3 0 の配列 (N C B I 参照配列 N P __ 0 0 1 1 4 0 1 9 8 . 1、2 0 1 1 年 1 2 月 2 5 日更新)、
- c) 配列番号 3 1 の核酸 (N C B I 参照配列 N M __ 1 3 8 3 7 9 . 2、2 0 1 1 年 1 2 月 2 4 日更新) によってコードされる配列、
- d) 配列番号 3 2 の核酸 (N C B I 参照配列 N M __ 0 0 1 1 4 6 7 2 6 . 1、2 0 1 1 50

年 12 月 25 日更新) によってコードされる配列、

e) a) ~ d) の配列と少なくとも 80、85、90、95、96、97、98、99 % 同一な配列を含むまたはそれから成る。

【0086】

いくつかの態様では、該ホスファチジルセリンと T I M レセプターとの相互作用の阻害剤は、T I M レセプター阻害剤である。好ましくは、該 T I M レセプター阻害剤は、抗 T I M レセプター抗体、アンチセンス核酸、模倣体または変異型 T I M レセプターである。好ましくは、該 T I M レセプター阻害剤はアンチセンス核酸であり、より好ましくは該 T I M レセプター阻害剤は s i R N A である。該アンチセンス核酸は、配列番号 22、26、27、29、もしくは 30 の配列の T I M レセプターまたは配列番号 23、24、25、28、31、もしくは 32 の核酸によってコードされる配列の T I M レセプターの発現を阻害または減少させることができる配列を含むまたはそれから成りうる。該アンチセンス核酸は、T I M レセプターをコードする核酸、例えば配列番号 23、24、25、28、31、もしくは 32 の配列の核酸に相補的な配列を含むまたはそれから成りうる。一態様では、該 T I M レセプター阻害剤は、配列番号 33、34、35 または 36 の配列の少なくとも 1 種の s i R N A を含むまたはそれから成る。一態様では、該 s i R N A は、配列番号 33、34、35、および 36 からなる群より選択される少なくとも 2、3、または 4 種の s i R N A を含むまたはそれから成る。一態様では、該 s i R N A は、配列番号 33、34、35、および 36 から成る群より選択される最大で 4、3、2、または 1 種の s i R N A を含むまたはそれから成る。一態様では、該 s i R N A は、配列番号 33、34、35、および 36 の配列の 4 種の s i R N A を含むまたはそれから成る。

【0087】

好ましくは、該抗 T I M レセプター抗体は、Kondratowicz et al., 2011, PNAS, 108:8426-8431 に記載されている抗 T I M 1 レセプター抗体 A R D 5 または Sonar et al., 2010, The Journal of Clinical investigation, 120: 2767-2781 に記載されている抗 T I M 1 抗体 A 6 G 2 である。

【0088】

好ましくは、該模倣体は、T I M レセプターの細胞外ドメインを含むまたはそれから成る。例えば該模倣体は、配列番号 22 の T I M - 1 についての残基 21 ~ 295 番のアミノ酸配列を含むもしくはそれから成りうるか、該模倣体は、配列番号 37 の T I M - 1 についての残基 21 ~ 290 番のアミノ酸配列を含むもしくはそれから成りうるか、または該模倣体は、配列番号 29 の T I M - 4 についての残基 25 ~ 314 番のアミノ酸配列を含むもしくはそれから成りうる。

【0089】

好ましくは、該抗 T I M レセプター抗体は、ホスファチジルセリンへの T I M レセプターの結合部位に対する抗体である。好ましくは、該ホスファチジルセリンへの T I M レセプターの結合部位に対する抗体は、T I M レセプターの金属イオン依存性リガンド結合部位 (M I L I B) に対するものである。いっそうより好ましくは、該抗 T I M レセプターは、配列番号 22 の配列のアミノ酸 111 ~ 115 番、または配列番号 29 もしくは配列番号 30 の配列のアミノ酸 119 ~ 122 番に対するものである。

【0090】

細胞へのホスファチジルセリン保有ウイルスの侵入を阻害するための方法

本発明による阻害剤は、細胞への P t d S e r 保有ウイルスの侵入を阻害する方法に使用することができる。

【0091】

該方法は、in vitro もしくは ex vivo 方法、または本明細書記載の P t d S e r 保有ウイルス感染の予防もしくは治療方法でありうる。

【0092】

したがって、本発明は、細胞への P t d S e r 保有ウイルスの侵入を阻害するための in

10

20

30

40

50

vitroまたはin vivo方法における、本明細書に定義される阻害剤の使用を提供する。細胞へのP t d S e r 保有ウイルスの侵入を阻害するためのin vitroまたはin vivo方法における使用のための本明細書に定義される阻害剤も提供される。

【0093】

いくつかの態様では、該阻害剤は、本明細書上述に定義される少なくとも1種の他の抗ウイルス化合物と組み合わせた使用である。

【0094】

該方法は、例えば該阻害剤に該細胞および/または該P t d S e r 保有ウイルスを曝露することを含みうる。方法がin vivo方法の場合、その方法は、該阻害剤を対象、好ましくはそれを必要とする患者に投与することを含みうる。

10

【0095】

いくつかの態様では、該細胞は、樹状細胞、内皮細胞、星状膠細胞、肝細胞、ニューロン、クッパー細胞、および/またはマクロファージでありうる。

【0096】

薬学的組成物

本発明による阻害剤は、単独で、または少なくとも1種の他の抗ウイルス化合物と組み合わせて、薬学的に許容されうる組成物に製剤化することができる。

【0097】

したがって本発明は、本発明による阻害剤および追加的に少なくとも1種の他の抗ウイルス化合物を含む薬学的組成物を提供する。

20

【0098】

該少なくとも1種の他の抗ウイルス化合物は、上記に定義された化合物でありうる。

【0099】

一態様では、該阻害剤は、配列番号1、2、3、および4の配列のs i R N Aから成る群より選択される少なくとも1、2、3、もしくは4種、または最大で4、3、2、もしくは1種のs i R N A、ならびに/あるいは本明細書上述に定義されるアネキシンVを含むまたはそれから成り、少なくとも1種の他の抗ウイルス化合物は、配列番号33、34、35、および36の配列のs i R N Aから成る群より選択される少なくとも1、2、3、もしくは4種、または最大で4、3、2、もしくは1種のs i R N Aならびに/あるいは本明細書上述に定義される配列番号19の配列の変異型G a s 6タンパク質G a s 6 g l aを含むまたはそれから成る。一態様では、該阻害剤は、配列番号1、2、3、および4の配列の4種のs i R N Aならびに/または本明細書上述に定義されるアネキシンVを含むまたはそれから成り、少なくとも1種の他の抗ウイルス化合物は、配列番号33、34、35、および36の配列の4種のs i R N Aならびに/または本明細書上述に定義される配列番号19の配列の変異型G a s 6タンパク質G a s 6 g l aを含むまたはそれから成る。

30

【0100】

本発明による薬学的組成物は、適切な薬学的単位投与剤形の形態で経口投与することができる。本発明の薬学的組成物は、錠剤、ゼラチン硬または軟カプセル、液剤、懸濁剤、ならびにリポゾームおよび成形ポリマーゲル剤などの他の徐放製剤が含まれる多数の剤形に調製することができる。

40

【0101】

投薬様式および投与剤形は、所与の処置適用に望ましく有効な治療剤または組成物の性質に密接に関係する。適切な投薬剤形には、非限定的に、経口、静脈内、直腸、舌下、粘膜、経鼻、眼、皮下、筋肉内、経皮、脊髄、髄腔内、関節内、動脈内、クモ膜下、気管支、およびリンパ投与、ならびに活性成分の全身送達のための他の投薬剤形が含まれる。

【0102】

本発明の薬学的組成物は、非限定的に、経皮（パッチ、ゲル、クリーム、軟膏またはイオン泳動による受動的）；静脈内（ボラス、注入）；皮下（注入、デポー）；経粘膜（バッカルおよび舌下、例えば口腔内分散錠（orodispersible tablet）、ウエファース、

50

フィルム、および発泡製剤；結膜（点眼剤）；直腸（坐剤、浣腸））；または皮内（ボーラス、注入、デポー）を含めた当技術分野において公知の任意の方法により投与することができる。

【0103】

経口液体薬学的組成物は、例えば、水性もしくは油性懸濁剤、液剤、乳剤、シロップ剤もしくはエリキシル剤の形態の場合があり、または使用前に水もしくは他の適切なビヒクルで構成するための乾燥製品として提示される場合がある。そのような液体薬学的組成物は、懸濁化剤、乳化剤、非水性ビヒクル（食用油が含まれる）、または保存料などの通常の添加剤を含有する。

【0104】

本発明の薬学的組成物は、また、非経口投与（例えば注射、例えばボーラス注射または連続注入による）用に製剤化される場合があり、アンプル、プレフィルドシリンジ、少量注入容器中の単位投与剤形で、または保存料を添加された多回容器に入れて提示される場合がある。薬学的組成物は、油性または水性ビヒクル中の懸濁剤、液剤、または乳剤などの形態を取る場合があり、懸濁化剤、安定化剤および／または分散剤などの製剤化剤（formulating agent）を含有する。または、本発明の薬学的組成物は、無菌固体の無菌的単離または溶液からの凍結乾燥によって得られた、使用前に適切なビヒクル、例えば無菌無発熱物質水で構成するための粉末形態でありうる。

【0105】

直腸投与に適した、担体が固体の薬学的組成物は、最も好ましくは単位用量坐剤として提示される。適切な担体には、カカオ脂および当技術分野において一般に使用されている他の物質が含まれ、坐剤は、薬学的組成物を軟化または融解した担体（１種または複数）と混合し、続いて冷却し、型に入れて成形することによって好都合に形成することができる。

【0106】

吸入による投与のために、本発明による薬学的組成物は、吹入器、ネブライザーもしくは加圧バック、またはエアロゾルスプレーを送達する他の好都合な手段から好都合に送達される。加圧バックは、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適切な気体などの適切な噴射剤を含みうる。加圧エアロゾルの場合、投薬単位は、定量を送達するためにバルブを提供することによって決定することができる。または、吸入または吹入による投与のために、本発明の薬学的組成物は、乾燥粉末組成物、例えば薬学的組成物と乳糖またはデンプンなどの適切な粉末基剤との粉末混合物の形態を取りうる。粉末組成物は、例えば、カプセルまたはカートリッジまたは例えば吸入器もしくは吹入器の助けを借りて粉末を投与することができるゼラチンもしくはプリスターバックに入れた単位投薬剤形で提示することができる。

【0107】

鼻腔内投与のために、本発明の薬学的組成物は、プラスチックボトルアトマイザーなどの液体スプレーを介して投与することができる。これらのうちMistometerg（イソプロテレノール吸入器、Wintrop）およびMedihaler（登録商標）（イソプロテレノール吸入器、Riker）が典型的である。

【0108】

アンチセンス核酸の投与のために、本発明の薬学的組成物は、リボゾーム、マイクロパーティクル、マイクロカプセル、脂質系担体システム内への被包が含まれる形態に調製することができる。本発明における使用に適する代替的な脂質系担体システムの非限定的な例には、ポリカチオンポリマー核酸複合体（例えば米国特許出願公開第20050222064号参照）、シクロデキストリンポリマー核酸複合体（例えば米国特許出願公開第20040087024号参照）、生分解性ポリ3アミノエステルポリマー核酸複合体（例えば米国特許出願公開第20040071654号参照）、pH感受性リボゾーム（例えば米国特許出願公開第20020192274号参照）、アニオン系リボゾーム（例えば米国特許出願公開第20030026831号参照）、カチオン系リボゾーム（例えば米国特

10

20

30

40

50

許出願公開第20030229040号参照)、可逆マスキリポブックス(reversibly masked lipoplex)(例えば米国特許出願公開20030180950号参照)、細胞型特異的リポゾーム(例えば米国特許出願公開20030198664号参照)、ポリマーマトリックス含有マイクロパーティクル(例えば米国特許出願公開20040142475号参照)、pH感受性リポブックス(例えば米国特許出願公開20020192275号参照)、遊離可能な親水性ポリマーで誘導体化された脂質を含有するリポゾーム(例えば米国特許出願公開第20030031704号参照)、脂質に封入された核酸(例えばPCT特許公報である国際公開公報第03/057190号参照)、脂質に被包された核酸(例えば米国特許出願公開第20030129221号参照)、ポリカチオン系ステロール誘導体核酸複合体(例えば米国特許第6,756,054号参照)、他のリポソーム組成物(例えば米国特許出願公開第20030035829号参照)、他のマイクロパーティクル組成物(例えば米国特許出願公開第20030157030号参照)、ポリブックス(例えばPCT特許公報である国際公開公報第03/066069号参照)、エマルション組成物(例えば米国特許第6,747,014号参照)、縮合核酸複合体(例えば米国特許出願公開第20050123600号参照)、他のポリカチオン系核酸複合体(例えば米国特許出願公開第20030125281号参照)、ポリビニルエーテル核酸複合体(例えば米国特許出願公開第20040156909号参照)、多環状アミジニウム核酸複合体(例えば米国特許出願公開第20030220289号参照)、ナノカプセルおよびマイクロカプセル組成物(例えばPCT特許公報である国際公開公報第02/096551号参照)、リポゾームとエマルションとの安定化混合物(例えばEP1304160参照)、ポルフィリン核酸複合体(例えば米国特許第6,620,805号参照)、脂質核酸複合体(例えば米国特許出願公開第20030203865号参照)、核酸マイクロエマルション(例えば米国特許出願公開第20050037086号参照)、カチオン脂質系組成物(例えば米国特許出願公開第20050234232号参照)が含まれる。当業者は、本発明の改変 siRNA がネイキッドな siRNA 分子としても送達できることを認識している。

【0109】

本発明の薬学的組成物は、また、着香料、着色料、抗菌剤、または保存料などの他の佐剤を含有する場合がある。

【0110】

さらに、処置への使用に必要とされる薬学的組成物の量は、選択された治療剤だけでなく、投与経路、処置される状態の性質ならびに患者の年齢および状態に応じて変動し、最終的に主治医または臨床医の判断に任されることが、認識されている。

【0111】

投与および処置方法

本発明は、また、本発明による阻害剤の治療有効量を投与することを含む、それを必要とする個体における P t d S e r 保有ウイルス感染を予防または治療するための方法に関する。

【0112】

「治療」は治療的使用(すなわち所与の疾患を有する患者に対する)を意味し、「予防」は予防的使用(すなわち所与の疾患を発生しやすい個体に対する)を意味する。用語「治療」には、疾患の完全治癒に至る治療だけでなく、疾患の進行を減速する、および/または患者の生存期間を延長する治療も含まれる。

【0113】

「有効量」は、所望の治療的または予防的結果を達成するために必要な薬用量および時間で有効な量を表す。

【0114】

本発明の阻害剤の治療有効量は、病状、年齢、性別、および個体の体重、ならびにタンパク質が所望の治療的結果を誘起する能力などの要因に応じて変動しうる。治療有効量は、阻害剤の任意の毒性作用または有害作用に治療的有益効果が勝る量を包含する。治療有

効量は、また、有益性、例えば臨床的有益性を付与するために十分な量を包含する。

【0115】

本発明に関連して、「ホスファチジルセリン保有ウイルス感染を予防する」は、PtdSer保有ウイルスの感染または宿主細胞への侵入の予防を意味しうる。

【0116】

本発明に関連して、「ホスファチジルセリン保有ウイルス感染を治療する」は、ホスファチジルセリン保有ウイルスの感染または宿主細胞への侵入を後退、軽減、または阻害することを意味しうる。

【0117】

本発明に関連して、ホスファチジルセリン保有ウイルス感染は、少なくとも30、35、40、45、50、55、60、65、70、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100%減少しうる。

10

【0118】

いくつかの態様では、本発明の方法は、上記に定義される少なくとも1種の他の抗ウイルス化合物と組み合わせて上記に定義される阻害剤を経時または同時のいずれかでの投与を含む。例えば、該少なくとも1種の他の抗ウイルス化合物は、本明細書上述に定義されるホスファチジルセリンとTIMレセプターとの間の相互作用の阻害剤である。

【0119】

別の態様では、該方法は、本発明による薬学的組成物の投与を含む。

【0120】

投与方法は全身方式でありうる。投薬様式および投与剤形は、所与の処置適用に望ましく有効な治療剤または組成物の性質に密接に関係する。適切な投与剤形および投薬経路には、非限定的に、経口、静脈内、直腸、舌下、粘膜、経鼻、眼、皮下、筋肉内、経皮、脊髄、髄腔内、関節内、動脈内、クモ膜下、気管支、およびリンパ投与、ならびに/または活性成分の全身送達のための他の投薬剤形および投与経路が含まれる。好ましい一態様では、投与剤形は非経口投与用である。

20

【0121】

投与方法は、例えば少なくとも5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100日間でありうる。

30

【0122】

用量範囲は、0.1mg/kg/日から100mg/kg/日の間でありうる。より好ましくは、用量範囲は0.5mg/kg/日から100mg/kg/日の間である。最も好ましくは、用量範囲は1mg/kg/日から80mg/kg/日の間である。最も好ましくは、用量範囲は5mg/kg/日から50mg/kg/日の間または10mg/kg/日から40mg/kg/日の間である。

【0123】

いくつかの態様では、用量は、少なくとも0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50mg/kg/日でありうる。いくつかの態様では、用量は最大で50、45、40、35、30、25、20、25、15、10、5、1、0.5、0.1mg/kg/日でありうる。

40

【0124】

用量範囲は、また、10から10000UI/kg/日の間でありうる。より好ましくは、用量範囲は50から5000UI/kg/日の間または100から1000UI/kg/日の間である。

【0125】

いくつかの態様では、用量は、少なくとも10、25、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500、10000UI/kg/日でありうる。いくつかの態様では、用

50

量は最大で10000、9500、9000、8500、8000、7500、7000、6500、6000、5500、5000、4500、4000、3500、3000、2500、2000、1500、1000、900、800、600、500、450、400、350、300、250、200、150、100UI/kg/日でありうる。

【0126】

以下の図面および実施例を参照して、これから本発明をより詳細に説明する。本明細書に引用される全ての文献および特許文書は、本明細書によって参照により組み入れられる。

【0127】

配列リスト

配列番号1にAXLに対するsiRNAの配列5'-ACAGCGAGAUUUUAUGACUA-3'を示す。

配列番号2にAXLに対するsiRNAの配列5'-GGUACCGGCUGGCGUAUCA-3'を示す。

配列番号3にAXLに対するsiRNAの配列5'-GACGAAAUCCUCUAUGUCA-3'を示す。

配列番号4にAXLに対するsiRNAの配列5'-GAAGGAGACCCGUUAUGGA-3'を示す。

配列番号5にNCBI参照配列NP__006284.2で参照されるTYRO-3レセプターのアミノ酸配列を示す。

配列番号6にNCBI参照配列NM__006293.3で参照されるTYRO-3レセプターの核酸配列を示す。

配列番号7にNCBI参照配列NP__001690.2で参照されるAXLレセプターのアミノ酸配列を示す。

配列番号8にNCBI参照配列NP__068713.2で参照されるAXLレセプターのアミノ酸配列を示す。

配列番号9にNCBI参照配列NM__021913.3で参照されるAXLレセプターの核酸配列を示す。

配列番号10にNCBI参照配列NM__001699.4で参照されるAXLレセプターの核酸配列を示す。

配列番号11にNCBI参照配列NP__006334.2で参照されるMERレセプターのアミノ酸配列を示す。

配列番号12にNCBI参照配列NM__006343.2で参照されるMERレセプターの核酸配列を示す。

配列番号13にNCBI参照配列NP__000811.1で参照されるGas6タンパク質のアミノ酸配列を示す。

配列番号14にNCBI参照配列NP__001137417.1で参照されるGas6タンパク質のアミノ酸配列を示す。

配列番号15にNCBI参照配列NP__001137418.1で参照されるGas6タンパク質のアミノ酸配列を示す。

配列番号16にNCBI参照配列NM__000820.2で参照されるGas6タンパク質の核酸配列を示す。

配列番号17にNCBI参照配列NM__001143945.1で参照されるGas6タンパク質の核酸配列を示す。

配列番号18にNCBI参照配列NM__001143946.1で参照されるGas6タンパク質核酸配列を示す。

配列番号19に変異型Gas6 Glタンパク質の配列を示す。

配列番号20にNCBI参照配列NP__001145.1で参照されるアネキシン5のアミノ酸配列を示す。

配列番号21にNCBI参照配列NM__001154.3で参照されるアネキシン5の核

10

20

30

40

50

酸配列を示す。

配列番号 22 に GenBank 番号 A A H 1 3 3 2 5 . 1 で参照される T I M - 1 レセプターのアミノ酸配列を示す。

配列番号 23 に N C B I 参照配列 N M _ 0 1 2 2 0 6 . 2 で参照される T I M - 1 レセプターの核酸配列を示す。

配列番号 24 に N C B I 参照配列 N M _ 0 0 1 0 9 9 4 1 4 . 1 で参照される T I M - 1 レセプターの核酸配列を示す。

配列番号 25 に N C B I 参照配列 N M _ 0 0 1 1 7 3 3 9 3 . 1 で参照される T I M - 1 レセプターの核酸配列を示す。

配列番号 26 に GenBank 番号 A A H 2 0 8 4 3 . 1 で参照される T I M - 3 レセプターのアミノ酸配列を示す。

配列番号 27 に GenBank 番号 A A H 6 3 4 3 1 . 1 で参照される T I M - 3 レセプターのアミノ酸配列を示す。

配列番号 28 に N C B I 参照配列 N M _ 0 3 2 7 8 2 . 4 で参照される T I M - 3 レセプターの核酸配列を示す。

配列番号 29 に N C B I 参照配列 N P _ 6 1 2 3 8 8 . 2 で参照される T I M - 4 レセプターのアミノ酸配列を示す。

配列番号 30 に N C B I 参照配列 N P _ 0 0 1 1 4 0 1 9 8 . 1 で参照される T I M - 4 レセプターのアミノ酸配列を示す。

配列番号 31 に N C B I 参照配列 N M _ 1 3 8 3 7 9 . 2 で参照される T I M - 4 レセプターの核酸配列を示す。

配列番号 32 に N C B I 参照配列 N M _ 0 0 1 1 4 6 7 2 6 . 1 で参照される T I M - 4 レセプターの核酸配列を示す。

配列番号 33 に T I M - 1 に対する s i R N A の配列 5' - A A A C U C A A C U G U U C C U A C A - 3' を示す。

配列番号 34 に T I M - 1 に対する s i R N A の配列 5' - C G G A A G G A C A C A C G C U A U A - 3' を示す。

配列番号 35 に T I M - 1 に対する s i R N A の配列 5' - G C A G A A A C C C A C C C U A C G A - 3' を示す。

配列番号 36 に T I M - 1 に対する s i R N A の配列 5' - G G U C A C G A C U A C U C C A A U U - 3' を示す。

配列番号 37 に U n i P r o t 番号 Q 9 6 D 4 2 で参照される T I M - 1 レセプターのアミノ酸配列を示す。

【図面の簡単な説明】

【0128】

【図1】 T Y R O 3 および A X L の異所性発現が D V 感染を増強する。親 2 9 3 T、T Y R O 3 発現 2 9 3 T および A X L 発現 2 9 3 T を D V 2 J A M (M O I = 1 0) と共に 3 時間インキュベーションした。48時間後に上清を収集し、C 6 / 3 6 を用いたブラークアッセイによりウイルス力価を決定し、ブラーク形成単位/ml で表現した。データは、2 回の独立した実験を代表するものである。データを平均 ± S D として示す。

【図2】 T Y R O 3 および A X L の異所性発現が D V 感染を増強する。親 2 9 3 T、T Y R O 3 発現 2 9 3 T および A X L 発現 2 9 3 T に D V 2 J A M (M O I = 1 0)、D V 2 N G C (M O I = 0 . 0 5)、D V 2 1 6 6 8 1 (M O I = 0 . 0 5)、D V 1 T V P (M O I = 5 0)、D V 3 P A H 8 8 1 (M O I = 5)、D V 4 1 0 8 6 (M O I = 5 0) を感染させた。48時間後に感染細胞のパーセントを定量した。データを平均 ± S D として示す。

【図3】 T Y R O 3 および A X L の異所性発現が D V 感染を増強する。親 2 9 3 T、T Y R O 3 発現 2 9 3 T および A X L 発現 2 9 3 T に D V 2 J A M (M O I = 1 0)、W N V (M O I = 0 . 0 0 0 8)、Y F V - 1 7 D (M O I = 0 . 0 0 5)、インフルエンザウイルス A / W S N / 3 3 株 (1 : 5 , 0 0 0) または V S V シュードタイプ化 H I V ウ

10

20

30

40

50

ウイルス粒子 (100 ng の p24) を感染させた。48 時間後に FACS によって感染を判定し、親 293T 細胞での感染に対して標準化した。データを平均 ± SD として示す。

【図 4】TYRO3 および AXL の異所性発現が DV 感染を増強する。親 HeLa 細胞、TYRO3 発現 HeLa 細胞および AXL 発現 HeLa 細胞に V3 (MOI = 30) および WNV (MOI = 0.001) を感染させ、48 時間後に 2H2 mAb または抗 WNV E タンパク質である E16 mAb を使用する FACS によって感染をスコア化した。データを平均 ± SD として示す。

【図 5】A549 の DV および WNV 感染が AXL のダウンレギュレーションによって阻害される。siRNA をトランスフェクションした A549 細胞に DV3 (MOI = 20) または WNV (MOI = 0.05) を感染させた。24 時間後に FACS によって感染細胞のパーセントを定量した。データを平均 ± SD として示す。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

【図 6】初代星状膠細胞の DV および WNV 感染が AXL のダウンレギュレーションによって阻害される。siRNA をトランスフェクションした初代星状膠細胞に DV3 (MOI = 5) または WNV (MOI = 0.0001) を感染させた。48 時間後に感染細胞のパーセントを定量した。データを平均 ± SD として示す。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

【図 7】ポリクロナル抗ヒト AXL Ab が DV 感染を阻害する。DV3 (MOI = 10) と共に 3 時間インキュベーションする間およびその 30 分前に、293T-AXL、A549 および初代星状膠細胞を対照ヤギ IgG 抗体またはヤギ抗ヒト AXL (10 µg/ml) 抗体のいずれかと共にインキュベーションした。FACS によって感染レベルを定量した。データを平均 ± SD として示す。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

【図 8】抗ヒト TYRO3 Ab および抗ヒト AXL Ab が DV 感染の初期段階を阻害する。親 293T、TYRO3 発現 293T および AXL 発現 293T に DV2-JAM (MOI = 5) を感染させた。表示の抗体 (10 µg/ml) を感染の 30 分前および感染の全体を通して添加する (-30 分) か、または感染の 2 時間後に添加した。48 時間後に FACS によって感染細胞のパーセントを定量した。データを平均 ± SD として示す。* $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

【図 9】TYRO3 および AXL が DV RNA の取り込みを増強する。親 293T、TYRO3 発現 293T および AXL 発現 293T を DV2-JAM (MOI = 20) と共に 37 °C で 4 時間インキュベーションした。DV2 のウイルス RNA レベルは、内因性対照としてのヒト GAPDH との比較 Ct 法 (Ct 法) を用いたリアルタイム定量 PCR によって決定した。結果を検量用試料値としての 293T 感染細胞での発現を用いて倍率の差として表現する。実験を 2 回繰り返し、類似の結果を得た。データを平均 ± SD として示す。* $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

【図 10】TYRO3 および AXL はクラスリン依存性経路を経由する侵入を媒介する。HeLa-TYRO3 細胞および HeLa-AXL 細胞に表示の siRNA プール (20 nM) を逆トランスフェクションし、トランスフェクションの 3 日後に DV3 (MOI = 30) を感染させた。48 時間後に FACS によって感染細胞のパーセントを定量した。データを平均 ± SD として示す。* $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

【図 11】可溶性 TYRO3 細胞外ドメインおよび可溶性 AXL 細胞外ドメインが 293T-TYRO3 および 293T-AXL の DV 感染を阻害する。DV2-JAM (MOI = 10) を IgG1-Fc (対照)、TYRO3-Fc または AXL-Fc (10 µg/ml) と共に 30 分間インキュベーションし、感染のために使用した。48 時間後に感染細胞のパーセントを FACS によって定量した。データを平均 ± SD として示す。*** $P < 0.001$ 。

【図 12】FBS 成分 (1 種または複数) がウイルス感染を増強する。異なる濃度の FBS の存在下で 293T-TYRO3、293T-AXL および 293T-DC-SIGN に DV2-JAM (MOI = 10) を感染させた。3 時間インキュベーションした後に、

10

20

30

40

50

培地を10% FBS 補充培地に交換した。48時間後に感染細胞のパーセントをFACSによって定量し、10% 感染条件に対して標準化した。データを平均±SDとして示す。

*** $P < 0.001$ 。

【図13】rmGas6がTYRO3発現細胞およびAXL発現細胞へのDVの結合を増強する。親293T、TYRO3発現293TおよびAXL発現293Tを、rmGas6 (1 µg/ml) を含有する無血清培地または等体積のPBS (モック) 中でDV3 (MOI = 30) と共に48時間インキュベーションした。平均蛍光強度をFACSにより測定し、非感染細胞でのMFIに対して標準化した。データを平均±SDとして示す。

*** $P < 0.001$ 。

【図14】rmGas6がTYRO3およびAXLによって媒介されるDV感染を増強する。293T-TYRO3および293T-AXLを、rmGas6 (1 µg/ml) を含有する無血清培地または等体積のPBS (モック) 中でDV2 JAM (MOI = 5) と共にインキュベーションした。3時間インキュベーション後に、培地を10% FBS 補充培地に交換した。48時間後に感染細胞のパーセントをFACSによって定量し、rmGas6の不在下での感染に対して標準化した。データを平均±SDとして示す。

*** $P < 0.001$ 。

【図15】rmGas6がそのG1aドメインを介してDVと相互作用する。被覆されたDV2 JAM (10⁷ FIU) をrmGas6またはrmGas6 G1a (2 µg/ml) と共に1時間インキュベーションした。結合したGas6は、ヤギポリクローナル抗Gas6 (10 µg/ml) およびHRPコンジュゲーション型ロバ抗ヤギIgGを使用するELISAによって検出した。データを平均±SDとして示す。

*** $P < 0.001$ 。

【図16】アネキシンVがDV感染のTAM媒介性増強を阻害する。無血清培地中でDV2 JAM (MOI = 5) をアネキシンV (25 µg/ml) と共にインキュベーションし、TYRO3発現細胞、AXL発現細胞およびDC-SIGN発現細胞に感染させるために使用した。48時間後に感染細胞のパーセントをFACSによって定量し、アネキシンVの不在下での感染に対して標準化した。データを平均±SDとして示す。

*** $P < 0.001$ 。

【図17】Gas6 G1aがDVをTYRO3およびAXLに架橋しない。被覆されたDV2 JAM粒子 (10⁷ FIU) を、rmGas6 (2 µg/ml) の存在下または不在下で表示のヒトFc-キメラ (2 µg/ml) と共にインキュベーションした。HRPコンジュゲーション型ウサギ抗ヒトIgGを使用して結合型Fc-キメラを検出した。データを平均±SDとして示す。

** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

【図18】Gas6 G1aがTYRO3およびAXLによって媒介されるDV感染増強を阻害する。細胞をDV2 JAM (MOI = 5) と共に3時間インキュベーションする30分前およびインキュベーションする全体にわたり、rmGas6 (10 µg/ml) またはrmGas6 (1 µg/ml) と共にインキュベーションした。48時間後に感染細胞のパーセントを定量した。データを平均±SDとして示す。

** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

【図19】Gas6 G1aがTAM発現CHO-745細胞へのDV-3結合を阻害する。データを平均±SDとして示す。

** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

【図20】DVのGas6媒介性結合の図式モデルおよび感染増強の可能なメカニズムを示す図である。Gas6は、DVウイルスエンベロップ上に露出したPtD SerにG1aドメインを介して、およびTAMレセプターにC末端SHGB様ドメインを介して、同時に結合することによって架橋分子として機能する。DV-Gas6複合体は「スーパー」TAMレセプターアゴニストとして作用することができ、自然免疫の阻害またはウイルスの内部移行を増強するエンドサイトーシスエフェクターの動員のいずれかを招くシグナル伝達カスケードをトリガーする。第二に、TAMレセプターは付着因子 (attachment factor) として作用することができ、DV濃度を局所的に増加させてEタンパク質とウイルス真性 (bona fide) レセプター (1種または複数) との相互作用を促進する。最後に、DV-Gas6は、また、TYRO3またはAXLとのヘテロタイプ二量体化によりウ

10

20

30

40

50

イルス真性レセプターのリクルートメントを誘導することができ、それによってDV粒子のクラスリン媒介性エンドサイトーシスに必要な三量体性侵入複合体を形成する。

【図21】TIMレセプターがフラビウイルス感染を媒介する。TIMレセプターは、DV2-JAM、ウエストナイルウイルスおよび黄熱ウイルスにより利用される。親293T細胞およびTIMレセプターを発現している293T細胞にDV2-JAM、WNV (Israeli IS_98-STI株)、黄熱ウイルスワクチン株 (YFV-17D) および単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1) を感染させた。2日後に特異的抗体を使用するフローサイトメトリーによってウイルス感染を定量した。データは、少なくとも3回の独立した実験の平均±SEMである。

【図22】TYRO3およびAXLがDVおよび他のフラビウイルスによる感染を増強する。親293T、TYRO3発現293TおよびAXL発現293TをDV2-Jam、WNV、YFV-17DおよびHSV-1で攻撃した。24時間後にフローサイトメトリーによって感染を評価した。データを3回の独立した二つ組の実験からの平均±SEMとして表す。

【図23】TIM-1およびTIM-4の異所性発現がチクングニヤによる感染を増強する。TIM1発現293T細胞、TIM4発現293T細胞および親293T細胞にチクングニヤ (Chick) を感染させた。48時間後にE2エンベローブ糖タンパク質に対するマウスモノクローナル抗体 (3E4) を使用するフローサイトメトリーによって感染を定量した。

【図24】TYRO3およびAXLの異所性発現がチクングニヤによる感染を増強する。TYRO発現293T細胞、AXL発現293T細胞および親293T細胞にチクングニヤ (Chik) を感染させた。48時間後にE2エンベローブ糖タンパク質に対するマウスモノクローナル抗体 (3E4) を使用するフローサイトメトリーによって感染を定量した。

【図25】内因性TIM-1分子および内因性AXL分子がDV感染を媒介する。抗TIM-1 IgG、抗AXL IgGまたは対照IgGの存在下でA549細胞に表示のDV株またはHSV-1を感染させた。24時間後にフローサイトメトリーによって感染のレベルを定量し、対照IgGの存在下での感染に対して標準化した。データは少なくとも3回の独立した実験の平均±SDである。* * $p < 0.001$ 、* * * $p < 0.0001$ 。

【図26】内因性TIM-1分子および内因性AXL分子がDV感染を媒介する。表示のAbの存在下でのDV2-JAM感染A549の代表的な免疫蛍光分析。緑色：抗PrM 2H2、青色：DAPI。スケールバー：100 μm。データは少なくとも3回の独立した実験の平均±SDである。* * $p < 0.001$ 、* * * $p < 0.0001$ 。

【図27】内因性TIM-1および内因性AXLがDV感染を媒介する。A549細胞にDV3-PAH881 (MOI = 10) を感染させた。感染前に、細胞を表示の抗TIM-1ポリクローナル抗体と抗AXLポリクローナル抗体との組み合わせと共にインキュベーションした。24時間後にフローサイトメトリーによって感染レベルを定量し、IgG対照抗体の存在下での感染レベルに対して標準化した。3回の独立した二つ組の実験からの平均±SDを示す。

【0129】

実施例

材料および方法

cDNAライブラリーのスクリーニング

cDNAの選別のために、バイオインフォマティクスアプローチに基づき、アレイ化された全長cDNAライブラリーから推定上の細胞レセプターをコードする1728種の遺伝子を選択した (Porcel et al., 2004, Genome Res, 14:463-471)。第1ラウンドについて、リポフェクタミンLTX (Life Technologies, Carlsbad, CA) を製造業者の説明書により使用して、個別のcDNA (1 μg) 8種のプール216個を293T細胞に一過性トランスフェクションした (24ウェルプレートの形式)。陽性対照として、等しい量のDC-SIGN cDNA希釈物 (空のプラスミドの1/8) をトランスフェクションした。陰性対照として空のプラスミドを使用した。トランスフェクションの24時間後

10

20

30

40

50

に、異所性発現したDC-SIGNの免疫染色によりトランスフェクション効率を評価した。次に、トランスフェクション後の293T細胞をDV2-JAM初代株(MOI=2)と共に48時間インキュベーションし、感染細胞のパーセントをフローサイトメトリーによって測定した。第2ラウンドでは、各陽性cDNAプールおよび対応する個別のcDNA8種(600ng)を293T細胞にトランスフェクションし、DV2-JAMを感染させて個別の陽性cDNAを特定した。

【0130】

EliSa結合アッセイ

96ウェルMaxisorp NUNC-IMMUNOプレート(NUNC, Roskilde, Denmark)に二つ組でDVウイルス粒子(10^7 FIU)を4で一晚被覆した。37のPBSCaCl₂/MgCl₂中に入れた2%のBSAで1時間ブロッキング後、0.05% Tweenおよび10mM CaCl₂を補充したTBS中でウェルをrGas6タンパク質(2μg/ml)と共に37で1時間インキュベーションした。ウェルを徹底的に洗浄し、結合しているGas6タンパク質をヤギ抗Gas6ポリクローナルAbでラベルし、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)コンジュゲーション型ロバ抗ヤギIgG抗体(Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany)(1:2, 000希釈)およびo-フェニレンジアミン二塩酸塩(OPD)(Thermo scientific)基質を用いて検出した。架橋実験のために、Fc-キメラタンパク質(2μg/ml)のインキュベーションの間にrGas6タンパク質(2μg/ml)を同時に添加した。ウェルを徹底的に洗浄し、結合しているFc-キメラを、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)コンジュゲーション型ウサギ抗ヒトIgG抗体(Dako)(1:1, 000希釈)およびOPDを用いて検出した。

10

20

【0131】

細胞結合アッセイ

1%BSAまたは5%FBSを含有する結合緩衝液(0.05%NaN₃を補充したDMEM)中で、TYRO3、AXLおよびDC-SIGNを発現している293T細胞およびCHO745細胞(4×10^5 個)を表示のMOIのDVと共に4で90分間インキュベーションした。293Tについて、細胞をヘパリン100Uと共に室温で30分間インキュベーションし、その後ウイルスと共にインキュベーションした。細胞を冷結合緩衝液で2回、冷無血清DMEM培地で1回洗浄し、PBSPFA2%中に入れて4で20分間固定した。細胞表面に吸収されたDV粒子を抗汎フラビウイルスエンベロップ抗体(4G2, 5μg/ml)で染色し、前述のようにフローサイトメトリーによって分析した(Fernandez-Garcia et al., 2011, J Virol, 85:2980-2989)。結合増強・阻害アッセイでは、細胞をウイルスおよびrGas6(10μg/ml)と共に同時インキュベーションした。

30

【0132】

ウイルスおよび細胞

限られた細胞継代をされた後の蚊(Aedes pseudoscutellaris)AP61細胞単層中でDV-1-TVF株、DV2-JAM株(Jamaica)、DV2-ニューギニアC株、DV2-16881株、DV3-PAH881株(Thailand)およびDV4-1086株を増殖させた。注目すべきことに、哺乳動物細胞中で産生されたDVは、昆虫細胞起源のウイルスと類似の結果を与えた。ウイルス力価はC6/36細胞を用いたフローサイトメトリー分析(FACS)によって評価し、FACS感染単位(FIU)として表現した。HEK293T、A549、VERO、およびHuH7.5.1細胞(贈与:C.Rice, New York, USA)を、10%FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシンを補充したDMEM中で維持した。

40

【0133】

上記の蚊(Aedes pseudoscutellaris)AP61細胞単層中でDV2-JAM(Jamaica)およびWNV(Israeli IS-98-STI株を増殖させた。YFV(YFV D17株)を成長させ、Verocellで力価決定した。HSV-1(F)を増殖させ、他に記載されたようにVerocellで力価決定した(Taddeo et al. 2004)。チクングニヤ(CH

50

I K V - 2 1 株) を昆虫細胞 C 6 / 3 6 中で成長させた。

【 0 1 3 4 】

フローサイトメトリー分析

冷 P B S 中に入れた 0 . 0 2 % N a N 3 および 5 % F B S の存在下で、以下の従来プロトコールによりフローサイトメトリー分析を行った。感染アッセイのために、感染細胞を 2 % (v/v) パラホルムアルデヒド (P F A) 加 P B S で固定し、0 . 5 % (w/v) サポニンで透過処理し、続いて D V p r M を検出するマウス 2 H 2 m A b (2 μg/ml) または非構造タンパク質 - 1 を検出するマウス N S 1 m A b (1 μg/ml) を用いて染色した。抗 I C P 4 マウス m A b (クローン 1 0 F 1 、 0 . 3 μg/ml ; Santa Cruz Biotechnology) を用いて H S V - 1 感染を検出した。W N V 、 Y F V およびチクングニヤ感染を抗タンパク質 E 抗体 (4 G 2) および E 2 エンベロープ糖タンパク質に対するマウスモノクローナル抗体 (3 E 4) で検出した。4 5 分後に、一次抗体をポリクローナルヤギ抗マウス免疫グロブリン / R P E (DakoCytomation) でラベルした。最後に、感染細胞のパーセンテージを、CellQuestソフトウェアを備える L S R (Becton Dickinson) を用いるフローサイトメトリーによって評価した。FlowJoソフトウェア (Tree Star) を使用することによってデータを解析した。

10

【 0 1 3 5 】

統計解析

グラフ表示、統計解析およびカーブフィッティングはPrism5ソフトウェア (GraphPad software, San Diego, CA) を使用して行った。特に述べない限り、全ての結果を 3 回の独立した実験の平均 ± 標準偏差 (S D) として示す。対応のある両側 t 検定を用いて、有意性について結果を検定した。

20

【 0 1 3 6 】

結果

c D N A 選別は D V 2 感染を増強する細胞表面レセプターとして T Y R O 3 および A X L を特定する

新しい D V 侵入レセプター (1 種または複数) を特定しようとして、低感受性細胞系 2 9 3 T を D V 2 株 J A M に感染可能にするヒト遺伝子についての機能獲得 c D N A 選別を実施した。このために、配列データベース (Swiss Prot、Uniprot、Human Protein Reference Database) と、約 1 0 0 0 0 種の c D N A から成るアレイ化された c D N A ライブラリーから選択された、細胞膜レセプターをコードする 1 7 2 8 種の全長 c D N A を、C M V が駆動する発現ベクター p C M V S P O R T 6 にクローニングしたものとを使用した。第 1 ラウンドのスクリーニングで、8 種の c D N A のプール 2 1 6 個を 2 9 3 T 細胞にトランスフェクションした。高い感染多重度 (M O I) であってもわずかな感染細胞しか観察されなかったため、2 9 3 T は蚊由来 D V 初代株による感染に低感受性であることが以前に示されている。しかし、C 型レクチンレセプター D C - S I G N をトランスフェクションされたこれらの細胞から感染性粒子が効率的に回収されたため、ウイルス複製段階、粒子集合段階または放出段階ではなくウイルス侵入段階で制限が起こることが示された。次に、トランスフェクション後の細胞を、蚊の中で成長した D V 2 J A M 粒子 (M O I = 2) で攻撃した。2 日後に、D V p r M タンパク質を認識する 2 H 2 m A b を使用する F A C S によって感染をスコア化した。2 9 3 T 細胞を p r M タンパク質細胞内染色に陽性にした c D N A のプールを第 2 ラウンドのスクリーニングに入れ、第 2 ラウンドのスクリーニングでは各プールを構成している単一の c D N A を個別に検査した。この選別の結果として、3 種の主要タンパク質、すなわち D V の侵入を媒介することが以前から分かっている C 型レクチンレセプターである L - S I G N 、 T Y R O 3 および A X L を特定した。T Y R O 3 および A X L は、天然リガンドである成長停止特異的タンパク質 6 (Growth-arrest-specific 6) (G a s 6) およびプロテイン S (P r o S) が結合すると活性化されるチロシンキナーゼ分子群である T A M (T Y R O 3 / A X L / M E R) レセプターファミリーの 2 メンバーである。T A M レセプターは、細胞外ドメインリガンド結合ドメイン (2 個の免疫グロブリン様リピートおよび 2 個のフィブロネクチン I I I 型リピ

30

40

50

ートを含む)、1回膜貫通ドメイン、およびキナーゼ活性を担う細胞質ドメインを共有する。それらは広く発現され、細胞トランスフォーメーション、食作用、アポトーシス細胞体の浄化および自然免疫に関与する多様なシグナル伝達カスケードをレギュレーションする。興味深いことに、TAMレセプターファミリーの1メンバーであるAXLがエボラウイルスおよびワクシニアウイルス感染を容易にすることが見いだされた。

【0137】

TYRO3およびAXLの異所性発現は標的細胞のDV1~DV4感染を増強する

TAMレセプターファミリーの第3のメンバーであるMERでDV2 JAMの感染性の増強は検出されなかった。したがって、研究をTYRO3およびAXLに集中させた。次に、TYRO3を非常に低レベル発現し、AXLの発現を欠如している293T細胞に、ヒトTYRO3またはAXLをコードするレンチウイルスベクターをトランスダクションした。細胞を特異的mAbで染色し、高レベルの表面発現についてソーティングした。免疫蛍光研究から、293T-TYRO3細胞または293T-AXL細胞のDV2 JAM感染が、親293T細胞に比べてp r Mタンパク質の細胞内産生の顕著な増加を招いたことが示された。これに一致して、活動的複製時のみに産生されるDVの非構造タンパク質であるNS1の発現のFACS分析から、DV2 JAMで攻撃された293T-TYRO3細胞および293T-AXL細胞は増殖性感染することが実証された。異所性AXL発現または異所性TYRO3発現は、293T細胞のDV2感染をそれぞれ20倍および50倍に増強する。DV2 JAMで攻撃された細胞から回収された無細胞上清の力価決定から、TYRO3発現細胞およびAXL発現細胞が親対応物よりも大量の感染性ウイルス粒子を放出したことが示された(図1)。

【0138】

次に、TYRO3およびAXLが4種のDV血清型のいずれかによるヒト細胞の感染を容易にするかどうかを検査した。293T-TYRO3細胞、293T-AXL細胞および293T細胞にDV1~DV4株のパネルを感染させた。48時間後に、細胞を2H2 mAbで染色し、FACSによって分析した。実験室適応株DV2 NGCまたは16881、および初代DV1、DV3およびDV4株による感染は、TYRO3またはAXLのいずれかによって有意に増強された(図2)。したがって、TYRO3およびAXLの異所性発現は、4種のDV血清型の感染を増強する。

【0139】

次に、フラビウイルス属の他のメンバーであるWNVおよびYFV-17D、ならびにインフルエンザ(Flu)および水疱性口内炎ウイルスGタンパク質を担持するHIVシールドパーティクル(VSVpp)などの他のエンベロープウイルスを検査することによって、TYRO3およびAXLが媒介する感染性増強の特異性を調査した。TYRO3およびAXLは、WNV感染を強く増強し、より少ない程度にYFV-17D感染を増強した。対照的に、FluおよびVSVppではウイルス感染性の増強が起こらなかった(図3)。したがって、TYRO3およびAXLは異なる病原性フラビウイルスによって感染のために活用されている。

【0140】

TAMレセプターの発現が他のヒト細胞系をDV感染に感受性にするかどうかを判定するために、TYRO3またはAXLを安定的に発現しているHeLa細胞を発生させた。親HeLa細胞はDV3粒子に低感受性であるが、TYRO3またはAXLの異所性発現後に効率的な感染が起こった(図4)。WNVで類似の結果が得られた(図4)。さらに、内因性AXLを発現するマクロファージ様系統であるCHME細胞へのTYRO3の付加はDV感染を強く増強する。したがって、少なくとも3種のヒト細胞系統へのTYRO3またはAXLの付加は、DV感染を増強する。

【0141】

TAMレセプターのサイレンシングまたは阻害は許容性細胞におけるDV感染を減少させる

フローサイトメトリー実験から、DV感染に感受性のある広範囲のヒト細胞からAXL

10

20

30

40

50

の発現が検出されたことが示された。A X LはA 5 4 9細胞および初代ヒト星状膠細胞（*in vivo*でD Vの重要な標的であると提唱されている）中に特に豊富である。対照的に、T Y R O 3は全ての被験細胞から検出可能に発現されているわけではなかった。次に、D VがA 5 4 9細胞および初代ヒト星状膠細胞において内因性A X Lを利用するかどうかを研究した。このために、フローサイトメトリーによって決定される内因性A X Lの発現を、両細胞型においてs i R N Aによってダウンレギュレーションした。A X Lがサイレンシングされた細胞では、無関係のs i R N Aを受け取った細胞に比べてD V 3感染およびW N V感染に対する感受性が有意に低下した。フラビウイルスのp H依存性融合に必要な液胞A T P a s eのサブユニットであるA T P 6 V 1 B 2のサイレンシングは、A X L s i R N Aと同じように効率的にD V 3感染およびW N V感染を障害した（図5および6）。D V 2 J A Mで類似の結果が得られた。次に、A X Lエクトドメインに対する抗体がD V感染を障害する能力を研究した。抗A X L A bを用いた2 9 3 T - A X L、A 5 4 9または初代星状膠細胞の前処理は、D V 3感染およびD V 2感染を有意に障害した一方で、対照A bは作用を有さなかった（図7）。同様に、抗T Y R O 3 A bは2 9 3 T - T Y R O 3細胞のD V感染を障害した（図8）。まとめると、これらの結果は、A X Lの細胞表面発現が最適なD V感染に必要であることを示している。

10

【0142】

T Y R O 3レセプターおよびA X LレセプターはD Vの内部移行を増強する

最初に、D Vの生活環のどの段階でT Y R O 3およびA X Lが作用するかを決定するために、抗T A M A bを様々な時点で添加したときに抗T A M A bがD V感染を障害する能力を検討した（図8）。抗T Y R O 3 A bおよび抗A X L A bは、ウイルス攻撃の30分前にそれぞれ2 9 3 T - T Y R O 3または2 9 3 T - A X Lと共にインキュベーションしたとき、D V感染を強く障害した（図8）。A bは感染の2時間後に添加したときにその中和能を失った（図8）が、これは、T A MレセプターがD Vの生活環の初期段階で作用することを示唆している。次に、T Y R O 3およびA X LがD Vの内部移行を促進するかどうかを研究した。D V 2 J A MでT Y R O 3発現細胞およびA X L発現細胞を37で4時間攻撃した。総R N Aを抽出し、ウイルスR N Aレベルをq P C Rにより定量した（図9）。T A Mレセプターは、2 9 3 T細胞へのD V R N Aの取り込みを強く増加させた（T Y R O 3およびA X Lで、それぞれ30倍および10倍に増強）（図9）。第2のアプローチでは、細胞表面へパラン硫酸を欠如するC H O - 7 4 5細胞内でT Y R O 3およびA X Lを発現させた。T A M発現細胞、または対照としてのD C - S I G N C H O - 7 4 5細胞をD V 2 J A M粒子と共に47で1時間インキュベーションし、37で45分間に変えてエンドサイトーシスさせた。抗D V E m A bである4 G 2を使用する蛍光顕微鏡法によりウイルスの取り込みをモニターした。D C - S I G Nと同様に、T Y R O 3またはA X Lを発現している細胞中にD V Eタンパク質の強い細胞内蓄積を見いだした。したがって、T Y R O 3またはA X Lが発現すると、D V粒子は標的細胞に効率的に内部移行される。これらの結果は、T A MレセプターであるT Y R O 3およびA X LがD Vに対する新規な細胞侵入補助因子であることを示している。

20

30

【0143】

次に、T A M発現細胞へのD V侵入が機能的なクラスリン依存性エンドサイトーシス経路を必要とするかどうかを研究した。T Y R O 3またはA X Lを発現しているH e L a細胞に、被覆ピット形成を促進する細胞因子であるクラスリン重鎖（C H C）をターゲティングするs i R N Aをトランスフェクションした。W Bおよび機能的アッセイによりサイレンシングを検証し、前記のようなトランスフェリンのクラスリン媒介性取り込みの障害を実証した。C H Cのサイレンシングは、T Y R O 3発現細胞およびA X L発現細胞のD V感染を強力に障害した（図10）。陽性対照としてのA T P 6 V 1 B 2サイレンシングもD V感染を遮断した。まとめると、これらの結果からT A M媒介性のD V侵入増強がp H依存性であり、クラスリン経路を必要とすることが示された。

40

【0144】

可溶性G a s 6はD Vエンベロープ上に発現されたP d t S e rと相互作用し、ウイルス

50

粒子をTYRO3およびAXLに架橋する

TYRO3およびAXLがDV侵入を増強するメカニズムを解明するために、可溶性キメラTYRO3-Fc分子および可溶性キメラAXL-Fc分子を用いて阻害感染アッセイを行った。親293T-TYRO3細胞および親293T-AXL細胞に、TYRO3-Fc分子、AXL-Fc分子または対照Fc分子と共に予備インキュベーションしたDV2JAM粒子を感染させた(図11)。DV感染は可溶性TYRO3-Fcまたは可溶性AXL-Fcによって顕著に遮断されたが、これはDVビリオンがTAMレセプターに結合することを示唆している。しかし、可溶性TYRO3-Fcまたは可溶性AXL-Fcを使用するプルダウン実験では、インタクトなDV粒子からDV-Eタンパク質を免疫沈降することができなかった。これは、TYRO3またはAXLのエクトドメインがDVと直接には相互作用しないことを示している。TAMレセプターがDVとどのように結合するかをさらに研究するために、高レベル(約300nM)のTAMリガンドProSを含有するウシ胎児血清(FBS)の存在下または不在下でウイルス付着アッセイを行った。5%FBSの存在下または不在下で親293T細胞、TYRO3 293T細胞、AXL 293T細胞をDV粒子と共に4でインキュベーションした。細胞表面に結合しているDV粒子は、抗Eタンパク質4G2 mAbを使用するFACSによって検出した。TYRO3およびAXLへのウイルス結合の顕著な増加は、FBSの存在下でのみ検出された。TYRO3またはAXLがCHO745細胞上に発現しているとき、および様々なDV株を用いた場合に、類似の結果が得られた。FBSの存在下で、TAM陽性細胞へのDVの結合は特異的であった。というのは、抗TYRO3 Abまたは抗AXL Abによって結合が阻害されたからである。重要なことに、FBSの不在下で感染を行うと、DVに対するTAMの効果は打ち消された(図12)。FBS濃度を10%に増加させると、DC-SIGN発現細胞ではなく、TYRO3またはAXL発現細胞のDV感染が増強された(図12)。まとめると、これらのデータは、FBSの因子がTAMレセプターへのDVの結合を容易にしてウイルス侵入を増強しうること示している。

【0145】

TAMレセプターへのDVの結合が全長マウスGas6(rmGas6)によってモデュレーションされるかどうかを研究した。モック対照ではなくmGas6と共にウイルス粒子を予備インキュベーションしたとき、TYRO3発現細胞およびAXL発現細胞へのDVの結合は、有意に増加した(図13)。これに一致して、全長rmGas6は、対照細胞ではなくTYRO3発現細胞およびAXL発現細胞のDV感染を強烈にブーストした(図14)。ヒト全長Gas-6を使用して類似の結果が得られた。これにより、DVと複合体を形成したGas6がTAMレセプターと相互作用してDVの侵入を増強することが強く示唆された。Gas6がDVビリオン上に発現されたPdtSerを認識するかどうかを知るために、ウェル上に被覆されたDVを様々なGas6分子と共にインキュベーションするELISAアッセイを行った(図15)。全長Gas6はDV粒子と効率的に結合した。対照的に、N末端Glドメインを欠如することでPdtSerと結合できないGas6分子(rmGas6-Gla)は、DV粒子と相互作用する能力が障害していた。

【0146】

次に、DV粒子上に発現されたPdtSerがTAM陽性細胞の感染に必要なかどうかを研究した。TYRO3細胞およびAXL細胞に、文書により十分に立証されたPdtSer結合タンパク質であるアネキシンV(ANX5)と共に予備インキュベーションされたDVを感染させた。ANX5はDC-SIGNを介したDV侵入に効果をもたない。対照的に、ANX5は、FBS中で培養されたTYRO3またはAXLを発現する293T細胞のDV感染を、おそらくPdtSerへのアクセスを遮断することによって有意に阻害した(図16)。まとめると、これらの結果からGas6がDV侵入を増強したことが示された。この分子は、DVビリオン上に露出したPdtSerをTAMレセプターTYRO3およびAXLに架橋することによって作用する。

【0147】

10

20

30

40

50

D V 粒子を T Y R O 3 および A X L に架橋することができない G a s 6 分子の抗ウイルス活性

次に、全長 m G a s 6 および G l a ドメインを欠如する市販の G a s 6 誘導体 (r m G a s 6 G l a) が T Y R O 3 発現細胞および A X L 発現細胞の D V 結合および感染をモデュレーションする能力を比較した。2 種の G a s 6 タンパク質が D V を T Y R O 3 および A X L に架橋する能力を検査した。E L I S A プレート上に被覆された D V 粒子を、G a s 6 分子の存在下で可溶性 T Y R O 3 - F c 、可溶性 A X L - F c または対照としての無関係な F c 分子と共にインキュベーションした。このアッセイでは、全長 r m G a s 6 は D V 架橋活性を示したが、これは r m G a s 6 G l a および驚くことに r h G a s 6 にはあてはまらなかった (図 1 7)。対照として検査した G a s 6 分子のどれも D C - S I G N - F c への D V の結合をモデュレーションしなかった。F B S の存在下であっても全長 r m G a s 6 が D V 感染を増強したことが観察された (図 1 8)。これは、ほとんど全てが可溶性 A x l エクトドメインと複合体を形成している非常に低血清濃度の G a s 6 (0 . 2 ~ 0 . 5 n M) の結果に一致する。興味深いことに、T Y R O 3 発現 2 9 3 T 細胞または A X L 発現 2 9 3 T 細胞を r m G a s 6 G l a で前処理すると D V 2 感染の増強が打ち消された (図 1 8)。これらの結合実験から、r m G a s 6 G l a による T A M レセプター媒介感染の阻害が、この分子が T A M 発現 C H O 7 4 5 細胞への D V 3 の結合を遮断する能力と相関したことが示された (図 1 9)。まとめると、これらの結果は、D V を T A M レセプターに付着させることができない G a s 6 分子が抗ウイルス化合物として機能することを示している。

10

20

【 0 1 4 8 】

T I M レセプターおよび T A M レセプターは他のフラビウイルスによる感染を媒介する

T I M レセプターおよび T A M レセプターが他のウイルス種による感染を媒介するかどうかを判定するために、T I M - 1 発現細胞および T I M - 4 発現細胞を D V 2 - J a m ウエストナイルウイルス (W N V)、黄熱ウイルスワクチン株 (Y F V - 1 7 D)、および単純ヘルペスウイルス 1 型 (H S V - 1) で攻撃した。特異的抗体を使用するフローサイトメトリーによってウイルス感染を定量した (図 2 1)。データは、T I M - 1 および T I M - 4 が W N V 感染を大きく増強し、Y F V - 1 7 D に対する感受性をわずかにアップレギュレーションしたが、H S V - 1 に効果をもたなかったことを示している。T Y R O 3 発現細胞および A X L 発現細胞について類似の結果が得られた (図 2 2)。まとめると、これらのデータは、P t d S e r レセプターである T I M および T A M が両方ともフラビウイルス感染を促進する細胞因子であることを示している。

30

【 0 1 4 9 】

T I M および T A M の異所性発現はチクングニヤによる感染を増強する

さらに、このメカニズムが、膜内に P t d S e r を発現するまたは組み入れているウイルスによって活用される一般メカニズムを表すかどうかに関心がもたれた。親 2 9 3 T 細胞、T I M - 1 発現 2 9 3 T 細胞および T I M - 4 発現 2 9 3 T 細胞にチクングニヤ (C h i c k) を感染させた。4 8 時間後に E 2 エンベロープ糖タンパク質に対するマウスモノクローナル抗体 (3 E 4) を使用するフローサイトメトリーによって感染を定量した。結果 (図 2 3) は、T I M - 1 および T I M - 4 がチクングニヤ感染を大きく増強することを示している。T Y R O 3 発現細胞および A X L 発現細胞について類似の結果が得られたが、それらの異所性発現は同様にチクングニヤ感染を増強する (図 2 4)。

40

【 0 1 5 0 】

これらのデータは、T I M および T A M のウイルス感染助長が、膜に P t d S e r を発現または組み入れているウイルスによって最適な感染のために活用される一般メカニズムを表すことを示している。

【 0 1 5 1 】

内因性 T I M - 1 分子および内因性 A X L 分子は D V 感染を媒介する

A 5 4 9 細胞系は T I M - 1 および A X L の両方を発現する。D V 2 感染は、単独で投与された抗 T I M - 1 A b または抗 A X L A b で部分的に減少するが、これら 2 種の A

50

bの組み合わせは、HSV-1感染ではなくDV2感染(図25および26)、DV3感染(図27)を完全に阻害した。TIM-1およびAXLを発現しているVero細胞で類似の結果が得られた。これらの結果は、TIMレセプターおよびTAMレセプターが自然に協同してDV感染を促進すること、ならびにそれらのレセプターを内因性発現している細胞においてPtdSerが感染を媒介していることを示している。

【0152】

考察

本研究は、DV侵入のための分子メカニズムおよび細胞要件に重要な洞察を加えるものである。機能獲得cDNAスクリーニングを用いて、本発明者らは新規なDV侵入補助因子としてTYRO3およびAXLを特定した。TYRO3およびAXLは、MERと共にTAMファミリーのレセプター型チロシンキナーゼ(RTK)を構成し、このファミリーは、興味をそそる過程の混合をレギュレーションし、アポトーシス細胞の食作用に不可欠である。TYRO3およびAXLは、DVビリオンを宿主細胞に架橋しウイルスの内部移行を増強する天然リガンドであるGas6およびProSを介してウイルスエンベロープ上に露出しているPdtSerを認識する。したがって、これらの結果は、DVが、アポトーシス細胞体の浄化に関与する宿主レセプターをその感染性侵入のために操ることを示しており、DVが、ヒト宿主において増殖性感染を確実に確立できるように複数の細胞レセプター系を活用することを示唆している。

【0153】

本研究により、DV粒子がTAMレセプターと直接には相互作用しないことが実証された。それどころか、TYRO3発現細胞およびAXL発現細胞でのDV感染および吸収の増強は、血清の存在にほぼ完全に依存した。血清は、血漿中にそれぞれ0.25nMおよび350nMの生理学的濃度で存在するビタミンK依存性タンパク質Gas6および近縁の抗凝固因子プロテインSである2種のTAMレセプターリガンドを含有する。両方の分子は、アポトーシス細胞をTAMレセプターに架橋することを担っており、Gas6は、最近、AXLにより媒介されるレンチウイルスシュードタイプウイルスのトランスダクションを増強すると報告された。興味深いことに、FBS存在下のこれらの結果に類似して、Gas6は血清の不在下でTAM発現細胞でのDVの感染および吸収を増強した。それどころか、GLドメインを欠如するGas6は、血清の存在下で感染およびTAMレセプターの結合を低下させた。これらの実験は、血清中に存在する成分が類似のメカニズムを利用し、Gas6と共通または重複するTAMレセプタードメインに結合することを示唆している。したがって、血清中に存在するGas6および/またはProSは、そのGLドメインを介してウイルスに付着すると、同時にそのSHBGドメインを介してTAMレセプターに結合する可能性がある。本発明者らの観察から、フラビウイルスと細胞レセプターとの相互作用が架橋分子を必要とするという新しい証拠が挙げられ、蚊細胞レセプターmosPTP-1へのWNVの間接結合に関する最近の研究が補強された。WNVの場合、可溶性C型レクチンmosGCTL-1はWNVエンベロープタンパク質をmosPTP-1に架橋し、続いて感染を容易にした。

【0154】

いくつかの証拠は、観察されたFBSの効果が確かにGas6よりもProSによるものであると示唆している。第1に、Gas6の血漿中濃度は非常に低く、ほぼ全てのGas6が可溶性AXLエクストドメイン(sAXL)と複合体を形成している。一方、ProS濃度は非常に高く、ProSの60%だけがC4BP(C4b結合タンパク質)と複合体を形成している。第2に、Gas6はin vitroで3種のTAMレセプター全てに結合し(AXL TYRO3 MER)、実際に図11~16に認められるように、Gas6はTYRO3発現細胞およびAXL発現細胞へのDV結合を同様に増強した。対照的に、ProSはAXLよりもTYRO3に対して強力なin vitroリガンドであり、それは、FBSがTYRO3発現細胞への、そしてより低い程度にAXL発現細胞への、DVの結合を強く増強することに一致する。

【0155】

G a s 6 およびプロテイン S の架橋活性が G l a ドメインとウイルス粒子との相互作用を示唆したので、本発明者らは、P t d S e r 残基が D V ウイルスエンベロープ上に露出しているという仮説を立てた。実際に、本明細書記載の E L I S A 実験から、G a s 6 の G l a ドメインがウイルスと結合すること、およびウイルス粒子を結合タンパク質アネキシン V と共に予備インキュベーションすることにより血清の増強作用が競合的に消失することを明らかにした。興味深いことに、P t d S e r はいくつかのエンベロープビリオン上に露出しているように見え、以前の刊行物から、アネキシン V が H I V - 1、ワクシニアウイルス、C M V、H S V - 1 および H S V - 2 に結合することが示された。D V は、D V の生活環に一致して、小胞体 (E R) の内腔に出芽した間に P t d S e r を獲得したと推定される。細胞膜および E R の 2 分子膜は、2 葉から構成され、休止細胞では P t d S e r はそれらの内葉 (inner leaflet) に局在し、豊富に存在する。サイトゾルから出芽する間に、ヌクレオカプシドは E R 膜の内向き陥入を誘導した。この過程の際に、E R 膜の内葉および E R の内腔側にアンカーした p r M - E ヘテロ二量体は、エンベロープウイルスの未熟粒子表面に露出される。

10

20

30

40

50

【 0 1 5 6 】

D V 侵入への T Y R O 3 および A X L の関与は、ウイルス - リガンド複合体が結合するとこれらの分子がどのように感染を容易にするかについての興味深い問題を提起している。図 2 0 に示すように、D C - S I G N が媒介する D V 侵入に類似するモデルにおいて、T Y R O 3 タンパク質および A X L タンパク質は、ウイルスエンベロープタンパク質とその一次レセプターとの相互作用を、例えば細胞表面ウイルス濃度を増加させることによって容易にすることができよう。さらに、T A M レセプターは非 T A M レセプターとヘテロタイプな二量体化により物理的に結合することができるので、T Y R O 3 および A X L は真のレセプターをリクルートすることができると考えられる。この相互作用は、クラスリンが媒介する D V の内部移行を増強する下流のシグナル経路の活性化につながりうる。別の魅力のある仮説は、D V - T A M リガンド複合体の結合が、下流のエフェクターのレセプター活性化をトリガーしてウイルス感染を容易にすることができるというものである。この仮説は：(i) T A M レセプターへの G a s 6 の結合が、多様な細胞依存性の生物学的結果を有するシグナル伝達カスケードをトリガーすること；(i i) 細胞質尾部の欠失およびチロシンリン酸化を消失させる A T P 結合部位の突然変異 (K 5 6 7 M) が、Z E B O V - G P のトランスダクションの A X L 媒介性増強を減少させたという実証；(i i i) ホスホリパーゼ C 経路の活性化が Z E B O V - G P でシュードタイプにされたウイルスによる A X L 依存性細胞トランスダクションに必要であることによって裏付けられている。したがって、下流の経路の活性化が T Y R O 3 / A X L 媒介性の D V 感染増強に必要であると考えられる。

【 0 1 5 7 】

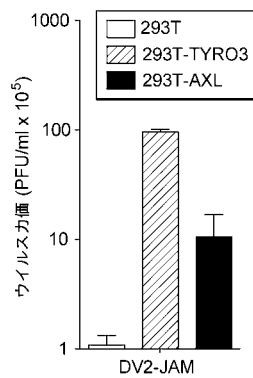
実際に、これらの下流経路の一つは、自然免疫の負のレギュレーションでありうる。最近、G a s 6 が、マクロファージおよび樹状細胞において T o l l 様レセプター (T L R) およびサイトカインレセプターによって誘導される炎症阻害剤としての T A M レセプターの機能を活性化したと報告されている。炎症の際に、T L R およびサイトカインシグナル伝達は A X L 発現のアップレギュレーションを駆動し、それが炎症促進性 I N F A R / S T A T 1 シグナル伝達経路を破壊して S O C S (suppressor of cytokine signaling) 1 および S O C S 3 遺伝子の転写を誘導し、自然免疫および炎症の負のレギュレーションを行った。A X L への G a s 6 の結合は S O C S 1 m R N A の発現が 1 0 倍に増加することを誘導し、T L R 誘導性サイトカイン産生を阻害した。D V - T A M リガンド複合体が T A M レセプターのスーパーアゴニストとして作用することで、S O C S 遺伝子発現およびその後の T L R 阻害を刺激する強力なレセプター活性化を誘導することで、感染の初期段階を容易にしたと推定することができる。

【 0 1 5 8 】

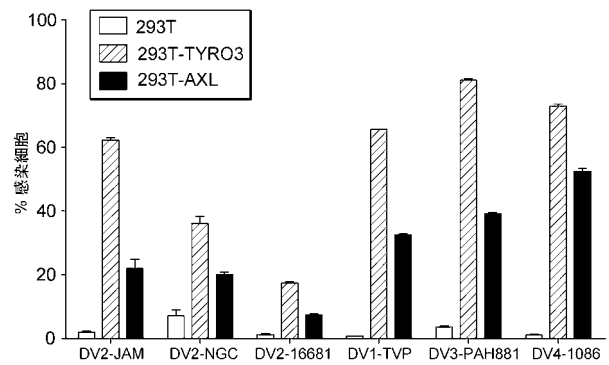
D V がウイルスエンベロープ上に存在する P t d S e r 残基を介して血清成分によりアポトーシス小体として認識されることによって、細胞表面 T Y R O 3 および A X L に結合

する能力を有する複合体を形成するというモデルが予測されている。D Vはアポトーシス小体を模倣することによって、T A Mレセプターのアポトーシス浄化機能を打倒して感染を容易にする。

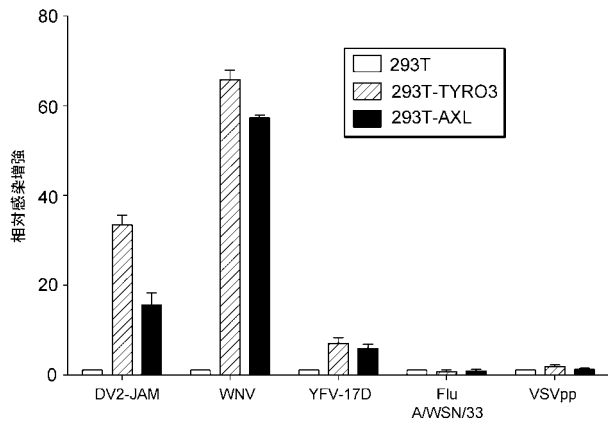
【 図 1 】



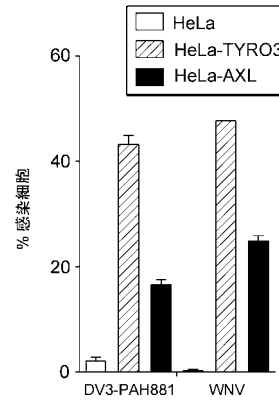
【 図 2 】



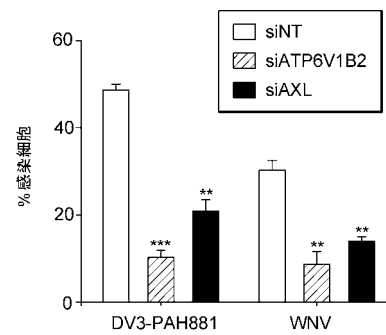
【図 3】



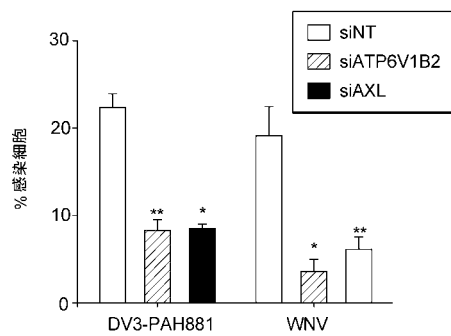
【図 4】



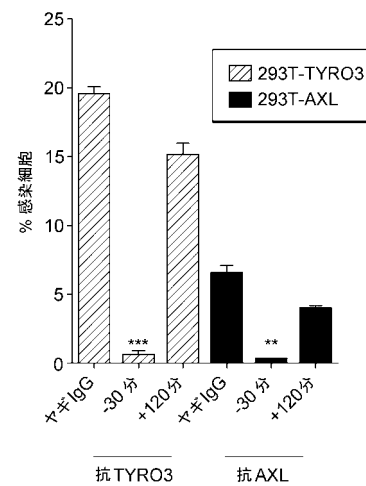
【図 5】



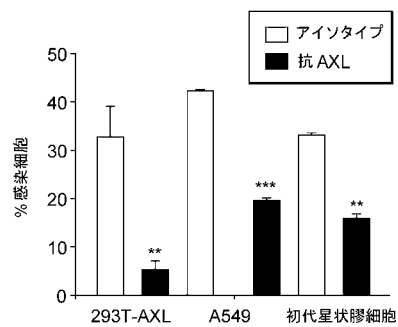
【図 6】



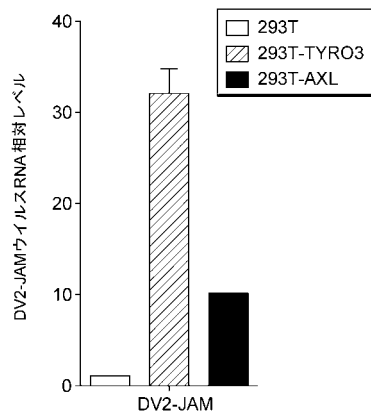
【図 8】



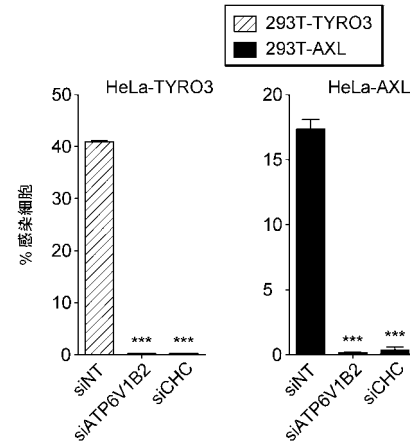
【図 7】



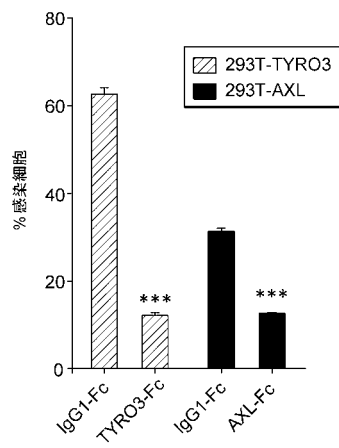
【図 9】



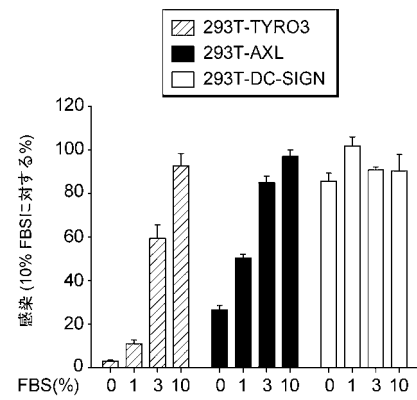
【図 10】



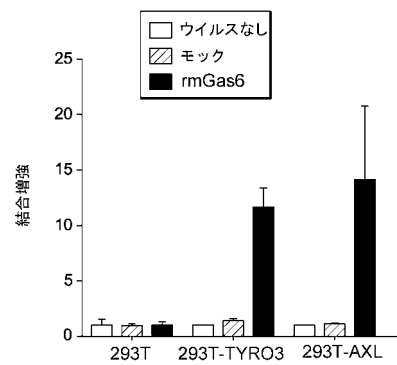
【図 11】



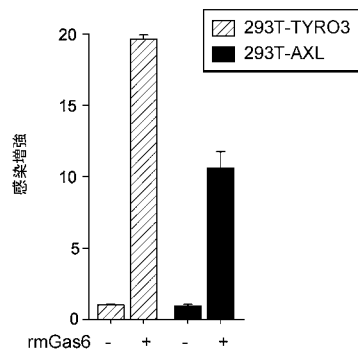
【図 12】



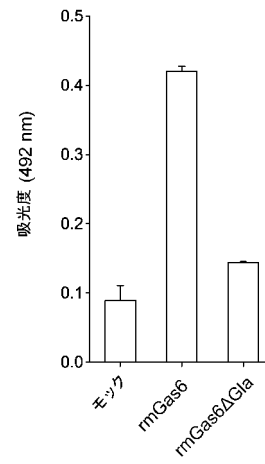
【図 13】



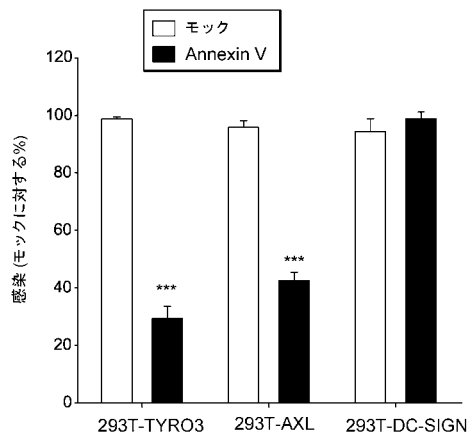
【図 1 4】



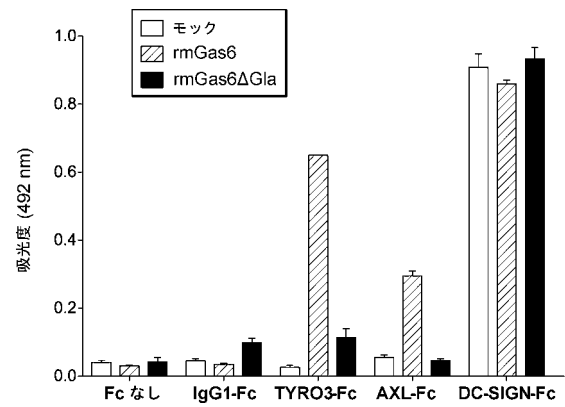
【図 1 5】



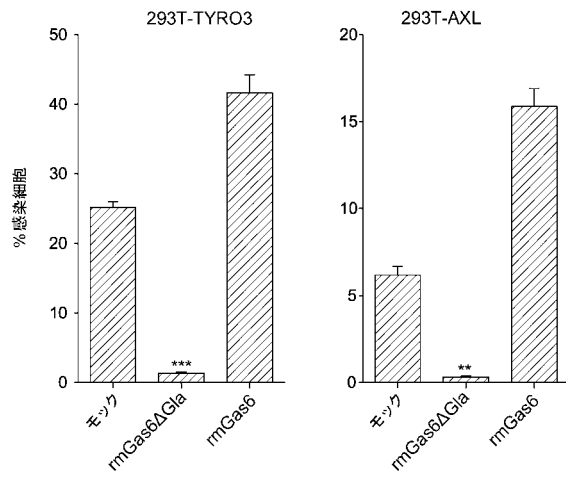
【図 1 6】



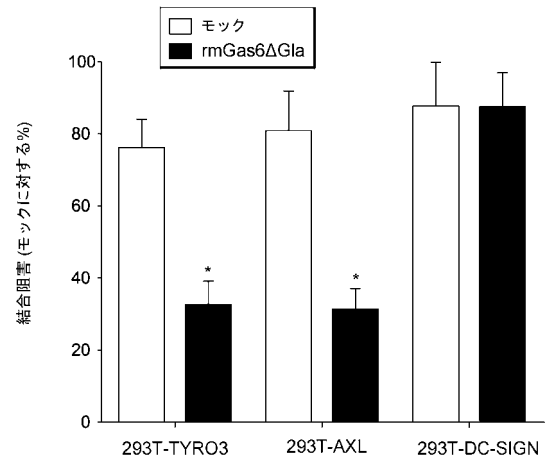
【図 1 7】



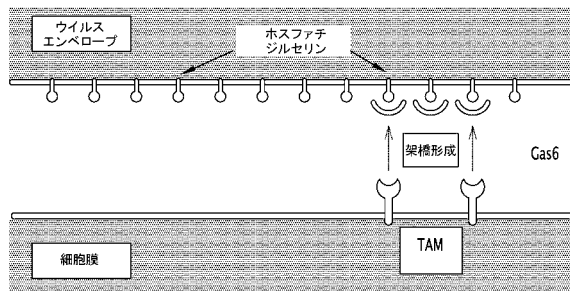
【図 18】



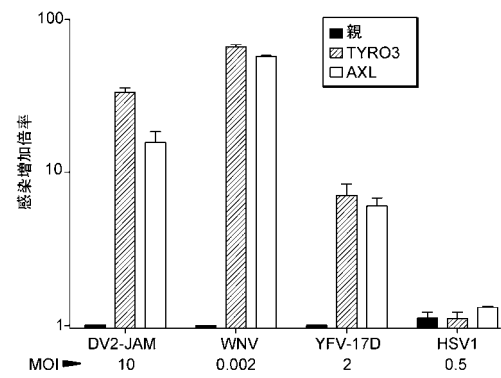
【図 19】



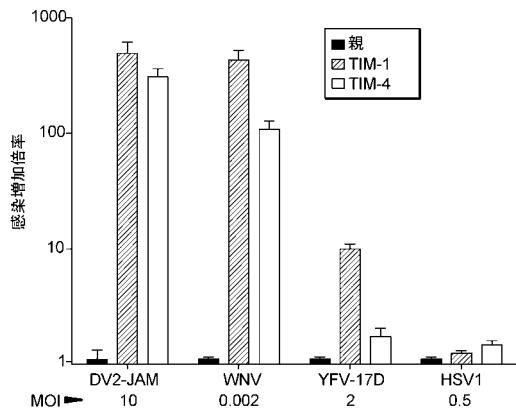
【図 20】



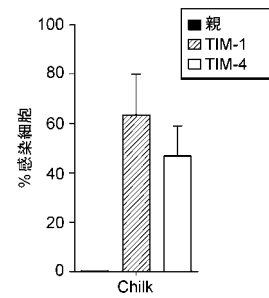
【図 22】



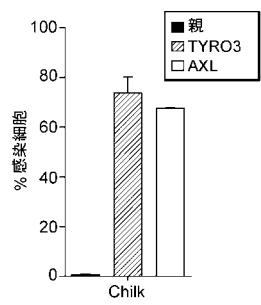
【図 21】



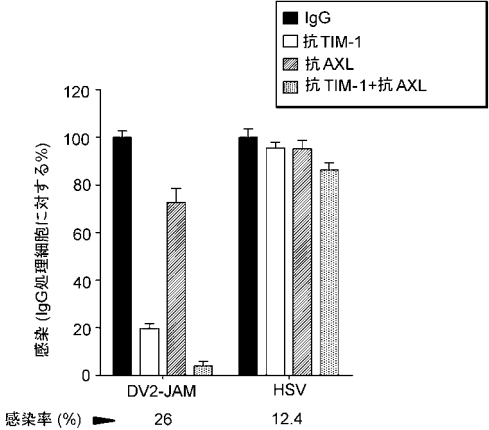
【図 23】



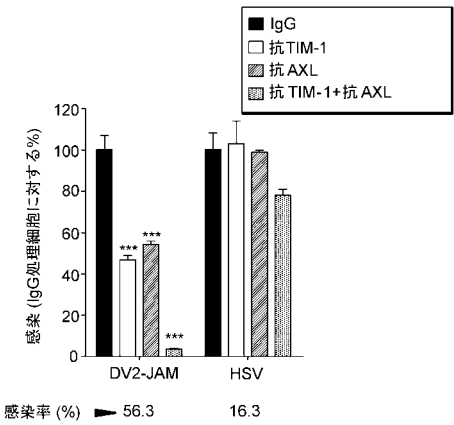
【 図 2 4 】



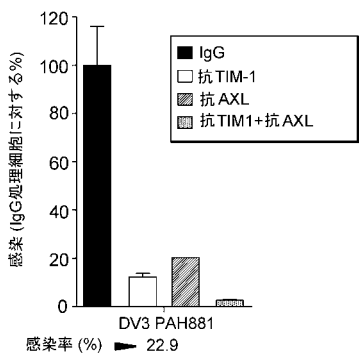
【 図 2 6 】



【 図 2 5 】



【 図 2 7 】



【配列表】

2015509943000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2013/053388

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. (means)

☐

on paper

☒

in electronic form

b. (time)

☒

in the international application as filed

☐

together with the international application in electronic form

☐

subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/053388

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C07K16/28 C12N15/113
 ADD. A61P31/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>W0 2009/062112 A2 (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI [US]; LEMKE GREG E [US]; YOUNG JOHN A T) 14 May 2009 (2009-05-14) page 2 page 5, paragraph 1 page 40, paragraph bridging - page 41 page 44, paragraph 1-2 page 16, paragraph bridging - page 17 page 48, lines 18-19,29-30 page 56 claims 1, 5-9, 12</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	<p>1-4,6,9, 11,12, 14,15</p>

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier application or patent but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 March 2013

Date of mailing of the international search report

09/04/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Domingues, Helena

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/053388

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MORIZONO KOUKI ET AL: "The soluble serum protein Gas6 bridges virion envelope phosphatidylserine to the TAM receptor tyrosine kinase Ax1 to mediate viral entry.", CELL HOST & MICROBE 21 APR 2011, vol. 9, no. 4, 21 April 2011 (2011-04-21), pages 286-298, XP002694162, ISSN: 1934-6069 page 291 - page 292 page 293; figures 6,/B page 296, paragraph final -----	1-8,12, 14,15, 17,18
Y	SOARES M MELINA ET AL: "Targeting inside-out phosphatidylserine as a therapeutic strategy for viral diseases.", NATURE MEDICINE DEC 2008, vol. 14, no. 12, December 2008 (2008-12), pages 1357-1362, XP002694163, ISSN: 1546-170X the whole document -----	1-18
Y	MORIZONO KOUKI ET AL: "Receptors and tropisms of envelope viruses.", CURRENT OPINION IN VIROLOGY JUL 2011, vol. 1, no. 1, July 2011 (2011-07), pages 13-18, XP002694164, ISSN: 1879-6265 the whole document -----	1-18
X,P	MEERTENS LAURENT ET AL: "The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry.", CELL HOST & MICROBE 18 OCT 2012, vol. 12, no. 4, 18 October 2012 (2012-10-18), pages 544-557, XP002694165, ISSN: 1934-6069 the whole document -----	1-9, 11-18
A	TASSANEETRITHEP BOONRAT ET AL: "DC - SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, US, vol. 197, no. 7, 7 April 2003 (2003-04-07) , pages 823-829, XP002272514, ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1084/JEM.20021840 the whole document ----- -/--	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/053388

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CABRERA-HERNANDEZ A ET AL: "MAMMALIAN DENGUE VIRUS RECEPTORS", DENGUE BULLETIN, WHO REGIONAL OFFICE FOR SOUTH-EAST ASIA, NEW DELHI, IN, vol. 29, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 119-135, XP001536276, ISSN: 1020-895X pages 121-123 -----	1-18
A	SHIMOJIMA MASAYUKI ET AL: "Tyro3 family-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 80, no. 20, October 2006 (2006-10), pages 10109-10116, XP002679230, ISSN: 0022-538X the whole document -----	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/053388

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009062112 A2	14-05-2009	CA 2703519 A1	21-01-2010
		CA 2703621 A1	14-05-2009
		EP 2217716 A2	18-08-2010
		EP 2219671 A1	25-08-2010
		JP 2011514881 A	12-05-2011
		US 2010247554 A1	30-09-2010
		US 2010266604 A1	21-10-2010
		WO 2009062112 A2	14-05-2009
		WO 2010008411 A1	21-01-2010

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	A 6 1 K 45/06	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A G	
	C 0 7 K 14/47	

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

(71)出願人 508266546
 ユニベルシテ パリ ディドロ - パリ 7
 UNIVERSITE PARIS DIDEROT - PARIS 7
 フランス国 エフ - 7 5 2 0 5 パリ セデックス 13 リュ トマ マン 5
 5 , rue Thomas Mann F - 7 5 2 0 5 Paris Cedex 13 F R
 A N C E

(74)代理人 110001508
 特許業務法人 津国
 (74)代理人 100078662
 弁理士 津国 肇
 (74)代理人 100119079
 弁理士 伊藤 佐保子
 (74)代理人 100116528
 弁理士 三宅 俊男
 (74)代理人 100146031
 弁理士 柴田 明夫
 (74)代理人 100122736
 弁理士 小國 泰弘
 (74)代理人 100122747
 弁理士 田中 洋子
 (74)代理人 100132540
 弁理士 生川 芳徳
 (74)代理人 100173912
 弁理士 塩見 敦

(72)発明者 アマラ, アリ
 フランス国、エフ - 7 5 0 1 0 パリ、アヴニュー・ヴェルフォー 1、オピタル・サン・ルイ、
 アンセルム・ユ 9 4 4

(72)発明者 メルテン, ローラン
 フランス国、エフ - 7 5 0 1 0 パリ、リュ・ドゥ・ラ・グランジュ・オー・ベル 16、オピタ
 ル・サン・ルイ、アンセルム・ユ 9 4 4 / セエヌエールエス 7 2 1 2

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA04 CA11 EA04 GA11 HA17

4C084	AA17	AA19	AA20	NA14	ZB331	ZC022	ZC202	ZC422		
4C085	AA13	AA14	BB11	CC08	CC21	DD62	EE01	EE03		
4C086	AA01	AA02	EA16	MA01	MA02	MA04	NA14	ZB33	ZC02	ZC20
		ZC42								
4H045	AA30	BA10	CA40	EA20	FA74					