

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6953307号

(P6953307)

(45) 発行日 令和3年10月27日(2021.10.27)

(24) 登録日 令和3年10月1日(2021.10.1)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/44 (2006.01)	C 1 2 N 15/44 Z N A
C O 7 K 14/11 (2006.01)	C O 7 K 14/11
C O 7 K 16/10 (2006.01)	C O 7 K 16/10
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11 Z
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z
請求項の数 20 (全 54 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2017-517300 (P2017-517300)	(73) 特許権者	598032106
(86) (22) 出願日	平成27年10月1日(2015.10.1)		バーテックス ファーマシューティカルズ
(65) 公表番号	特表2017-537605 (P2017-537605A)		インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成29年12月21日(2017.12.21)		VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/053393		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
(87) 国際公開番号	W02016/054312		210, ボストン, ノーザン アベニ
(87) 国際公開日	平成28年4月7日(2016.4.7)		ュー 50
審査請求日	平成30年9月28日(2018.9.28)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	62/058, 945		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成26年10月2日(2014.10.2)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 インフルエンザA型ウイルスバリエーション

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

インフルエンザA型ウイルスポリメラーゼの変異体PB2領域をコードするヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチドであって、該ポリメラーゼが、Q306H、F323L、S324I、S324N、S324R、F325V、H357Q、K376Q、K376R、Q406K、M431I、N510KおよびN510Tからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換を有する配列番号1のアミノ酸配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項2】

前記ポリヌクレオチドが、野生型インフルエンザA型ウイルスポリメラーゼと比較してアミノ酸306、323、324、325、357、376、404、406、431、および510からなる群から選択されるアミノ酸位置において2つもしくは3つのアミノ酸置換をコードする、請求項1に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項3】

Q306H、F323L、S324I、S324N、S324R、F325V、H357Q、K376Q、K376R、Q406K、M431I、N510KおよびN510Tからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換を有する配列番号1のアミノ酸配列を含む、単離されたインフルエンザA型ウイルスポリメラーゼであって、変異体PB2領域を含む、単離されたインフルエンザA型ウイルスポリメラーゼ。

【請求項4】

10

20

インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼの生物学的に活性な断片を含む、請求項 3 に記載のインフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼ。

【請求項 5】

Q 3 0 6 H、F 3 2 3 L、S 3 2 4 I、S 3 2 4 N、S 3 2 4 R、F 3 2 5 V、H 3 5 7 Q、K 3 7 6 Q、K 3 7 6 R、Q 4 0 6 K、M 4 3 1 I、N 5 1 0 K および N 5 1 0 T からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換を有する配列番号 1 のアミノ酸配列を含むインフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼの変異体 P B 2 領域を特異的に認識する、抗インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼ抗体。

【請求項 6】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含む、発現系。

10

【請求項 7】

プロモーターに作動可能に連結した請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含むベクターを含む、請求項 6 に記載の発現系。

【請求項 8】

請求項 7 に記載のベクターで、トランスフェクトされ、形質転換され、または形質導入されている、宿主細胞。

【請求項 9】

m R N A ディスプレイ系である、請求項 6 に記載の発現系。

【請求項 1 0】

変異体 P B 2 領域を含むインフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼをコードするポリヌクレオチドを含む、単離されたインフルエンザ A 型ウイルスバリエーションであって、該ポリメラーゼが、Q 3 0 6 H、F 3 2 3 L、S 3 2 4 I、S 3 2 4 N、S 3 2 4 R、F 3 2 5 V、H 3 5 7 Q、K 3 7 6 Q、K 3 7 6 R、Q 4 0 6 K、M 4 3 1 I、N 5 1 0 K および N 5 1 0 T からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換を有する配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、単離されたインフルエンザ A 型ウイルスバリエーション。

20

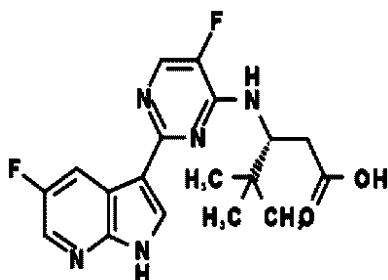
【請求項 1 1】

患者におけるインフルエンザ A 型ウイルス感染症のポリメラーゼ阻害剤に対する薬物耐性または感受性を評価するための方法であって、

該インフルエンザ A 型ウイルスに感染した患者から収集された生物学的試料が、変異体 P B 2 領域を含むインフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼをコードする核酸を含むかどうか評価するステップであって、該ポリメラーゼが、Q 3 0 6 H、F 3 2 3 L、S 3 2 4 I、S 3 2 4 N、S 3 2 4 R、F 3 2 5 V、H 3 5 7 Q、K 3 7 6 Q、K 3 7 6 R、Q 4 0 6 K、M 4 3 1 I、N 5 1 0 K および N 5 1 0 T からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換を有する配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、ステップを含み、該ポリメラーゼ阻害剤が、以下の式：

30

【化 1 A】



40

化合物 1

を有する化合物 1、または薬学的に許容されるその塩である、方法。

【請求項 1 2】

前記評価した薬物耐性または感受性が、患者におけるインフルエンザ A 型ウイルス感染

50

症に対する処置を指導するため、または患者に対する処置レジメンの最適化を指導するためのものである、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

患者におけるインフルエンザ A 型ウイルス感染症を処置するための候補化合物を同定するための方法であって、

請求項 1 0 に記載のインフルエンザ A 型ウイルスバリエーションに感染した試料中の該インフルエンザ A 型ウイルスバリエーションの活性を阻害する該候補化合物の能力をアッセイするステップ

を含む、方法。

【請求項 1 4】

前記インフルエンザ A 型ウイルスバリエーションの活性が複製である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

患者におけるインフルエンザ A 型ウイルス感染症を処置または予防するための候補化合物を同定するための方法であって、

a) 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含むレプリコン RNA を用意するステップと、
b) 該候補化合物が、a) の該レプリコン RNA の複製を阻害するかどうか決定するステップと

を含む、方法。

【請求項 1 6】

患者におけるインフルエンザ A 型ウイルス感染症を処置するための候補化合物を同定するための方法であって、

a) 請求項 3 に記載の単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼおよびポリメラーゼ基質を用意するステップであり、該ポリメラーゼおよび該基質が、細胞ベースの系または無細胞の系に存在する、ステップと、

b) 該基質の存在下で、該インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼを該候補化合物に接触させるステップと、

c) 該インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼ活性が減少しているかどうか決定するステップと

を含む、方法。

【請求項 1 7】

患者におけるインフルエンザ A 型ウイルス感染症を処置するための候補化合物を評価するための方法であって、

a) 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドおよび指標をコードする指標遺伝子を含むベクターを宿主細胞に導入するステップと、

b) 該宿主細胞を培養するステップと、

c) 該候補化合物の存在下および該候補化合物の非存在下で該指標を測定するステップとを含む、方法。

【請求項 1 8】

機械可読性データがコードされたデータ記憶材料を含む機械可読性データ記憶媒体であって、該機械可読性データが、Q 3 0 6 H、F 3 2 3 L、S 3 2 4 I、S 3 2 4 N、S 3 2 4 R、F 3 2 5 V、H 3 5 7 Q、K 3 7 6 Q、K 3 7 6 R、Q 4 0 6 K、M 4 3 1 I、N 5 1 0 K および N 5 1 0 T からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換を有する配列番号 1 のアミノ酸配列を含むインフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼの変異体 P B 2 領域に対するインデックス値を含み、該機械可読性データがさらに、インフルエンザ A 型ウイルスバリエーションまたは生物学的試料に関連する少なくとも 1 つの特色に対するインデックス値を含み、該特色が、

a) ポリメラーゼ阻害剤に対する感受性の低下に対する耐性を示す能力、

b) 患者の罹患率または回復の可能性、ならびに

c) 該インフルエンザ A 型ウイルスバリエーションの変異された複製能（増加または低減）

10

20

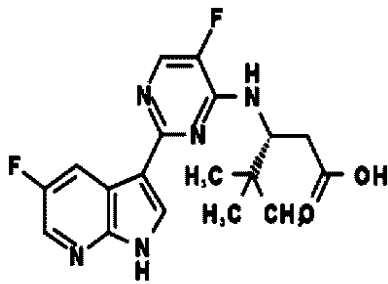
30

40

50

からなる群から選択され、該ポリメラーゼ阻害剤が、以下の式：

【化 1 B】



10

化合物 1

を有する化合物 1、または薬学的に許容されるその塩である、機械可読性データ記憶媒体。

【請求項 19】

生物学的試料中のインフルエンザ A 型ウイルスバリエーションの存在を検出するための方法であって、該生物学的試料中の、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドの存在を検出するステップを含む、方法。

【請求項 20】

20

請求項 5 に記載の抗体を含む、診断用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の引用)

本 PCT 出願は、2014 年 10 月 2 日出願の米国仮出願第 62 / 058,945 号の利益を主張する。この文書は、その全体が本明細書中に参考として援用される。

【0002】

(配列表)

本出願は、2014 年 10 月 2 日に作成され、ここに電子出願された「355617 __ S T 25 . t x t」(8.06 キロバイト)という表題の配列表を、その全体において参照により組み込む。

30

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

インフルエンザは、季節的流行において世界中に拡散し、毎年数十万人、世界的流行の年には何百万人も死亡をもたらす。例えば、3 種のインフルエンザの世界的流行が 20 世紀に起こり、何千万の人々を死に追いやったが、これらの世界的流行のそれぞれは、ヒトにおいて、新規株のウイルスが出現することにより引き起こされている。多くの場合、これらの新規株は、他の動物種からヒトへの既存のインフルエンザウイルスの拡散から生

40

【0004】

インフルエンザはまず、感染した人間が咳またはくしゃみをした際に生じる、ウイルスを積んだ大きな液滴を介して人間から人間に伝染し、次いで、これらの大きな液滴は、感染した人間の近くににいる(例えば、約 6 フィート以内)感染しやすい個体の上気道の粘膜表面上に沈降し得る。伝染はまた、呼吸器の分泌物との直接的接触または間接的接触、例えば、インフルエンザウイルスで汚染された表面に触れて、次いで眼、鼻または口に触れることにより生じ得る。成人は、症状が現れる 1 日前から、症状が始まった約 5 日後まで他人にインフルエンザを拡散することが可能であり得る。幼い子供および免疫系が弱い人間は、症状の発症後 10 またはそれ超の日数後に感染する可能性がある。

50

【 0 0 0 5 】

インフルエンザウイルスは、*Orthomyxoviridae*ファミリーのRNAウイルスであり、このファミリーは5つの属を含む：インフルエンザウイルスA型、インフルエンザウイルスB型、インフルエンザウイルスC型、イサウイルスおよびトゴトウイルス。

【 0 0 0 6 】

インフルエンザウイルスA属は、1つの種、インフルエンザA型ウイルスを有する。野生の水鳥は多種多様のインフルエンザA型に対する自然の宿主である。時には、ウイルスは、他の種へ伝染し、次いで、家禽において壊滅的な集団発生を引き起こすか、またはヒトインフルエンザの世界的流行を生じることもある。A型ウイルスは、3つのインフルエンザ型の中で最も毒性のあるヒト病原体であり、最も重症の疾患を引き起こす。インフルエンザA型ウイルスは、これらのウイルスに対する抗体応答に基づき異なる血清型に細分化することができる。ヒトにおいて確認された血清型は、公知の世界的流行のヒト死亡数の順に並べると、H1N1（1918年にスペイン風邪を引き起こした）、H2N2（1957年にアジア風邪を引き起こした）、H3N2（1968年に香港風邪を引き起こした）、H5N1（2007～08年のインフルエンザシーズンに世界的流行の脅威となった）、H7N7（稀な人獣共通感染症の可能性がある）、H1N2（ヒトおよびブタにおいて流行）、H9N2、H7N2、H7N3およびH10N7である。

【 0 0 0 7 】

インフルエンザウイルスB属は、1つの種、インフルエンザB型ウイルスを有する。インフルエンザB型は、ほぼ独占的にヒトに感染し、インフルエンザA型よりも一般的ではない。インフルエンザB型感染症に罹りやすいことが公知の他の唯一の動物はアザラシである。この型のインフルエンザはA型より2～3倍遅い速度で変異し、結果的には、遺伝的にあまり多様でなく、インフルエンザB型の血清型は1つのみである。この抗原多様性の欠如の結果、インフルエンザB型に対するある程度の免疫は、若年齢において通常獲得される。しかし、インフルエンザB型は、免疫の持続が可能ではない程度に変異する。この低い抗原変化の速度は、その宿主範囲の限定（異種間の抗原シフトを阻害する）と合わせて、インフルエンザB型の世界的流行が生じないことを確実にしている。

【 0 0 0 8 】

インフルエンザウイルスC属は、1つの種、インフルエンザC型ウイルスを有し、このインフルエンザC型ウイルスは、ヒトおよびブタに感染し、重症の疾病および局所的な流行病を引き起こす可能性がある。しかし、インフルエンザC型は、他の型よりも一般的ではなく、通常子供において軽度の疾患を引き起こすようである。

【 0 0 0 9 】

インフルエンザA、BおよびC型ウイルスは構造が非常に類似している。ウイルス粒子は、直径80～120ナノメートルであり、通常ほぼ球状であるが、線維状の形態も生じ得る。ウイルスにしては珍しく、そのゲノムは核酸の単一の小片ではない。代わりに、これは、セグメント化したマイナス鎖RNAの7または8つの小片を含有する。インフルエンザA型ゲノムは、11種のタンパク質をコードする：赤血球凝集素（HA）、ノイラミニダーゼ（NA）、核タンパク質（NP）、M1、M2、NS1、NS2（NEP）、PA、PB1、PB1-F2およびPB2。

【 0 0 1 0 】

HAおよびNAは、ウイルス粒子の外側の大きな糖タンパク質である。HAは、標的細胞へのウイルスの結合および標的細胞へのウイルスゲノムの侵入を媒介するレクチンであり、NAは、成熟したウイルス粒子を結合させる糖を切断することによって、感染細胞からの子孫ウイルスの放出に参与している。したがって、これらのタンパク質は、抗ウイルス薬の標的であった。さらに、これらは、抗体の惹起が可能である抗原である。インフルエンザA型ウイルスは、例えば、H5N1における、HとNの区別（上記を参考）の基礎を形成するHAおよびNAに対する抗体応答に基づき、にサブタイプへと分類される。

【 0 0 1 1 】

10

20

30

40

50

インフルエンザによって、生産性の損失および関連する医療処置による直接的費用、ならびに予防手段という間接的費用が生じる。米国では、インフルエンザは、毎年100億ドルを超える総費用の原因となり、将来の世界的流行は、何千億ドルもの直接的および間接的費用をもたらすことが推測されている。予防的費用もまた高い。世界各国の政府は、薬物およびワクチンを購入し、ならびに災害訓練および出入国管理の改善のための戦略を開発することに伴う費用として、起こり得るH5N1トリインフルエンザの世界的流行に対する用意および計画に何十億ものU.S.ドルを費やした。

【0012】

インフルエンザに対する現行の処置オプションは、ワクチン接種、および抗ウイルス薬物治療を用いた、化学療法または化学的予防法を含む。インフルエンザワクチンを用いた、インフルエンザに対するワクチン接種は、多くの場合、高リスクの群、例えば、子供および高齢者、または喘息、糖尿病、もしくは心疾患を有する人々に対して推奨されている。しかし、ワクチン接種をしていても、依然としてインフルエンザに罹る可能性がある。ワクチンは、少数の特定のインフルエンザ株に対して各シーズン再製剤化されるが、そのシーズンに、世界中で人々に活発に感染するすべての株を含むことはおそろくない。季節的流行病に対処するため必要とされる何百万もの用量を製造業者が製剤化および生産するのに約6カ月かかる。時には、新規または見落としした株がその時期に顕著であり、ワクチン接種したにもかかわらず人々に感染する(2003~2004年のインフルエンザシーズンにおける、福建省でのH3N2インフルエンザによるように)。ワクチンが有効となるのに約2週間かかるので、ワクチン接種直前に感染し、ワクチンが予防することを想定しているまさにその株で発病する可能性もある。

【0013】

さらに、これらのインフルエンザワクチンの有効性は変わり得る。ウイルスの変異率が高いため、特定のインフルエンザワクチンでは、通常数年以下しか防御が得られない。インフルエンザウイルスは時間の経過と共に急速に変化し、異なる株が優性となるので、ある年に対して製剤化されたワクチンは、次の年には有効でない可能性がある。

【0014】

また、RNA校正酵素の非存在のため、インフルエンザvRNAのRNA依存性RNAポリメラーゼは、インフルエンザvRNAのおおよその長さである、およそ10,000のヌクレオチドにつき1つのヌクレオチド挿入誤差を作製する。したがって、ほぼすべての新しく製造されたインフルエンザウイルスは、変異体、つまり抗原ドリフトである。1つより多くのウイルス系統が単一の細胞に感染した場合、ゲノムが8つの別個のvRNAセグメントに分離することによって、vRNAの混合または再集合が可能となる。ウイルスの遺伝学的特性において生じた急速な変化は、抗原シフトをもたらす、ウイルスが新規の宿主種に感染し、すばやく防御免疫に打ち勝つことを可能にする。

【0015】

抗ウイルス薬もまた、インフルエンザを処置するために使用することができ、ノイラミニダーゼ阻害剤は特に有効であるが、ウイルスは、標準の抗ウイルス薬に対する耐性を生み出すことができる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

したがって、インフルエンザ感染症を処置するための薬物、例えば、処置ウィンドウが拡張され、および/またはウイルス価(viral titer)に対する感受性を低下させる薬物の必要性が依然として存在する。

【0017】

したがって、薬物または他の治療法に対する耐性を示す変異したインフルエンザA型ウイルスまたは他のウイルスを同定すること、およびこれらの変異したウイルスに対して有効な新規ウイルス治療薬を開発する必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 8 】

(発 明 の 概 要)

したがって、本発明は、インフルエンザ A 型ウイルスバリエーション、ならびに関係する方法および組成物を提供する。特に、1 種または複数種のポリメラーゼ阻害剤に対する感受性を低下させたインフルエンザ A 型ウイルスバリエーションおよびバリエーションインフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼが提供される。

【 0 0 1 9 】

一態様では、本発明は、インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼをコードする遺伝子内に変異を含む、単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド、生物学的に活性なその類似体、または生物学的に活性なその断片であって、前記変異が、野生型インフル
10
エンザ A 型ウイルスのアミノ酸 3 0 6、3 2 3、3 2 4、3 2 5、3 5 7、3 7 6、4 0 4、4 0 6、4 3 1、および 5 1 0 からなる群から選択されるアミノ酸残基に対応する少なくとも 1 つのアミノ酸置換をもたらす、単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド、生物学的に活性なその類似体、または生物学的に活性なその断片を提供する。

【 0 0 2 0 】

ある特定の実施形態では、単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドは、Q をコードしない野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 3 0 6 に対応するヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態では、ヌクレオチドは H をコード
20
する。

【 0 0 2 1 】

ある特定の実施形態では、単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドは、F をコードしない野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 3 2 3 に対応するヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態では、ヌクレオチドは L をコードする。

【 0 0 2 2 】

ある特定の実施形態では、単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドは、S をコードしない野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 3 2 4 に対応するヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態では、ヌクレオチドは I、N または R をコードする。
30

【 0 0 2 3 】

ある特定の実施形態では、単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドは、S をコードしない野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 3 2 5 に対応するヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態では、ヌクレオチドは V をコードする。

【 0 0 2 4 】

ある特定の実施形態では、単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドは、H をコードしない野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 3 5 7 に対応するヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態では、ヌクレオチドは Q をコード
40
する。

【 0 0 2 5 】

ある特定の実施形態では、単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドは、K をコードしない野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 3 7 6 に対応するヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態では、ヌクレオチドは Q または R をコードする。

【 0 0 2 6 】

ある特定の実施形態では、単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドは、F をコードしない野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 4 0 4 に対応するヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態では、ヌクレオチドは Y をコード
50
する。

【 0 0 2 7 】

ある特定の実施形態では、単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドは、F をコードしない野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 4 0 6 に対応するヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態では、ヌクレオチドは K をコードする。

【 0 0 2 8 】

ある特定の実施形態では、単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドは、M をコードしない野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 4 3 1 に対応するヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態では、ヌクレオチドは I をコードする。

10

【 0 0 2 9 】

ある特定の実施形態では、単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドは、N をコードしない野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 5 1 0 に対応するヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態では、ヌクレオチドは K または T をコードする。

【 0 0 3 0 】

ある特定の実施形態では、アミノ酸 3 0 6、3 2 3、3 2 4、3 2 5、3 5 7、3 7 6、4 0 4、4 0 6、4 3 1、および 5 1 0 からなる群から選択される任意の 2 つのアミノ酸に対応するヌクレオチドは、対応する野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸と異なるアミノ酸をコードするように変異している。ある特定の実施形態では、アミノ酸 3 0 6、3 2 3、3 2 4、3 2 5、3 5 7、3 7 6、4 0 4、4 0 6、4 3 1、および 5 1 0 からなる群から選択される任意の 3 つのアミノ酸に対応するヌクレオチドは、対応する野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸と異なるアミノ酸をコードするように変異している。

20

【 0 0 3 1 】

さらなる実施形態では、本発明は、本発明のインフルエンザ A 型ウイルスに関する方法および組成物を提供する。例えば、インフルエンザ A 型ウイルスを含む発現系が提供され、このような発現系は、プロモーターに作動可能に連結したインフルエンザ A 型ウイルスを含むベクターを含むことができる。ベクターでトランスフェクトされ、形質転換され、または形質導入された宿主細胞もまた提供される。代わりに、本発明の発現系は、m R N A ディスプレイ技術、例えば、米国特許第 6, 2 5 8, 5 5 8 号に記載されている R N A - タンパク質融合技術または米国特許第 6, 3 6 1, 9 4 3 号に記載されている *i n v i t r o* での「ウイルス」技術に基づく。

30

【 0 0 3 2 】

別の態様では、本発明は、インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼをコードするポリヌクレオチドを含む、単離されたインフルエンザ A 型ウイルスバリエーションであって、3 0 6、3 2 3、3 2 4、3 2 5、3 5 7、3 7 6、4 0 4、4 0 6、4 3 1、および 5 1 0 からなる群から選択される少なくとも 1 つの位置の少なくとも 1 つのアミノ酸が、野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドの対応するアミノ酸と異なるアミノ酸をコードするように変異している、バリエーションを提供する。本発明のさらなる実施形態は、インフルエンザ A 型ウイルスバリエーションに関する方法および組成物を提供する。例えば、本発明のインフルエンザ A 型ウイルスバリエーションの複製を阻害することができる化合物を同定するための方法が提供される。本発明のインフルエンザ A 型ウイルスバリエーションに感染した細胞が提供される。

40

【 0 0 3 3 】

別の態様では、本発明は、3 0 6、3 2 3、3 2 4、3 2 5、3 5 7、3 7 6、4 0 4、4 0 6、4 3 1、および 5 1 0 からなる群から選択される少なくとも 1 つの位置のアミノ酸が野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼの対応する位置のアミノ酸と異なるアミノ酸配列を含む、単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼを提供する。一部の実施形態では、インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼは、インフルエンザ A

50

型ウイルスポリメラーゼの生物学的に活性な類似体を含む。一部の実施形態では、インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼは、インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼの生物学的に活性な断片を含む。

【 0 0 3 4 】

さらなる態様では、本発明は、3 0 6、3 2 3、3 2 4、3 2 5、3 5 7、3 7 6、4 0 4、4 0 6、4 3 1、および 5 1 0 からなる群から選択される少なくとも 1 つの位置のアミノ酸が野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼの対応する位置のアミノ酸と異なるアミノ酸配列を含むインフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼを認識する、抗インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼ抗体を提供する。本発明のさらなる実施形態は、本発明の抗インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼ抗体に関する方法および組成物を提供

10

【 0 0 3 5 】

別の態様では、本発明は、ストリンジェントな条件下で、本発明のインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドの核酸配列とハイブリダイズすることが可能なヌクレオチドプローブまたはプライマーを提供する。本発明のさらなる実施形態は、プローブまたはプライマーに関する方法および組成物を提供する。例えば、本発明のプローブまたはプライマーを含む診断用または検出キットが提供され、キットは、例えば、本発明のインフルエンザ A 型ウイルスバリエーションまたはインフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼが試料中に存在するかどうかを決定するのに有用である。

20

【 0 0 3 6 】

さらなる態様では、本発明は、患者において、インフルエンザ A 型ウイルス感染症のポリメラーゼ阻害剤に対する薬物耐性または感受性を評価するための方法であって、a) インフルエンザ A 型ウイルスに感染した患者から生物学的試料を収集するステップと、b) 試料が、3 0 6、3 2 3、3 2 4、3 2 5、3 5 7、3 7 6、4 0 4、4 0 6、4 3 1、および 5 1 0 からなる群から選択される少なくとも 1 つの位置のアミノ酸が野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼの対応する各位置のアミノ酸と異なるアミノ酸配列を含むインフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼをコードする核酸を含むかどうか評価するステップとを含む方法を提供する。

【 0 0 3 7 】

30

患者において、インフルエンザ A 型ウイルス感染症に対する処置を指導するための方法であって、a) 請求項 2 3 に記載の方法に従い、患者のポリメラーゼ阻害剤に対する薬物耐性または感受性を評価するステップと、b) a) において評価した薬物耐性または感受性に基づき、患者に対して処置レジメンを最適化するステップとを含む方法もまた提供される。例えば、薬物耐性が予測または検出された場合（例えば、ポリメラーゼ阻害剤に対する感受性の低下）、1 種または複数種の他の化合物または薬剤を患者の処置計画または治療レジメンに含めることができる。方法は、患者においてインフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼの配列を決定すること（例えば、遺伝子型判定）、ポリメラーゼ阻害剤に対する感受性を決定すること（例えば、表現型判定）、または患者のインフルエンザ A 型ウイルスのウイルス適合度レベルを決定することの任意の組合せを含むことができる。表現型判定は、無細胞の系（例えば、*in vitro*でのプロテアーゼアッセイ）ならびに細胞ベースの系（例えば、レプリコンアッセイまたはウイルス感染または複製アッセイ）において行うことができる。

40

【 0 0 3 8 】

別の態様では、本発明は、患者において、インフルエンザ A 型ウイルス感染症を処置するための候補化合物を同定するための方法であって、a) インフルエンザ A 型ウイルスバリエーションに感染した試料を用意するステップと、b) 試料中のインフルエンザ A 型ウイルスバリエーションの活性を阻害する候補化合物の能力をアッセイするステップとを含む方法を提供する。試料は、患者の細胞または血漿から得ることができる。インフルエンザ A 型ウイルスバリエーションに感染した試料はまた、培養細胞であってもよい。インフルエンザ A 型

50

ウイルスバリエーションの活性は、その感染、複製、および/または放出される能力により決定することができる。

【0039】

代わりに、このような方法は、本発明のインフルエンザA型ウイルスポリヌクレオチドを含むレプリコンRNAを用意するステップと、適切なアッセイにおいて、候補化合物が、レプリコンRNAの複製を阻害するかどうか決定するステップとを含み得る。

【0040】

別の代替法は、発明の単離されたインフルエンザA型ウイルスポリメラーゼおよびポリメラーゼ基質を用意するステップと、インフルエンザA型ウイルスポリメラーゼ活性が候補化合物の存在下で減少するかどうか決定するステップとを含むことができ、インフル

10

エンザA型ウイルスポリメラーゼおよび/もしくはポリメラーゼ基質は、例えば、培養細胞中で発現する、細胞ベースの系に存在してもよいし、またはインフルエンザA型ウイルスポリメラーゼおよび/もしくはポリメラーゼ基質は無細胞の系、例えば、インフルエンザA型ウイルスポリメラーゼおよびペプチド基質を含む反応混合物中に存在してもよい。

【0041】

患者において、インフルエンザA型ウイルス感染症を処置するための候補化合物を評価するためのさらなる代替法は、本発明のインフルエンザA型ウイルスポリヌクレオチドおよび指標をコードする指標遺伝子を含むベクターを宿主細胞に導入するステップと、候補化合物の存在下、および候補化合物の非存在下で指標を測定するステップとを含み得る。

【0042】

20

インフルエンザA型ウイルスポリメラーゼ活性を減少させるのに有効な化合物を同定するための方法がさらに提供される。方法は、本発明のインフルエンザA型ウイルスポリメラーゼの三次元モデルを得るステップと、化合物を設計または選択するステップとを含み得る。方法は、ポリメラーゼに結合するまたはこれと相互作用する化合物の能力を、*in silico*、*in vitro*で、および/または*in vivo*で評価するステップをさらに含み得る。方法は、また、無細胞のまたは細胞ベースのアッセイにおいて、設計または選択した化合物が、ポリメラーゼ阻害剤に対する感受性を低下させたインフルエンザA型ウイルスポリメラーゼ、特に、バリエーションインフルエンザA型ウイルスポリメラーゼの活性を阻害できるかどうかを決定するステップも含むことができる。方法は、さらにまたは代わりに、細胞または試料中でインフルエンザA型ウイルス複製を阻害する、設計または選択した化合物の能力をアッセイするステップを含むことができる。インフル

30

エンザA型ウイルス複製は、本発明のインフルエンザA型ウイルスバリエーションまたは本発明のインフルエンザA型ウイルスレプリコンの複製を測定することによって決定することができる。

【0043】

本発明のさらなる態様は、患者において、インフルエンザA型ウイルス感染症を処置するための方法を提供することである。方法は、本発明の方法により同定された化合物の薬学的有効量または治療有効量を、単独でまたは別の抗ウイルス剤と組み合わせて患者に投与するステップを含むことができる。

【0044】

40

本発明の別の態様は、機械可読性データがコードされたデータ記憶材料を含む機械可読性データ記憶媒体を提供するコンピューターツールであって、機械可読性データが、インフルエンザA型ウイルスバリエーションまたは生物学的試料に関連する少なくとも2つの特色(feature)に対するインデックス値を含む、コンピューターツールに関する。

【0045】

特色は、a)ポリメラーゼ阻害剤に対する感受性の低下に対する耐性を示す能力、b)野生型インフルエンザA型ウイルスの306、323、324、325、357、376、404、406、431、および510からなる群から選択される少なくとも1つの位置のアミノ酸が野生型インフルエンザA型ウイルスポリメラーゼの対応する位置のアミノ酸と異なるアミノ酸配列を含む、インフルエンザA型ウイルスポリメラーゼ、c)患者の

50

罹患率または回復の可能性、ならびに d) インフルエンザ A 型ウイルスバリエーションの変更された複製能（増加または低減）から選択される。

【0046】

本発明のさらなる態様は、インフルエンザ A 型ウイルスに感染した患者において、インフルエンザ A 型ウイルスバリエーションのプロファイルを得る方法を提供する。方法は、患者から試料（例えば、血漿試料）を得るステップと、この試料からの少なくとも 2、20、50、100、200、500 個またはそれ超のインフルエンザ A 型ウイルスピリオンから、インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼの遺伝子型判定および/または表現型判定を行うステップを含み得る。例えば、このような遺伝子型判定は、血漿試料からの少なくとも 2、20、50、100、200、500 個またはそれ超のインフルエンザ A 型ウイルスピリオンから、インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼのヌクレオチド配列を決定することを含み得る。

10

【0047】

ある特定の実施形態では、このようなプロファイリングに供される患者は、ポリメラーゼ阻害剤で処置されているか、または処置するように選択されていてもよい。

【0048】

ある特定の実施形態では、血漿試料は、2 つまたはそれ超の異なる時点で、このようなプロファイリングに供される患者から得る。

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

(項目 1)

20

インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼをコードする遺伝子内に変異を含む、単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド、生物学的に活性なその類似体、または生物学的に活性なその断片であって、該変異が、野生型インフルエンザ A 型ウイルスのアミノ酸 306、323、324、325、357、376、404、406、431、および 510 からなる群から選択されるアミノ酸残基に対応する少なくとも 1 つのアミノ酸置換をもたらす、単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド、生物学的に活性なその類似体、または生物学的に活性なその断片。

(項目 2)

前記野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 306 に対応するヌクレオチドが、Q をコードしない、項目 1 に記載の単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド。

30

(項目 3)

前記野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 306 に対応するヌクレオチドが、H をコードする、項目 1 に記載の単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド。

(項目 4)

前記野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 323 に対応するヌクレオチドが、F をコードしない、項目 1 に記載の単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド。

(項目 5)

40

前記野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 323 に対応するヌクレオチドが、L をコードする、項目 1 に記載の単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド。

(項目 6)

前記野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 324 に対応するヌクレオチドが、S をコードしない、項目 1 に記載の単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド。

(項目 7)

前記野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 324 に対応するヌクレオチドが、I をコードする、項目 1 に記載の単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド。

50

スポリヌクレオチド。

(項目 8)

前記野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 3 2 4 に対応するヌクレオチドが、N をコードする、項目 1 に記載の単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド。

(項目 9)

前記野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 3 2 4 に対応するヌクレオチドが、R をコードする、項目 1 に記載の単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド。

(項目 10)

前記野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 3 2 5 に対応するヌクレオチドが、S をコードしない、項目 1 に記載の単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド。

(項目 11)

前記野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 3 2 5 に対応するヌクレオチドが、V をコードする、項目 1 に記載の単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド。

(項目 12)

前記野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 3 5 7 に対応するヌクレオチドが、H をコードしない、項目 1 に記載の単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド。

(項目 13)

前記野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 3 5 7 に対応するヌクレオチドが、Q をコードする、項目 1 に記載の単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド。

(項目 14)

前記野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 3 7 6 に対応するヌクレオチドが、K をコードしない、項目 1 に記載の単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド。

(項目 15)

前記野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 3 7 6 に対応するヌクレオチドが、R をコードする、項目 1 に記載の単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド。

(項目 16)

前記野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 3 7 6 に対応するヌクレオチドが、Q をコードする、項目 1 に記載の単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド。

(項目 17)

前記野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 4 0 4 に対応するヌクレオチドが、F をコードしない、項目 1 に記載の単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド。

(項目 18)

前記野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 4 0 4 に対応するヌクレオチドが、Y をコードする、項目 1 に記載の単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド。

(項目 19)

前記野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 4 0 6 に対応するヌクレオチドが、F をコードしない、項目 1 に記載の単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド。

(項目 20)

10

20

30

40

50

前記野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 4 0 6 に対応するヌクレオチドが、K をコードする、項目 1 に記載の単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド。

(項目 2 1)

前記野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 4 3 1 に対応するヌクレオチドが、M をコードしない、項目 1 に記載の単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド。

(項目 2 2)

前記野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 4 3 1 に対応するヌクレオチドが、I をコードする、項目 1 に記載の単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド。

10

(項目 2 3)

前記野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 5 1 0 に対応するヌクレオチドが、N をコードしない、項目 1 に記載の単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド。

(項目 2 4)

前記野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 5 1 0 に対応するヌクレオチドが、T をコードする、項目 1 に記載の単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド。

(項目 2 5)

20

前記野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドのアミノ酸 5 1 0 に対応するヌクレオチドが、K をコードする、項目 1 に記載の単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド。

(項目 2 6)

アミノ酸 3 0 6、3 2 3、3 2 4、3 2 5、3 5 7、3 7 6、4 0 4、4 0 6、4 3 1、および 5 1 0 からなる群から選択される任意の 2 つのアミノ酸に対応するヌクレオチドが、対応する野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸と異なるアミノ酸をコードするように変異している、項目 1 に記載の単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド。

(項目 2 7)

30

アミノ酸 3 0 6、3 2 3、3 2 4、3 2 5、3 5 7、3 7 6、4 0 4、4 0 6、4 3 1、および 5 1 0 からなる群から選択される任意の 3 つのアミノ酸に対応するヌクレオチドが、対応する野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸と異なるアミノ酸をコードするように変異している、項目 1 に記載の単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド。

(項目 2 8)

3 0 6、3 2 3、3 2 4、3 2 5、3 5 7、3 7 6、4 0 4、4 0 6、4 3 1、および 5 1 0 からなる群から選択される少なくとも 1 つの位置のアミノ酸が野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼの対応する位置のアミノ酸と異なるアミノ酸配列を含む、単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼ。

40

(項目 2 9)

インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼの生物学的に活性な類似体を含む、項目 2 8 に記載のインフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼ。

(項目 3 0)

インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼの生物学的に活性な断片を含む、項目 2 8 に記載のインフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼ。

(項目 3 1)

3 0 6、3 2 3、3 2 4、3 2 5、3 5 7、3 7 6、4 0 4、4 0 6、4 3 1、および 5 1 0 からなる群から選択される少なくとも 1 つの位置のアミノ酸が野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼの対応する位置のアミノ酸と異なるアミノ酸配列を含むイン

50

フルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼを認識する、抗インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼ抗体。

(項目 3 2)

ストリンジェントな条件下で、項目 1 に記載のインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドの核酸配列とハイブリダイズすることが可能なヌクレオチドプローブまたはプライマー。

(項目 3 3)

項目 1 に記載のインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドを含む、発現系。

(項目 3 4)

プロモーターに作動可能に連結した項目 1 に記載のインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドを含むベクターを含む、項目 1 7 に記載の発現系。

(項目 3 5)

項目 1 8 に記載のベクターで、トランスフェクトされ、形質転換され、または形質導入されている、宿主細胞。

(項目 3 6)

mRNA ディスプレイ系である、項目 3 3 に記載の発現系。

(項目 3 7)

インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼをコードするポリヌクレオチドを含む、単離されたインフルエンザ A 型ウイルスバリエーションであって、306、323、324、325、357、376、404、406、431、および 510 からなる群から選択される少なくとも 1 つの位置の少なくとも 1 つのアミノ酸が、野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドの対応するアミノ酸と異なるアミノ酸をコードするように変異している、単離されたインフルエンザ A 型ウイルスバリエーション。

(項目 3 8)

患者において、インフルエンザ A 型ウイルス感染症のポリメラーゼ阻害剤に対する薬物耐性または感受性を評価するための方法であって、

a) 該インフルエンザ A 型ウイルスに感染した患者から生物学的試料を収集するステップと、

b) 該試料が、306、323、324、325、357、376、404、406、431、および 510 からなる群から選択される少なくとも 1 つの位置のアミノ酸が野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼの対応する各位置のアミノ酸と異なるアミノ酸配列を含むインフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼをコードする核酸を含むかどうかを評価するステップと

を含む、方法。

(項目 3 9)

患者において、インフルエンザ A 型ウイルス感染症に対する処置を指導するための方法であって、

a) 項目 3 8 に記載の方法に従い、該患者のポリメラーゼ阻害剤に対する薬物耐性または感受性を評価するステップと、

b) a) において評価した該薬物耐性または感受性に基づき、該患者に対して処置レジメンを最適化するステップと

を含む、方法。

(項目 4 0)

患者において、インフルエンザ A 型ウイルス感染症を処置するための候補化合物を同定するための方法であって、

a) 項目 3 7 に記載のインフルエンザ A 型ウイルスバリエーションに感染した試料を用意するステップと、

b) 該試料中の該インフルエンザ A 型ウイルスバリエーションの活性を阻害する前記候補化合物の能力をアッセイするステップと

を含む、方法。

10

20

30

40

50

(項目 4 1)

前記インフルエンザ A 型ウイルスバリエーションの活性が複製である、項目 4 0 に記載の方法。

(項目 4 2)

患者において、インフルエンザ A 型ウイルス感染症を処置または予防するための候補化合物を同定するための方法であって、

a) 項目 1 に記載のポリヌクレオチドを含むレプリコン RNA を用意するステップと、 b) 該候補化合物が、 a) の該レプリコン RNA の複製を阻害するかどうか決定するステップと

を含む、方法。

10

(項目 4 3)

患者において、インフルエンザ A 型ウイルス感染症を処置するための候補化合物を同定するための方法であって、

a) 項目 2 8 に記載の単離されたインフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼおよびポリメラーゼ基質を用意するステップであり、該ポリメラーゼおよび該基質が、細胞ベースの系または無細胞の系に存在する、ステップと、

b) 該基質の存在下で、該インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼを該候補化合物に接触させるステップと、

c) 該インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼ活性が減少しているかどうか決定するステップと

20

を含む、方法。

(項目 4 4)

患者において、インフルエンザ A 型ウイルス感染症を処置するための候補化合物を評価するための方法であって、

a) 項目 1 に記載のポリヌクレオチドおよび指標をコードする指標遺伝子を含むベクターを宿主細胞に導入するステップと、

b) 該宿主細胞を培養するステップと、

c) 該候補化合物の存在下および該候補化合物の非存在下で該指標を測定するステップとを含む、方法。

(項目 4 5)

30

患者において、インフルエンザ A 型ウイルス感染症を処置する方法であって、項目 4 0 から 4 3 のいずれかに記載の同定された化合物の薬学的有効量を該患者に投与するステップを含む、方法。

(項目 4 6)

機械可読性データがコードされたデータ記憶材料を含む機械可読性データ記憶媒体であって、該機械可読性データが、インフルエンザ A 型ウイルスバリエーションまたは生物学的試料に関連する少なくとも 2 つの特色に対するインデックス値を含み、該特色が、

a) ポリメラーゼ阻害剤に対する感受性の低下に対する耐性を示す能力、

b) 3 0 6、3 2 3、3 2 4、3 2 5、3 5 7、3 7 6、4 0 4、4 0 6、4 3 1、および 5 1 0 からなる群から選択される少なくとも 1 つの位置のアミノ酸が野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼの対応する位置のアミノ酸と異なるアミノ酸配列を含む、インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼ、

40

c) 患者の罹患率または回復の可能性、ならびに

d) 該インフルエンザ A 型ウイルスバリエーションの変更された複製能 (増加または低減) からなる群から選択される、機械可読性データ記憶媒体。

(項目 4 7)

インフルエンザ A 型ウイルスに感染した患者において、インフルエンザ A 型ウイルスバリエーションのプロファイルを得る方法であって、

a) 該患者から血漿試料を得るステップと、

b) 該血漿試料からの少なくとも 2 個のインフルエンザ A 型ウイルスピリオンから、イン

50

フルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼのヌクレオチド配列を決定するステップとを含む、方法。

(項目 4 8)

少なくとも 2 0 個のインフルエンザ A 型ウイルスビリオンが同定された、項目 4 7 に記載の方法。

(項目 4 9)

少なくとも 5 0 個のインフルエンザ A 型ウイルスビリオンが同定された、項目 4 7 に記載の方法。

(項目 5 0)

少なくとも 1 0 0 個のインフルエンザ A 型ウイルスビリオンが同定された、項目 4 7 に記載の方法。

(項目 5 1)

少なくとも 2 0 0 個のインフルエンザ A 型ウイルスビリオンが同定された、項目 4 7 に記載の方法。

(項目 5 2)

少なくとも 5 0 0 個のインフルエンザ A 型ウイルスビリオンが同定された、項目 4 7 に記載の方法。

(項目 5 3)

インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼのヌクレオチド配列が、項目 1 に記載のポリヌクレオチドの配列を含む、項目 4 7 に記載の方法。

(項目 5 4)

前記患者が、ポリメラーゼ阻害剤で処置されている、項目 4 7 に記載の方法。

(項目 5 5)

少なくとも 2 つの血漿試料が、少なくとも 2 つの異なる時点で前記患者から得られる、項目 4 7 に記載の方法。

(項目 5 6)

生物学的試料中のインフルエンザ A 型ウイルスバリエーションの存在を検出するための方法であって、該生物学的試料中の、項目 1 に記載のポリヌクレオチドの存在を検出するステップを含む、方法。

(項目 5 7)

項目 3 1 に記載の抗体を含む、診断用キット。

(項目 5 8)

項目 3 2 に記載のヌクレオチドプローブまたはプライマーを含む、診断用キット。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 4 9 】

(発明の詳細な説明)

本発明は、インフルエンザ A 型ウイルスバリエーションに関する。特に、ポリメラーゼ阻害剤に対する耐性を示すインフルエンザ A 型ウイルスバリエーションが提供される。インフルエンザ A 型ウイルスバリエーションに関係した方法および組成物もまた提供される。方法および組成物は、インフルエンザ A 型ウイルスおよび他のウイルスのバリエーションを含む、ウイルスバリエーションを同定すること、抗ウイルス化合物を評価および同定すること、ならびにウイルス感染症に対する治療薬を開発および最適化することに有用である。

【 0 0 5 0 】

インフルエンザ A 型ウイルスバリエーションおよび関係するポリヌクレオチドおよびポリメラーゼ

【 0 0 5 1 】

本発明は、インフルエンザ A 型ウイルスバリエーションを提供する。特定の実施形態では、インフルエンザ A 型ウイルスバリエーションは、化合物 1 などのポリメラーゼ阻害剤に対する感受性を低下させたインフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼ (また「バリエーションインフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼ」とも呼ばれる) をコードするポリヌクレオチド配列

10

20

30

40

50

を含む。本明細書で使用する場合、野生型インフルエンザA型ウイルスとは、ポリメラーゼ阻害剤に対して正常または望ましい感受性を有するインフルエンザA型ウイルスポリメラーゼをコードするポリヌクレオチド（また「野生型ポリヌクレオチド」とも呼ばれる）を含むインフルエンザA型ウイルスを指し、特定の実施形態では、ポリメラーゼ阻害剤は化合物1である。同様に、野生型インフルエンザA型ウイルスポリメラーゼとは、ポリメラーゼ阻害剤に対して正常または望ましい感受性を有するインフルエンザA型ウイルスポリメラーゼを指し、特定の実施形態では、ポリメラーゼ阻害剤は化合物1である。

【0052】

一部の実施形態では、野生型インフルエンザA型ウイルスは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、野生型インフルエンザA型ウイルスは、配列番号1と少なくとも50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、97または99%の相同性を有するアミノ酸配列を含む。追加のインフルエンザA型ウイルス株は当技術分野で公知であり、National Center for Biotechnology Information (NCBI) (国立バイオテクノロジー情報センター)により提供されるGenBank配列データベースに見出すことができる。具体例として、インフルエンザA/Wisconsin/67/2005:PB2 759 aaタンパク質 - AHG97066.1、AHG97054.1、AHG97042.1、AHG97006.1など；A/Puerto Rico/8/34:PB2 759 aaタンパク質 - AAM75155.1；A/California/07/2009:PB2 759 aaタンパク質 - AFM72841.1、ACQ63273.1、ACP44175.1、ACP41956.1；A/Hamburg/NY1580/2009(H1N1)PB2ドメイン遺伝子 - GU480807.1；およびA/turkey/Ontario/FAV110/2009(H1N1)PB2ドメイン遺伝子 - HM370957.1、HM370972.1が挙げられる。

【0053】

「インフルエンザウイルス媒介性の状態」、「インフルエンザ感染症」、「インフルエンザ(Influenza)」、または「インフルエンザ(flu)」という用語は、本明細書で使用する場合、交換可能に使用され、インフルエンザウイルスによる感染によって引き起こされる疾患を意味する。

【0054】

インフルエンザとは、インフルエンザウイルスにより引き起こされる、トリおよび哺乳動物に影響を与える感染性疾患である。インフルエンザウイルスは、OrthomyxoviridaeファミリーのRNAウイルスであり、これは、5つの属を含む：インフルエンザウイルスA型、インフルエンザウイルスB型、インフルエンザウイルスC型、イサウイルスおよびトゴウイルス。インフルエンザウイルスA属は、1つの種、インフルエンザA型ウイルスを有し、これらのウイルスに対する抗体応答に基づき異なる血清型に細分化することができる：H1N1、H2N2、H3N2、H5N1、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3およびH10N7。インフルエンザウイルスB属は、1つの種、インフルエンザB型ウイルスを有する。インフルエンザB型は、ほぼ独占的にヒトに感染し、インフルエンザA型より一般的ではない。インフルエンザウイルスC属は、1つの種、インフルエンザウイルスC型ウイルスを有し、ヒトおよびブタに感染し、重症の疾病および局所的な流行病を引き起こす可能性がある。しかし、インフルエンザウイルスC型は、他の型より一般的ではなく、通常子供において軽度の疾患を引き起こすようである。

【0055】

本発明の一部の実施形態では、インフルエンザまたはインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルスA型またはB型に関連する。本発明の一部の実施形態では、インフルエンザまたはインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルスA型に関連する。本発明の一部の具体的な実施形態では、インフルエンザウイルスA型はH1N1、H2N2、H3N2またはH5N1である。

【 0 0 5 6 】

ヒトにおいて、インフルエンザの一般的な症状は、寒気、発熱、咽頭炎、筋痛、重症の頭痛、咳嗽、衰弱、および一般的な不快感である。より重篤な症例では、インフルエンザは、特に幼い子供および高齢者において致死性となり得る肺炎を引き起こす。感冒と混同されることが多いが、インフルエンザは、はるかに重症の疾患であり、異なる型のウイルスにより引き起こされる。インフルエンザにより、特に子供において、悪心および嘔吐が生じ得るが、これらの症状は関係のない胃腸炎の特徴をさらに示し、時には「胃インフルエンザ (stomach flu)」または「24時間インフルエンザ (24-hour flu)」と呼ばれる。

【 0 0 5 7 】

インフルエンザの症状は、感染の1～2日後、かなり突然始まる可能性がある。通常、最初の症状は、寒気または寒気がする感覚であるが、発熱もまた感染早期には一般的であり、体温は38～39の範囲である(約100～103°F)。多くの人々は、ひどく気分が悪いので、数日間ベッドで寝たきりとなり、身体全体にわたり痛みおよび疼痛があり、これらは、背中および脚においてよりひどい。インフルエンザの症状として、以下が挙げられる：身体の痛み、特に関節および喉、極端な寒さおよび発熱、疲労、頭痛、炎症を起こした涙目(irritated watering eyes)、赤くなった眼、皮膚(特に顔)、口、喉および鼻、腹痛(インフルエンザB型に罹った子供において)。インフルエンザの症状は、非特異的であり、多くの病原体と重複する(「インフルエンザ様疾病」)。通常、診断を裏付けるための検査室データが必要とされる。

【 0 0 5 8 】

「疾患」、「障害」、および「状態」という用語は、ここで交換可能に使用することができ、インフルエンザウイルス媒介性の医学的または病理学的な状態を指す。

【 0 0 5 9 】

本明細書で使用する場合、「被験体」および「患者」という用語は交換可能に使用される。「被験体」および「患者」という用語は、動物(例えば、ニワトリ、ウズラもしくはシチメンチョウなどのトリ、または哺乳動物)、具体的には、非霊長類(例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ウサギ、モルモット、ラット、ネコ、イヌ、およびマウス)および霊長類(例えば、サル、チンパンジーおよびヒト)を含む「哺乳動物」、さらに具体的にはヒトを指す。一実施形態では、被験体は、非ヒト動物、例えば、家畜(例えば、ウマ、ウシ、ブタまたはヒツジ)、またはペット(例えば、イヌ、ネコ、モルモットまたはウサギ)である。好ましい実施形態では、被験体は「ヒト」である。

【 0 0 6 0 】

「生物学的試料」という用語は、本明細書で使用する場合、限定ではないものの、細胞培養物またはその抽出物；哺乳動物から得た生検用材料またはその抽出物；血液、唾液、尿、糞、精液、涙、または他の体液またはそれらの抽出物を含む。

【 0 0 6 1 】

本明細書で使用する場合、「感染効率」または「MOI」は、感染因子(例えば、ファージまたはウイルス)と、感染標的(例えば、細胞)との比である。例えば、感染性ウイルス粒子を播種した細胞の群について言及している場合、感染効率またはMOIは、ウェル内に沈着した感染性ウイルス粒子の数を、そのウェル内に存在する標的細胞の数で割ったものにより定義される比である。

【 0 0 6 2 】

本明細書で使用する場合、「インフルエンザウイルスの複製の阻害」という用語は、ウイルス複製の量の減少(例えば、少なくとも10%の減少)と、ウイルス複製の完全な停止(すなわち、ウイルス複製の量の100%の減少)の両方を含む。一部の実施形態では、インフルエンザウイルスの複製は、少なくとも50%、少なくとも65%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%阻害される。

【 0 0 6 3 】

インフルエンザウイルス複製は、当技術分野で公知の任意の適切な方法により測定する

10

20

30

40

50

ことができる。例えば、生物学的試料（例えば、感染細胞培養物）またはヒト（例えば、患者内の肺ウイルス価）におけるインフルエンザウイルス価を測定することができる。より具体的には、細胞が *in vitro* で培養されるたびに、細胞ベースのアッセイに対して、ウイルスは、試験剤の存在下でまたは非存在下で培養物に加えられ、適切な長さの時間後、ウイルス依存性エンドポイントが評価される。典型的なアッセイに対して、Madin-Darbyイヌの腎臓細胞（MDCK）および標準組織培養に適応したインフルエンザ株、A/Puerto Rico/8/34を使用することができる。本発明において使用することができる第1のタイプの細胞アッセイは、ウイルス感染が、細胞資源の消耗および細胞の最終的な溶解を引き起こす、細胞変性効果（CPE）と呼ばれるプロセスである、感染した標的細胞の死亡に依存する。第1のタイプの細胞アッセイでは、マイクロタイタプレート（通常1/10～1/1000）のウェル内の低い分率の細胞を感染させて（通常1/10～1/1000）、ウイルスには、48～72時間にわたり数ラウンドの複製を繰り返し、次いで、非感染の対照と比較して、細胞のATP含有量の低減を使用して、細胞死の量を測定する。本発明で用いることができる第2のタイプの細胞アッセイは、感染細胞内でのウイルス特異的なRNA分子の増殖に依存し、分枝鎖DNAハイブリダイゼーション方法（bDNA）を使用してRNAレベルを直接測定する。第2のタイプの細胞アッセイでは、マイクロタイタプレートのウェル内で少数の細胞を最初に感染させ、ウイルスを感染細胞内で複製させ、細胞のさらなるラウンドへと拡散させ、次いで細胞が溶解し、ウイルスRNA含有量を測定する。このアッセイは、通常18～36時間後、早期に停止されるが、すべての標的細胞は依然として生存可能である。ウイルスRNAは、アッセイプレートのウェルに固定された特定のオリゴヌクレオチドプローブへのハイブリダイゼーションにより定量し、次いで、レポーター酵素に連結しているさらなるプローブを用いたハイブリダイゼーションによりシグナルを増幅する。

【0064】

本明細書で使用する場合、「ウイルス価」（または力価）とは、ウイルス濃縮の尺度である。力価試験は、段階希釈を用いて、正または負とだけ本質的に評価する分析手順からおおよその定量的情報を得ることができる。力価は、依然として正の測定値（reading）を生じる最大希釈係数に対応する；例えば、最初の8段階2倍希釈における正の測定値は、1：256の力価に変換される。具体例がウイルス価である。力価を決定するために、いくつかの希釈物、例えば、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、．．．、10⁻⁸を調製する。依然として細胞に感染するウイルスの最も低い濃度がウイルス価である。

【0065】

本明細書で使用する場合、「処置する」、「処置」、および「処置すること」という用語は、治療的処置と予防的処置の両方を指す。例えば、治療的処置は、1種または複数種の治療法（例えば、1種または複数種の治療剤、例えば、本発明の化合物または組成物）の投与から結果として生じる、インフルエンザウイルス媒介性状態の進行、重症度および/もしくは持続期間の減少もしくは寛解、またはインフルエンザウイルス媒介性状態の1つもしくは複数の症状（具体的には、1つまたは複数の認識できる症状）の寛解を含む。具体的な実施形態では、治療的処置は、インフルエンザウイルス媒介性状態の少なくとも1つの測定可能な物理的パラメーターの寛解を含む。他の実施形態では、治療的処置は、認識できる症状の安定化などによって物理的に、または物理的パラメーターの安定化などによって生理学的に、またはその両方でインフルエンザウイルス媒介性状態の進行を阻害することを含む。他の実施形態では、治療的処置は、インフルエンザウイルス媒介性感染症の減少または安定化を含む。インフルエンザをすでに有する人々を処置するために社会環境において抗ウイルス薬を使用することによって、症状の重症度を減少させ、病気の日数を減少させることができる。

【0066】

「化学療法」という用語は、障害または疾患を処置するための薬物治療、例えば、小分子薬（「ワクチン」ではない）の使用を指す。

【0067】

「予防法」または「予防的使用」および「予防的処置」という用語は、本明細書で使用する場合、その目的が、疾患を処置または治癒するというよりもむしろ予防することにある、任意の医学的なまたは公衆衛生手順を指す。本明細書で使用する場合、「予防する」、「予防」、および「予防すること」という用語は、病気ではないが、疾患に罹った人間の近くにいた、またはいる可能性のある被験体において、所与の状態を獲得もしくは発生するリスクを減少させること、または前記状態の再発を減少させることもしくは阻害することを指す。「化学的予防法」という用語は、障害または疾患の予防のための薬物治療、例えば小分子薬（「ワクチン」ではない）の使用を指す。

【0068】

本明細書で使用する場合、予防的使用は、重篤なインフルエンザ合併症のリスクが高い多くの人々が互いに密接に接触して居住する場所（例えば、病院の病棟、デイケアセンター、刑務所、介護施設など）において、感染の伝染または拡散を予防するために、集団発生が検出された状況において使用することを含む。予防的使用はまた、インフルエンザからの防御を必要とするが、ワクチン接種後に防御が得られない（例えば、弱い免疫系により）集団の間での、またはワクチンが利用不可能である場合の、または副作用によりワクチンを打つことができない場合の使用も含む。予防的使用はまた、ワクチン接種後の2週間の間の使用を含む。これは、その間ワクチンは依然として効果がないからである。予防的使用はまた、インフルエンザで病気にならない、または合併症に対して高いリスクがあると考えられない人間（例えば、保健医療従事者、介護施設職員など）を処置することによって、彼らがインフルエンザに感染し、この感染者と密接な接触のある高リスクの人間にインフルエンザを移す確率を減少させることを含み得る。

【0069】

US CDCによると、インフルエンザの「集団発生」とは、互いに近接近している人々の群の中で（例えば、介護付き施設の同じエリア内、同じ家族内など）正常なバックグラウンド率を超えて、または分析している集団の中の任意の被験体がインフルエンザの試験で陽性だった場合に、48～72時間の期間内に生じる急性熱性呼吸器疾患（AFRI）の突然の増加と定義される。任意の試験方法により確認されたインフルエンザの一例は集団発生と考えられる。

【0070】

「クラスター」とは、互いに近接近している人々（例えば、介護付き施設の同じエリア内、同じ家族内など）の群の中で、48～72時間の期間内で生じる、3つまたはそれ超のAFRI症例の群として定義される。

【0071】

本明細書で使用する場合、「発端者（index case）」、「一次症例」、または「患者第1号（patient zero）」は疫学的調査の集団試料の中の最初の患者である。疫学的調査においてこのような患者を指すように一般的に使用される場合、用語は大文字で書かれない。用語が、特定の調査についての報告の中で、その人間の名前の代わりに特定の人間を指すように使用される場合、用語は患者第1号（Patient Zero）として大文字で書かれる。多くの場合、科学者は、疾患がどのように拡散するか、集団発生の中で何のリザーバーが疾患を保持しているかを決定するために発端者を検索する。発端者は、集団発生の存在を示す最初の患者であることに注目されたい。早期症例が見出されることもあり、これらは、一次、二次、三次などと標識される。

【0072】

一実施形態では、本発明の方法は、インフルエンザウイルスの感染により生じる合併症の素因を有する患者、具体的にはヒトに対する、予防または「先制」手段である。「先制」という用語は、例えば、先制的使用において、「先制的に」など、本明細書で使用する場合、「発端者」または「集団発生」が確認されている状況において、残りの地域社会または集団群における感染の拡散を予防するための予防的使用である。

【0073】

別の実施形態では、本発明の方法は、地域社会または集団群のメンバー、具体的にはヒ

10

20

30

40

50

トに対して、感染の拡散を予防するための「先制」手段として適用される。

【0074】

本明細書で使用する場合、「有効量」とは、所望の生物学的応答を誘発するのに十分な量を指す。本発明において、所望の生物学的応答とは、インフルエンザウイルスの複製を阻害する、インフルエンザウイルスの量を減少させる、またはインフルエンザウイルス感染症の重症度、持続期間、進行、もしくは発症を減少させるもしくは寛解させる、インフルエンザウイルス感染症の前進を予防する、インフルエンザウイルス感染症に関連する症状の再発、発生、発症もしくは進行を予防する、またはインフルエンザ感染症に対して使用される別の治療法の予防効果（複数可）または治療効果（複数可）を増強もしくは改善することである。被験体に投与される化合物の正確な量は、投与モード、感染症のタイプおよび重症度ならびに被験体の特徴、例えば、全般的な健康状態、年齢、性別、体重および薬物に対する耐容性に依存する。当業者であれば、これらのおよび他の因子に応じて適当な投薬量を決定することができる。他の抗ウイルス剤と共投与される場合、例えば、抗インフルエンザ薬物治療と共投与される場合、第2の薬剤の「有効量」は、使用される薬物のタイプに依存する。適切な投薬量は、承認された薬剤に対して公知であり、被験体の状態、処置している状態（複数可）のタイプおよび使用している本明細書に記載の化合物の量に従い当業者により調整することができる。量が明示的に述べられていない場合、有効量は想定されるべきである。例えば、本明細書に記載の化合物は、治療的または予防的処置のために、約0.01～100mg/kg体重/日の範囲の投薬量で被験体に投与することができる。

10

20

【0075】

一般的に、投薬量レジメンは、処置している障害および障害の重症度；用いる特定の化合物の活性；用いる特定の組成物；患者の年齢、体重、全般的な健康状態、性別および食事；投与の時間、投与経路、および用いる特定の化合物の排出速度；被験体の腎臓および肝臓機能；ならびに用いる特定の化合物またはその塩、処置の持続期間；用いる特定の化合物と組み合わせてまたは同時に使用される薬物、ならびに医学分野において周知の同様の因子を含む様々な因子に従い選択することができる。当業者であれば、疾患の進行を処置、予防、阻害（完全または部分的に）または停止するのに必要とされる有効量の本明細書に記載の化合物を容易に決定および処方することができる。

【0076】

本明細書に記載の化合物の投薬量は、約0.01～約100mg/kg体重/日、約0.01～約50mg/kg体重/日、約0.1～約50mg/kg体重/日、または約1～約25mg/kg体重/日の範囲とすることができる。1日当たりの総量は、単回用量で投与することもでき、複数回投与で、例えば、1日2回（例えば、12時間ごと）、1日3回（例えば、8時間ごと）、または1日4回（例えば、6時間ごと）投与することもできることを理解されたい。

30

【0077】

治療的処置に対して、本明細書に記載の化合物は、症状の発症（例えば、鼻詰まり、のどの痛み、咳、痛み、疲労、頭痛、および寒気/汗）から例えば、48時間以内（または40時間以内、または2日未満、または1.5日未満、または24時間以内）に患者に投与することができる。治療的処置は、任意の適切な持続期間、例えば、5日間、7日間、10日間、14日間など、持続することができる。地域社会での集団発生中の予防的処置のため、本明細書に記載の化合物は、発端者における症状の発症の例えば、2日以内に患者に投与することができ、任意の適切な期間、例えば、7日間、10日間、14日間、20日間、28日間、35日間、42日間など、継続することができる。

40

【0078】

本発明では、様々なタイプの投与方法を用いることができ、「投与方法」と表題が付いたセクションにおいて以下に詳細に記載されている。

【0079】

本発明はまた、単離されたインフルエンザA型ウイルスバリエーション、単離されたバリア

50

ントインフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼ、およびバリエーションインフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼをコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。「単離された」という用語は、自然の環境の対象ウイルス、プロテアーゼ、またはポリヌクレオチドの構成成分から分離および/または回収されたことを一般的に意味する。

【0080】

ある特定の実施形態では、バリエーションインフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼは、野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼの 306、323、324、325、357、376、404、406、431、および 510 位からの 1 つまたは複数の位置のアミノ酸（複数可）が野生型インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼのそれぞれ対応する位置のアミノ酸と異なるアミノ酸配列を含む、バリエーションインフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼであってよい。

10

【0081】

例えば、本発明のバリエーションインフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼを作製するための発現系が提供される。発現系は、本発明のインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含み得る。本発明のインフルエンザ A 型ウイルスポリヌクレオチド（または「核酸」、本明細書で交換可能に使用される）を含む適切な原核性または真核性ベクター（例えば、発現ベクター）は、ポリヌクレオチドが 1 つまたは複数の発現制御エレメントに（例えば、ベクター内で、または宿主細胞ゲノムに組み込まれて）作動可能に連結するように、適当な方法（例えば、形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーション、感染）で適当な宿主細胞に導入することができる。生成のため、宿主細胞は、発現に対して適当な条件下（例えば、誘導物質の存在下での適当な塩、増殖因子、抗生物質、栄養補助剤などを補充した適当な培地）で維持することができ、これによってコードされたポリペプチドが生成される。所望する場合、コードされたタンパク質は、回収および/または単離（例えば、宿主細胞または培地から）することができる。生成の方法は、トランスジェニック動物の宿主細胞における発現を包含することを理解されたい（例えば、WO 92 103918 を参照されたい）。発現系は、無細胞の系、例えば、米国特許第 6,258,558 号に記載されている RNA-タンパク質融合技術、または米国特許第 6,361,943 号に記載されている *in vitro* 「ウイルス」に基づくことができる。米国特許第 5,843,701 号に記載されている方法などのリボソームディスプレイ法もまた使用することができる。

20

30

【0082】

様々なアッセイ、例えば、インフルエンザ A 型ウイルスを表現型判定するのに適切なアッセイが提供される。アッセイは、ウイルス活性（例えば、ウイルス粒子の感染、複製、および/または放出）または酵素活性（例えば、ポリメラーゼ活性）を測定することを対象とし得る。ウイルス活性アッセイは、その活性を測定することになるウイルスまたはウイルスバリエーションに感染させた細胞または試料を用いることができる。細胞または試料は、患者、例えば、ヒト患者から得ることができる。代わりに、細胞または試料を、ウイルスまたはウイルスバリエーションとともに *in vitro* で培養し、ウイルスまたはウイルスバリエーションで感染させることもできる。ウイルス活性アッセイは、レプリコンベースの系を用いることができる。

40

【0083】

酵素活性は、目的の酵素または生物学的に活性な断片もしくはその類似体および目的の酵素に対する基質を一般的に含む無細胞のまたは細胞ベースの系において決定することができる。

【0084】

ある特定の実施形態では、同定された化合物は、化合物および薬学的に許容されるキャリア、アジュバントまたはビヒクルを含む組成物へと製剤化する。好ましくは、組成物は、インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼの活性を減少させるのに有効な量の化合物を含有する。さらにより好ましくは、組成物は、患者への投与のために製剤化する。組成物はまた、免疫調節剤；抗ウイルス剤；インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼの第 2 の

50

阻害剤；インフルエンザA型ウイルスライフサイクルにおける別の標的の阻害剤；またはそれらの組合せから選択される追加の薬剤も含み得る。様々な組成物が、以下により詳細に記載されている。

【0085】

別の態様では、本発明は、インフルエンザA型ウイルスポリメラーゼ、特に、野生型インフルエンザA型ウイルスポリメラーゼと比較して、1つまたは複数の変更されたアミノ酸を有するインフルエンザA型ウイルスポリメラーゼに特異的である抗体を提供する。「抗体」という用語は、最も幅広い意味で使用され、これらが所望の生物学的活性を示す限り、限定ではないものの、インタクトなモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、少なくとも2種のインタクトな抗体から形成された多特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、および抗体断片を具体的に網羅する。「免疫グロブリン」という用語は、必ずしも抗体ではない様々な構造的に関係するタンパク質を含む。

10

【0086】

「抗体断片」は、インタクトな抗体の一部分、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。抗体断片の例として、Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFv断片；ダイアボディ；線状抗体；単鎖抗体分子；ならびに抗体断片から形成される多特異性抗体が挙げられる。「単鎖Fv」または「scFv」抗体断片は、抗体のVHおよびVLドメインを含み、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖内に存在する。好ましくは、Fvポリペプチドは、scFvが抗原結合のための所望の構造を形成するのを可能にするVHとVLドメインの間のポリペプチドリンカーをさらに含む。

20

【0087】

「ダイアボディ」という用語は、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片を指し、この断片は、同じポリペプチド鎖（VHVL）内の軽鎖可変ドメイン（VL）に結合している重鎖可変ドメイン（VH）を含む。同じ鎖上の2つのドメイン間での対形成を可能にするには短すぎるリンカーを使用することによって、ドメインは、別の鎖の相補ドメインと対になることを強制され、2つの抗原-結合部位を作り出す。

【0088】

バリエーションインフルエンザA型ウイルスポリメラーゼに対する抗体は、例えば、分子進化によってインフルエンザA型ウイルスタンパク質に対する公知の抗体から開発することができる。アミノ酸配列バリエーションは、適当なヌクレオチド変化を公知の抗体のDNAに導入することにより、またはペプチド合成により調製する。このようなバリエーションとして、例えば、公知の抗体のアミノ酸配列からの残基の欠失、および/またはアミノ酸配列への残基の挿入、および/またはアミノ酸配列内での残基の置換が挙げられる。欠失、挿入、および置換の任意の組合せを行うことによって、最終構築物に到達するが、ただし、最終構築物は、所望の特徴を保有する。アミノ酸変化はまた、抗体の翻訳後のプロセスを変更する、例えば、グリコシル化部位の数または位置を変化させることができる。

30

【0089】

本発明の抗体は、診断ならびに治療適用を有することができる。ある特定の実施形態では、本発明の抗体は標識される。本開示の様々な抗体を使用して、バリエーションインフルエンザA型ウイルスポリメラーゼの発現を検出または測定することができ、したがって、これらはまた、診断または研究目的のための細胞選別および画像化（例えば、フローサイトメトリー、および蛍光活性化細胞選別）などの適用において有用である。本明細書で使用する場合、「標識」または「標識した」という用語は、抗体内の別の分子の組込みを指す。一実施形態では、標識は、検出可能なマーカー、例えば、放射標識したアミノ酸の組込み、またはマークを付けたアビジン（例えば、光学的方法または比色分析法により検出することができる蛍光マーカーまたは酵素活性を含有するストレプトアビジン）により検出することができるピオチニル部分のポリペプチドへの結合である。別の実施形態では、標識またはマーカーは、治療薬、例えば、薬物コンジュゲートまたは毒素であることができる。ポリペプチドおよび糖タンパク質を標識する様々な方法が、当技術分野で公知であり、使用することができる。ポリペプチドに対する標識の例として、これらに限定されない

40

50

が、以下が挙げられる：放射性同位体または放射性核種（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I ）、蛍光標識（例えば、FITC、ローダミン、ランタニドリン光体）、酵素的標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ペーカ - ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、化学発光性マーカー、ビオチニル基、二次レポーターで認識される既定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体に対する結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）、ガドリニウムキレートなどの磁気剤、百日咳毒素などの毒素、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テニポシド（tenoposide）、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1 - デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびビュロマイシンならびにそれらの類似体または相同体。一部の実施形態では、標識は、潜在的な立体障害を減少させるために様々な長さのスペーサーアームによって結合される。

【0090】

ある特定の態様では、生物学的試料中のインフルエンザA型ウイルス、バリエーションインフルエンザA型ウイルスポリヌクレオチド、またはバリエーションインフルエンザA型ウイルスポリメラーゼの存在の検出に使用するためのキットもまた調製することができる。このようなキットは、本発明のバリエーションインフルエンザA型ウイルスポリメラーゼを認識する抗体、ならびに抗体と、バリエーションポリメラーゼまたはその一部分との間の複合体の存在を検出するのに適切な1つまたは複数の補助試薬を含んでもよい。代わりに、このようなキットは、本発明のプロブまたはプライマーを含んでもよく、このようなプロブまたはプライマーは、ストリンジェントな条件下で、本発明のバリエーションインフルエンザA型ウイルスポリヌクレオチドとハイブリダイズさせることができる。本発明のプロブまたはプライマーは、目的の対象を検出するために用いることができるPCRまたはRT-PCRに対して適切であり得る。代わりに、このようなキットは、商業的に利用可能な、PCRまたは非PCRベースのインフルエンザA型ウイルス診断用キットに基づくものであってもよい。

【0091】

本発明の別の態様は、本発明の化合物、例えば、ポリメラーゼ阻害剤の活性を救済することができるものとして同定された二次化合物、またはインフルエンザA型ウイルスバリエーションに対して有効であると同定された化合物（例えば、ウイルスバリエーションの複製を減少させることが可能）および/もしくはバリエーションインフルエンザA型ウイルスポリメラーゼに対して有効であると同定された化合物（例えば、バリエーションポリメラーゼの酵素活性を減少させることが可能）を含む医薬組成物または製剤を提供する。

【0092】

本発明の別の態様は、医薬、例えば、患者において、インフルエンザA型ウイルス感染症を処置するための医薬の製造における本発明の化合物の使用を提供する。

【0093】

本発明の別の態様は、患者において、インフルエンザA型ウイルス感染症を処置するための方法を提供する。このような方法は、本発明の化合物の薬学的有効量または治療有効量を、単独でまたは別の抗ウイルス剤と組み合わせて（逐次または同時期に）患者に投与するステップを一般的に含む。化合物または薬剤の「有効量」とは、一般的に、インフルエンザA型ウイルスポリメラーゼの発現もしくは活性、インフルエンザA型ウイルスの生成、複製、もしくは病毒性、インフルエンザA型ウイルス感染症を再現性よく減少させる、またはこのような化合物もしくは薬剤がない場合のこれらのパラメーターのレベルと比較して、インフルエンザA型ウイルス感染症の1つもしくは複数の症状の寛解または軽減をもたらすのに有効な量を指す。

【0094】

別の態様では、本発明の方法および組成物は、ポリメラーゼ阻害剤および別の抗ウイル

10

20

30

40

50

ス剤、好ましくは抗インフルエンザA型ウイルス剤を含む。インフルエンザA型ウイルスを標的とする併用治療法はまた、WO 2010/148197にも記載されている。

【0095】

本明細書で使用する場合、「組み合わせて」または「共投与」という用語は、交換可能に使用して、1つより多くの治療法（例えば、1つまたは複数の予防剤および/または治療剤）の使用を指すことができる。その用語の使用は、治療法（例えば、予防剤および/または治療剤）が被験体に施行される順序を制限しない。

【0096】

共投与は、例えば、単一の医薬組成物、例えば、第1の量と第2の量との固定比を有するカプセル剤もしくは錠剤で、またはそれぞれに対する複数の、別個のカプセル剤もしくは錠剤で、本質的に同時方式で化合物の第1のおよび第2の量が共投与される投与を包含する。加えて、このような共投与はまた、いずれかの順序で、逐次的な方式で各化合物を使用することも包含する。

【0097】

本明細書で使用する場合、「相乗的」という用語は、治療法の相加効果よりも有効である、本発明の化合物と別の治療法（例えば、予防剤または治療剤）の組合せを指す。治療法の組合せ（例えば、予防剤または治療剤の組合せ）の相乗効果は、1つもしくは複数の治療法のより低い投薬量の使用および/または前記治療法の被験体へのより低い頻度の投与を可能にすることができる。より低い投薬量の治療法（例えば、予防剤または治療剤）を利用する、および/またはより低い頻度で前記治療法を施行する能力は、障害の予防、管理または処置における前記治療法の効力を減少させることなく、被験体に前記治療法の施行と関連する毒性を減少させることができる。加えて、相乗効果は、障害の予防、管理または処置において薬剤の改善された効力をもたらすことができる。最後に、治療法の組合せ（例えば、予防剤または治療剤の組合せ）の相乗効果は、いずれかの治療法を単独で使用するものと関連する有害なまたは望ましくない副作用を回避するまたは減少させることができる。

【0098】

相乗効果の存在は、薬物相互作用を評価するための適切な方法を使用して決定することができる。適切な方法は、例えば、Sigmoidal-E_{max}方程式（Holford, N.H.G. およびScheiner, L.B., Clin. Pharmacokinet., 6巻: 429~453頁（1981年））、Loewe相加方程式（Loewe, S. およびMuischnek, H., Arch. Exp. Pathol Pharmacol., 114巻: 313~326頁（1926年））および半有効方程式（median-effect equation）（Chou, T.C. およびTalalay, P., Adv. Enzyme Regul., 22巻: 27~55頁（1984年））を含む。上に言及した各方程式は、実験データに適用して、対応するグラフを生成し、薬物の組合せの効果を評価するのに補助することができる。上に言及した方程式に関連する対応するグラフは、それぞれ濃度-効果曲線、イソボログラム曲線および組合せ指数曲線（combination index curve）である。

【0099】

本明細書に記載の化合物と共投与することができる具体例としてノイラミニダーゼ阻害剤、例えば、オセルタミビル（Tamiflu（登録商標））およびザナミビル（Relenza（登録商標））；ウイルスイオンチャネル（M2タンパク質）遮断剤、例えば、アマンタジン（Symmetrel（登録商標））およびリマンタジン（Flumadine（登録商標））；ならびにToyama Chemical of Japanで開発中のT-705を含めた、WO 2003/015798に記載されている抗ウイルス薬が挙げられる。（Rurutaら、Antiviral Research, 82巻: 95~102頁（2009年）、「T-705 (flavipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections」も参照されたい）。一部の実施形態では、本明細書に記載の化合物は、従来のインフルエンザワクチンと共投与することができる。

【0100】

本発明の方法または組合せを任意の特定の剤形または管理（regime）に限定するものは

10

20

30

40

50

本明細書において何もない。したがって、本発明による組合せの各構成成分は、別々に、一緒に、逐次もしくは同時に、またはそれらの任意の組合せで投与することができる。

【0101】

前述の分子についての製剤、用量、および投与経路は当技術分野で周知である。代わりに、インフルエンザA型ウイルスの抗ウイルス活性、特にインフルエンザA型ウイルスの薬物耐性株に対する抗ウイルス活性を示す化合物が一度同定されると、その化合物の薬学的有効量は、当業者に周知の技法を使用して決定することができる。したがって、このような化合物の適当な製剤、用量範囲、および投薬量レジメンは、常習的方法で簡単に決定することができる。

【0102】

本発明の併用治療法に関係した組成物は、1種より多くの治療剤を含有する製剤と同時にもしくは逐次投与される別個の薬学的に許容される製剤、または単剤および多剤の製剤の取合せのいずれかで、細胞（単数または複数）、またはヒト患者に提供され得る。投与経路に関わらず、これらの薬物の組合せは、薬学的に許容される製剤の構成成分の抗インフルエンザA型ウイルス有効量を形成する。

【0103】

免疫調節物質および免疫賦活剤の存在下で、本発明のインフルエンザA型ウイルスポリメラーゼ阻害剤のインフルエンザA型ウイルス抗ウイルス有効性が増強した場合には、本明細書で想定される方法および組成物においてこれらのインフルエンザA型ウイルスポリメラーゼ阻害剤の減少させた量を用いることができる。このような減少させた量は、治療を受けている感染患者において、インフルエンザA型ウイルス価を常習的なモニタリングによって決定することができる。これは、例えば、スロット-プロット、ドット-プロット、もしくはRT-PCR技法により患者の血清中のインフルエンザA型ウイルスRNAをモニタリングすることによって、またはインフルエンザA型ウイルスの表面抗原もしくは他の抗原の測定によって行うことができる。患者は、本明細書で開示されているインフルエンザA型ウイルスポリメラーゼ阻害剤および抗インフルエンザA型ウイルス活性を有する他の化合物を用いた併用治療法中に同様にモニタリングして、組み合わせて使用する場合のそれぞれの最も低い有効用量を決定することができる。

【0104】

患者の状態が改善されると、本発明の化合物、組成物または組合せの維持用量が必要に応じて投与され得る。続いて、投与の投薬量もしくは頻度、またはその両方は、症状の関数として、改善された状態が保持されるレベルまで減少させることができ、症状が所望のレベルまで軽減された場合、処置は停止されるべきである。しかし、患者は、疾患症状の任意の再発の際には長期的ベースで断続的処置を必要とし得る。

【0105】

任意の特定の患者に対する特定の投薬量および処置レジメンは、用いる特定の化合物の活性、年齢、体重、全般的な健康状態、性別、食事、投与の時間、排出速度、薬物の組合せ、および処置する医師の判断ならびに処置している特定の疾患の重症度を含めた様々な因子に依存する。活性成分の量はまた、特定の記載されている化合物ならびに組成物中の追加の抗ウイルス剤の存在または非存在および性質に依存する。

【0106】

別の実施形態によると、本発明は、本発明の薬学的に許容される組成物を患者に投与することによって、ウイルスのライフサイクルに必要な、ウイルスによりコードされたインフルエンザポリメラーゼにより特徴付けられたウイルスに感染した該患者を処置する、または該ウイルスによる感染症を予防するための方法を提供する。好ましくは、本発明の方法は、インフルエンザA型ウイルス感染症に罹患した患者を処置するために使用される。このような処置は、ウイルス感染症を完全に根絶するか、またはその重症度を減少させることができる。

【0107】

別の実施形態では、本発明の化合物は、ウイルスによりコードされたインフルエンザA

10

20

30

40

50

型ウイルスポリメラーゼの単離を補助するための実験室ツールとして使用することができる。この方法は、固体支持体に結合している本発明の化合物を用意するステップと、前記ポリメラーゼの前記固体支持体への結合を引き起こす条件下で、前記固体支持体を、インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼを含有する試料に接触させるステップと、前記固体支持体から前記インフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼを溶出するステップとを含む。好ましくは、この方法で単離されたウイルスポリメラーゼは P B 2 ポリメラーゼである。より具体的には、これは、ポリメラーゼ阻害剤による処置に耐性がある変異体 P B 2 ポリメラーゼである。例示的なこのようなポリメラーゼとして、3 0 6、3 2 3、3 2 4、3 2 5、3 5 7、3 7 6、4 0 4、4 0 6、4 3 1、および / または 5 1 0 位で変異体（すなわち、非野生型）残基を有するような本明細書に記載のものが挙げられる。

10

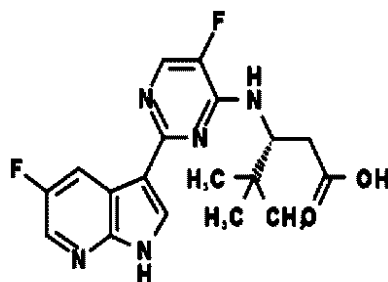
【 0 1 0 8 】

本発明の化合物

【 0 1 0 9 】

一部の実施形態では、上記で特定された任意の使用のためのインフルエンザ A 型ウイルスポリメラーゼ阻害剤は化合物 1、または薬学的に許容されるその塩である。

【 化 1 】



20

化合物 1

【 0 1 1 0 】

さらに別の実施形態では、本明細書に記載の化合物または薬学的に許容されるその塩は、生物学的試料（例えば、感染細胞培養物）またはヒト（例えば、患者における肺ウイルス価）におけるウイルス価を減少させるために使用することができる。

30

【 0 1 1 1 】

薬学的に許容される塩、溶媒和物、クラスレート（chlate）、プロドラッグおよび他の誘導体

【 0 1 1 2 】

本明細書に記載の化合物は、遊離形態で、または、適切な場合には、塩として存在することができる。薬学的に許容されるような塩は、これらが医学的目的のための以下に記載の化合物を投与するのに有用であることから、特に重要である。薬学的に許容されない塩は製造プロセスにおいて、単離および精製目的のために、一部の場合には、本発明の化合物またはその中間体の立体異性形態を分離するのに使用するのに有用である。

40

【 0 1 1 3 】

本明細書で使用する場合、「薬学的に許容される塩」という用語は、健全な医学的判断の範囲内で、毒性、刺激、アレルギー応答などの過度の副作用なしにヒトおよび下等動物の組織と接触させて使用するのに適切であり、妥当な利益 / リスク比に見合う化合物の塩を指す。

【 0 1 1 4 】

薬学的に許容される塩は当技術分野で周知である。例えば、S. M. Bergeらは、J. Pharmaceutical Sciences、1977年、66巻、1～19頁において薬学的に許容される塩を詳細に記載しており、これは本明細書に参照により組み込まれている。本明細書に記載の化合物の薬学的に許容される塩として、適切な無機酸および無機塩基ならびに有機

50

酸および有機塩基由来のものが挙げられる。これらの塩は、化合物の最終単離および精製の間 *in situ* で調製することができる。

【0115】

本明細書に記載の化合物が塩基性基、または十分に塩基性の生物学的等価体 (bioisostere) を含有する場合、酸付加塩は、1) その遊離塩基形態の精製された化合物を、適切な有機酸または無機酸と反応させ、2) こうして形成された塩を単離することによって調製することができる。実際には、酸付加塩は、使用に対してさらに便利な形態であってもよく、塩の使用は、遊離塩基の形態の使用に相当する。

【0116】

薬学的に許容される、無毒性酸付加塩の例は、無機酸、例えば、塩酸、臭化水素酸、リン酸、硫酸および過塩素酸と、もしくは有機酸、例えば、酢酸、シュウ酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸、コハク酸もしくはマロン酸と、または当技術分野で使用される、イオン交換などの他の方法を使用することによって、形成されるアミノ基の塩である。他の薬学的に許容される塩として、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、ショウノウ酸塩、カンファースルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセロリン酸塩、グリコール酸塩、グルコン酸塩、グリコール酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキササン酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、2 - ヒドロキシ - エタンスルホン酸塩、ラクチン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2 - ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩 (palmoate)、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3 - フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、サリチル酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、p - トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩などが挙げられる。

【0117】

本明細書に記載の化合物がカルボキシ基または十分に酸性の生物学的等価体を含有する場合、塩基付加塩は、1) その酸形態の精製された化合物を、適切な有機塩基または無機塩基と反応させ、2) こうして形成された塩を単離することによって調製することができる。実際に、塩基付加塩の使用はさらに便利となり得るので、塩形態の使用は、遊離酸形態の使用に本質的に相当する。適当な塩基由来の塩として、アルカリ金属 (例えば、ナトリウム、リチウム、およびカリウム) 塩、アルカリ土類金属 (例えば、マグネシウムおよびカルシウム) 塩、アンモニウム塩および $N^+ (C_1 \sim 4 \text{ アルキル})_4$ 塩が挙げられる。本発明はまた、本明細書で開示されている化合物の任意の塩基性窒素含有基の四級化を想定している。水溶性または油溶性または分散性の生成物をこのような四級化により得ることができる。

【0118】

塩基性付加塩 (basic addition salt) として、薬学的に許容される金属塩およびアミン塩が挙げられる。適切な金属塩として、ナトリウム、カリウム、カルシウム、バリウム、亜鉛、マグネシウム、およびアルミニウムが挙げられる。ナトリウム塩およびカリウム塩が通常好ましい。さらに薬学的に許容される塩として、適当な場合、無毒性のアンモニウム、第四級アンモニウム、ならびにハロゲン化物、水酸化物、カルボキシレート、サルフェート、ホスフェート、ニトレート、低級アルキルスルホネートおよびアリールスルホネートなどの対イオンを使用して形成されるアミンカチオンが挙げられる。適切な無機塩基付加塩は、水素化ナトリウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化アルミニウム、水酸化リチウム、水酸化マグネシウム、水酸化亜鉛などを含む金属塩基から調製する。適切なアミン塩基付加塩は、医学的使用に対するこれらの低い毒性および許容性から、医薬品化学において頻繁に使用されるアミンから調製する。アンモニア、エチレンジアミン、N - メチル - グルカミン、リシン、アルギニン、オルニチン、

コリン、N、N' - ジベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、ジエタノールアミン、プロカイン、N - ベンジルフェネチルアミン、ジエチルアミン、ピペラジン、トリス（ヒドロキシメチル） - アミノメタン、水酸化テトラメチルアンモニウム、トリエチルアミン、ジベンジルアミン、エフェナミン、デヒドロアピエチルアミン、N - エチルピペリジン、ベンジルアミン、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、エチルアミン、塩基性アミノ酸、ジシクロヘキシルアミンなどである。

【 0 1 1 9 】

他の酸および塩基は、これら自体は薬学的に許容されないが、本明細書に記載の化合物およびこれらの薬学的に許容される酸付加塩または塩基付加塩を得るために中間体として有用な、塩の調製に用いることができる。

10

【 0 1 2 0 】

本発明は、異なる薬学的に許容される塩の混合物 / 組合せ、ならびに遊離形態および薬学的に許容される塩での化合物の混合物 / 組合せも含むことが理解されるべきである。

【 0 1 2 1 】

本明細書に記載の化合物に加えて、これらの化合物の薬学的に許容される溶媒和物（例えば、水和物）およびクラスレートもまた、本明細書で同定された障害を処置または予防するための組成物において用いることができる。

【 0 1 2 2 】

本明細書で使用する場合、「薬学的に許容される溶媒和物」という用語は、1つまたは複数の薬学的に許容される溶媒分子が、本明細書に記載の化合物の1つに会合することから形成される溶媒和物である。溶媒和物という用語は、水和物（例えば、半水和物、一水和物、二水和物、三水和物、四水和物など）を含む。

20

【 0 1 2 3 】

本明細書で使用する場合、「水和物」という用語は、非共有結合分子間力により結合した化学量論的または非化学量論的量的の水をさらに含む本明細書に記載の化合物またはその塩を意味する。

【 0 1 2 4 】

本明細書で使用する場合、「クラスレート」という用語は、その中にゲスト分子（例えば、溶媒または水）がトラップされた空間（例えば、チャネル）を含有する結晶格子の形態の本明細書に記載の化合物またはその塩を意味する。

30

【 0 1 2 5 】

本明細書に記載の化合物に加えて、これらの化合物の薬学的に許容される誘導体またはプロドラッグもまた、本明細書で同定された障害を処置または予防するための組成物において用いることができる。

【 0 1 2 6 】

「薬学的に許容される誘導体またはプロドラッグ」は、本明細書に記載の化合物の任意の薬学的に許容されるエステル、エステルの塩または他の誘導体もしくはその塩を含み、レシipientへ投与すると、これらは、本明細書に記載の化合物または活性が抑制されたその代謝物または残基を直接または間接的に提供することが可能である。特に好まれる誘導体またはプロドラッグは、このような化合物が患者に投与された場合、化合物のバイオアベイラビリティを増加させる（例えば、経口投与された化合物が、血液中にさらに容易に吸収されることを可能にすることによって）または親種と比べて、生物学的区画（例えば、脳またはリンパ系）へ親化合物の送達を増強させるものである。

40

【 0 1 2 7 】

本明細書で使用する場合および別段指摘されていない限り、「プロドラッグ」という用語は、生物学的条件下で（*in vitro*でまたは*in vivo*で）加水分解する、酸化する、または他の方法で反応して、本明細書に記載の化合物を提供することができる化合物の誘導体を意味する。プロドラッグは、生物学的条件下でのこのような反応により活性となることもできるし、これらの未反応の形態で活性を有することもできる。本発明

50

において想定されるプロドラッグの例として、これらに限定されないが、生物加水分解性部分、例えば、生物加水分解性アミド、生物加水分解性エステル、生物加水分解性カルバメート、生物加水分解性カーボネート、生物加水分解性ウレイド、および生物加水分解性ホスフェート類似体を含む本発明の化合物の類似体または誘導体が挙げられる。プロドラッグの他の例として、 $-NO$ 、 $-NO^2$ 、 $-ONO$ 、または $-ONO^2$ 部分を含む本明細書に記載の化合物の誘導体が挙げられる。プロドラッグは通常、周知の方法、例えば、Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery (1995年) 172～178頁、949～982頁 (Manfred E. Wolff編、第5版) で記載されているものを使用して調製することができる。

【0128】

「薬学的に許容される誘導体」とは、必要とする患者への投与により、本明細書の他に記載の化合物、またはその代謝物もしくは残基を直接または間接的に提供することが可能な付加体または誘導体である。薬学的に許容される誘導体の例として、これらに限定されないが、エステルおよびこのようなエステルの塩が挙げられる。

【0129】

本明細書に記載の化合物の薬学的に許容されるプロドラッグとして、限定ではないものの、エステル、アミノ酸エステル、リン酸エステル、金属塩およびスルホン酸エステルが挙げられる。

【0130】

医薬組成物

【0131】

本明細書に記載の化合物は、薬学的に許容されるキャリア、希釈剤、アジュバントまたはビヒクルをさらに含む医薬組成物へと製剤化することができる。一実施形態では、本発明は、上に記載されている本発明の化合物と、薬学的に許容されるキャリア、希釈剤、アジュバントまたはビヒクルとを含む医薬組成物に関する。一実施形態では、本発明は、有効量の本発明の化合物または薬学的に許容されるその塩と、薬学的に許容されるキャリア、希釈剤、アジュバントまたはビヒクルとを含む医薬組成物である。薬学的に許容されるキャリアとして、例えば、意図する投与形態に関して適切に選択され、かつ従来の薬務と一致する薬学的希釈剤、賦形剤またはキャリアが挙げられる。

【0132】

「有効量」は「治療有効量」および「予防的有効量」を含む。「治療有効量」という用語は、インフルエンザに感染した患者において、インフルエンザウイルス感染症を処置するおよび/または寛解させるのに有効な量を指す。「予防的有効量」という用語は、インフルエンザウイルス感染症の集団発生の確率または大きさを予防するおよび/または実質的に減らすのに有効な量を指す。有効量の具体例は、開示化合物の使用という表題の付いたセクションにおいて上に記載されている。

【0133】

薬学的に許容されるキャリアは、化合物の生物学的活性を過度に阻害しない不活性成分を含有し得る。薬学的に許容されるキャリアは、生体適合性、例えば、無毒性、非炎症性、非免疫原性である、または被験体への投与の際に他の所望しない反応もしくは副作用を欠くべきである。標準の医薬製剤技法を用いることができる。

【0134】

薬学的に許容されるキャリア、アジュバント、またはビヒクルは、本明細書で使用する場合、所望の特定の剤形に適合するような、任意のおよびすべての溶媒、希釈剤、または他の液体ビヒクル、分散助剤もしくは懸濁助剤、表面活性剤、等張剤、増粘剤もしくは乳化剤、防腐剤、固体結合剤、滑沢剤などを含む。Remington's Pharmaceutical Science s、第16版、E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980年) は、薬学的に許容される組成物の製剤化に使用される様々なキャリアおよびその調製のための公知の技法を開示している。任意の所望しない生物学的作用を生じることにより、または他の方法で薬学的に許容される組成物の任意の他の構成成分(複数可)と有害な方式

10

20

30

40

50

で相互作用するなど、任意の従来のキャリア媒体が本明細書に記載の化合物と不適合でない限り、その使用は、本発明の範囲内にあると想定される。本明細書で使用する場合、「副作用」という句は、治療法（例えば、予防剤または治療剤）の望ましくないおよび有害作用を包含する。副作用は常に望ましくないが、望ましくない作用は必ずしも有害ではない。治療法（例えば、予防剤または治療剤）による有害作用は、害があり、または不快であり、またはリスクを伴うこともある。副作用として、これらに限定されないが発熱、寒気、嗜眠、消化管毒性（胃のおよび腸の潰瘍およびびらんを含む）、悪心、嘔吐、神経毒性、腎毒性（nephrotoxicity）、腎臓毒性（renal toxicity）（乳頭壊死および慢性間質性腎炎などの状態を含む）、肝臓毒性（血清肝臓酵素レベルの上昇を含む）、骨髄毒性（白血球減少症、骨髄抑制、血小板減少症および貧血を含む）、ドライマウス、金属味、妊娠の延長、衰弱、傾眠、疼痛（筋痛、骨痛および頭痛を含む）、脱毛、無力症、めまい、錐体外路症状、アカシジア、心血管障害および性機能不全が挙げられる。

10

【0135】

薬学的に許容されるキャリアとしての役目を果たすことができる材料の一部の例として、これらに限定されないが、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、血清タンパク質（ヒト血清アルブミンなど）、緩衝物質（tween 80、ホスフェート、グリシン、ソルビン酸、またはソルビン酸カリウムなど）、植物飽和脂肪酸の部分的グリセリド混合物、水、塩または電解質（硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、または亜鉛塩など）、コロイド状シリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、ポリアクリレート、ワックス、ポリエチレン-ポリオキシプロピレン-ブロックポリマー、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、羊毛脂；糖、例えば、ラクトース、グルコースおよびスクロース；デンプン、例えば、トウモロコシデンプンおよびジャガイモデンプン；セルロースおよびその誘導体、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロースおよび酢酸セルロース；粉末状トラガカント；麦芽；ゼラチン；タルク；賦形剤、例えば、ココアバターおよび坐剤ワックス；油、例えば、ピーナッツ油、綿実油、ペニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油およびダイズ油；グリコール、例えば、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコール；エステル、例えば、オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチル；寒天；緩衝剤、例えば、水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウム；アルギン酸；発熱物質を含まない水；等張食塩水；リンガー液；エチルアルコール、およびリン酸緩衝溶液、ならびに他の無毒性相容性滑沢剤、例えば、ラウリル硫酸ナトリウムおよびステアリン酸マグネシウム、ならびに着色剤、離型剤、コーティング剤、甘味剤、香味剤および香料が挙げられ、防腐剤および酸化防止剤もまた、処方者の判断に従い組成物中に存在することができる。

20

30

【0136】

投与方法

【0137】

上に記載の化合物および薬学的に許容される組成物は、処置している感染症の重症度に応じて、ヒトおよび他の動物に、経口的に、直腸に、非経口的に、大槽内に、腔内に、腹腔内に、局所的に（粉剤・散剤（powder）、軟膏剤、またはドロップ剤として）、口腔から、口腔スプレー剤または鼻スプレー剤などとして投与することができる。

40

【0138】

経口投与のための液体剤形として、これらに限定されないが、薬学的に許容される乳剤、マイクロエマルジョン、液剤、懸濁剤、シロップ剤およびエリキシル剤が挙げられる。活性化合物に加えて、液体剤形は、当技術分野で一般的に使用される不活性希釈剤、例えば、水または他の溶媒、可溶化剤および乳化剤、例えば、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、油（特に、綿実油、ラッカセイ油、トウモロコシ油、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油、およびゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコールおよびソ

50

ルピタンの脂肪酸エステル、ならびにそれらの混合物などを含有し得る。不活性希釈剤に加えて、経口組成物はアジュバント、例えば、湿潤剤、乳化剤および懸濁化剤など、甘味剤、香味剤、および香料もまた含むことができる。

【0139】

注射用調製物、例えば、無菌の注射用水性または油性懸濁液を適切な分散剤または湿潤剤および懸濁化剤を使用して公知の技術に従い製剤化することができる。無菌の注射用調製物はまた、例えば、1, 3 - ブタンジオール中溶液としての、無毒性の非経口的に許容される希釈剤または溶媒中の無菌の注射用液剤、懸濁剤または乳剤であってもよい。中でも、用いることができる許容されるビヒクルおよび溶媒は、水、リンガー液、U.S.P. および等張性塩化ナトリウム溶液である。加えて、無菌の、固定油が、溶媒または懸濁媒として慣例的に用いられる。この目的のために合成モノグリセリドまたはジグリセリドを含む任意の無刺激の固定油を用いることができる。加えて、脂肪酸、例えば、オレイン酸が、注射剤の調製に使用される。

10

【0140】

注射用製剤は、例えば、細菌保持フィルターによる濾過により、または使用前に滅菌水もしくは他の無菌の注射用媒体中に溶解もしくは分散させることができる無菌の固体組成物の形態で滅菌剤を組み込むことによって無菌化することができる。

【0141】

本明細書に記載の化合物の効果を延ばすために、多くの場合、皮下注射または筋肉注射からの化合物の吸収を遅らせることが望ましい。これは、難水溶性を有する結晶質または非晶質の材料の液体懸濁物を使用することによって達成することができる。次いで、化合物の吸収速度はその溶解速度に依存し、ひいては、溶解速度は、結晶の大きさおよび結晶形態に依存し得る。代わりに、非経口的に投与される化合物形態の遅延吸収は、油ビヒクル中に化合物を溶解または懸濁させることによって達成される。注射用デポー形態は、生分解性ポリマー、例えば、ポリラクチド - ポリグリコリド中に化合物のマイクロカプセルマトリックスを形成することによって作製される。化合物とポリマーとの比および用いる特定のポリマーの性質に応じて、化合物の放出速度を制御することができる。他の生分解性ポリマーの例として、ポリ(オルトエステル)およびポリ酸(無水物)が挙げられる。デポー注射用製剤はまた、体組織と適合性のあるリポソームまたはマイクロエマルジョン中に化合物をエンタラップすることにより調製される。

20

30

【0142】

直腸または経膣投与のための組成物は、具体的には、周辺温度では固体であるが、体温では液体であり、したがって直腸または膣腔内で融解して、活性化合物を放出する、適切な無刺激性賦形剤またはキャリア、例えば、ココアバター、ポリエチレングリコールまたは坐剤ワックスと本明細書に記載の化合物を混合することによって調製することができる坐剤である。

【0143】

経口投与のための固体剤形として、カプセル剤、錠剤、丸剤、粉剤・散剤、および顆粒剤が挙げられる。このような固体剤形では、活性化合物は、少なくとも1種の不活性な、薬学的に許容される賦形剤もしくはキャリア、例えば、クエン酸ナトリウムもしくはリン酸二カルシウムおよび/または、a) 充填剤または増量剤、例えば、デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、およびケイ酸；b) 結合剤、例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリジノン、スクロース、およびアカシアなど；c) 保湿剤、例えば、グリセロール；d) 崩壊剤、例えば、寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモデンプンまたはタピオカデンプン、アルギン酸、ある特定のケイ酸塩、および炭酸ナトリウム；e) 溶解遅延剤、例えば、パラフィン；f) 吸収促進剤、例えば、第四級アンモニウム化合物；g) 湿潤剤、例えば、セチルアルコールおよびモノステアリン酸グリセロールなど；h) 吸収剤、例えば、カオリンおよびベントナイト粘土；ならびにi) 滑沢剤、例えば、タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、ならびにそれ

40

50

らの混合物と混合する。カプセル剤、錠剤および丸剤の場合、剤形はまた緩衝剤を含んでもよい。

【 0 1 4 4 】

ラクトースまたは乳糖ならびに高分子量のポリエチレングリコールなどの賦形剤を使用する軟質および硬質充填ゼラチンカプセル剤中の充填剤として、類似のタイプの固体組成物を用いることもできる。錠剤、糖衣錠、カプセル剤、丸剤、および顆粒剤の固体剤形は、コーティングおよびシェル、例えば、腸溶コーティングおよび医薬品製剤化技術において周知の他のコーティングを用いて調製することができる。これらは、不透明化剤を任意選択で含有してもよく、また、これらが活性成分（複数可）のみを、または優先的に、腸管のある特定の一部分において、任意選択で、遅延した方式で放出する組成物のものであることもできる。使用することができる包埋組成物の例として、ポリマー物質およびワックスが挙げられる。類似のタイプの固体組成物もまた、ラクトースまたは乳糖ならびに高分子量ポリエチレングリコールなどの賦形剤を使用して、軟質および硬質充填ゼラチンカプセル剤中の充填剤として用いることができる。

10

【 0 1 4 5 】

活性化化合物はまた、上述のような１種または複数種の賦形剤を用いたマイクロカプセル化形態であることもできる。錠剤、糖衣錠、カプセル剤、丸剤、および顆粒剤の固体剤形は、コーティングおよびシェル、例えば、腸溶コーティング、放出制御コーティングおよび医薬品製剤化技術で周知の他のコーティングを用いて調製することができる。このような固体剤形では、活性化化合物は、少なくとも１種の不活性希釈剤、例えば、スクロース、ラクトースまたはデンプンと混和することができる。このような剤形はまた、通常の慣行の通り、不活性希釈剤以外の追加の物質、例えば、錠剤化滑沢剤およびステアリン酸マグネシウムおよび微結晶性セルロースなどの他の錠剤化助剤を含むことができる。カプセル剤、錠剤および丸剤の場合、剤形はまた緩衝剤を含むこともできる。これらは、不透明化剤を任意選択で含有することができ、これらが活性成分（複数可）のみを、または優先的に、腸管のある特定の一部分において、任意選択で、遅延した方式で放出する組成物のものであることもできる。使用することができる包埋組成物の例として、ポリマー物質およびワックスが挙げられる。

20

【 0 1 4 6 】

本明細書に記載の化合物の局所的または経皮的投与のための剤形として、軟膏剤、ペースト剤、クリーム剤、ローション剤、ゲル剤、粉剤・散剤、液剤、スプレー剤、吸入剤またはパッチが挙げられる。活性成分は、無菌の条件下で、薬学的に許容されるキャリアおよび必要に応じて任意の必要とされる防腐剤または緩衝剤と混和する。眼用製剤、点耳剤、および点眼剤もまた本発明の範囲内にあると想定される。さらに、本発明は、化合物の身体へのコントロールドデリバリーを提供するという追加の利点を有する経皮的パッチの使用を想定している。このような剤形は、適切な媒体中に化合物を溶解または分配することによって作製することができる。吸収増強剤もまた、皮膚全体にわたって化合物の流動を増加させるために使用することができる。速度は、速度制御膜を提供することによって、またはポリマーマトリックスもしくはゲル中に化合物を分散させることによって制御することができる。

30

40

【 0 1 4 7 】

本明細書に記載の組成物は、経口的に、非経口的に、吸入スプレーにより、局所的に、直腸に、経鼻的に、口腔内頬側に（buccally）、経膣によりまたは埋め込みリザーバーを介して投与することができる。「非経口」という用語は、本明細書で使用する場合、これらに限定されないが、皮下、静脈内、筋肉内、関節内、関節滑液嚢内、胸骨内、髄腔内、肝臓内、病巣内および脳内の注射または注入の技法を含む。具体的には、組成物は、経口的に、腹腔内にまたは静脈内に投与される。

【 0 1 4 8 】

本明細書に記載の組成物の無菌の注射用形態は、水性または油性の懸濁剤であってよい。これらの懸濁剤は、適切な分散剤または湿潤剤および懸濁化剤を使用して、当技術分野

50

で公知の技法に従い製剤化することができる。無菌の注射用調製物はまた、例えば 1, 3 - ブタンジオール中溶液としての、無毒性の非経口的に許容される希釈剤または溶媒中の無菌の注射用液剤または懸濁剤であってもよい。中でも、用いることができる許容されるビヒクルおよび溶媒は、水、リンガー液および等張性塩化ナトリウム溶液である。加えて、無菌の、固定油が、溶媒または懸濁媒として慣例的に用いられる。この目的のために、合成モノグリセリドまたはジグリセリドを含む任意の無刺激の固定油を用いることができる。オレイン酸などの脂肪酸およびそのグリセリド誘導体は、特にこれらのポリオキシエチル化された形の天然の薬学的に許容される油、例えばオリーブ油またはヒマシ油と同様に注射剤の調製に有用である。これらの油の液剤または懸濁剤はまた、乳剤および懸濁剤を含めた薬学的に許容される剤形の製剤に一般的に使用される、長鎖アルコール希釈剤または分散剤、例えば、カルボキシメチルセルロースまたは類似の分散化剤を含有し得る。他の一般的に使用される界面活性剤、例えば、T w e e n、S p a n および他の乳化剤、または薬学的に許容される固体、液体、もしくは他の剤形の製造に一般的に使用されるバイオアベイラビリティ増強剤もまた製剤化の目的のために使用することができる。

【0149】

本明細書に記載の医薬組成物は、これらに限定されないが、カプセル剤、錠剤、水性懸濁剤または液剤を含めた任意の経口的に許容される剤形で経口投与することができる。経口使用のための錠剤の場合、一般的に使用されるキャリアとして、これらに限定されないが、ラクトースおよびトウモロコシデンプンが挙げられる。ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢化剤もまた通常加えられる。カプセル剤形態での経口投与に対して有用な希釈剤として、ラクトースおよび乾燥トウモロコシデンプンが挙げられる。水性懸濁剤が経口使用に必要とされる場合、活性成分を乳化剤および懸濁化剤と組み合わせる。所望する場合、ある特定の甘味剤、香味剤または着色剤もまた加えることができる。

【0150】

代わりに、本明細書に記載の医薬組成物は、直腸投与のための坐剤の形態で投与することができる。これらは、室温では固体ではあるが、直腸の温度では液体であり、したがって直腸内で融解して、薬物を放出する、適切な無刺激性賦形剤と薬剤を混合することによって調製することができる。このような材料として、これらに限定されないが、ココアバター、蜜ろうおよびポリエチレングリコールが挙げられる。

【0151】

本明細書に記載の医薬組成物はまた、眼、皮膚、または下部腸管の疾患を含めて、特に処置の標的が局所適用により容易に接触可能なエリアまたは器官を含む場合、局所的に投与することもできる。適切な局所用製剤は、これらのエリアまたは器官のそれぞれに対して容易に調製される。

【0152】

下部腸管に対する局所適用は、直腸の坐剤製剤（上記を参照されたい）または適切な浣腸製剤で実行することができる。局所経皮パッチもまた使用することができる。

【0153】

局所適用に対して、医薬組成物は、1 種または複数種のキャリア中に懸濁または溶解した活性構成成分を含有する適切な軟膏剤に製剤化することができる。本発明の化合物の局所投与のためのキャリアとして、これらに限定されないが、鉱油、液体ワセリン（liquid petrolatum）、白色ワセリン、プロピレングリコール、ポリオキシエチレン、ポリオキシプロピレン化合物、乳化ワックスおよび水が挙げられる。代わりに、医薬組成物は、1 種または複数種の薬学的に許容されるキャリア中に懸濁または溶解した活性構成成分を含有する適切なローション剤またはクリーム剤へと製剤化することができる。適切なキャリアとして、これらに限定されないが、鉱油、モノステアリン酸ソルビタン、ポリソルベート 60、セチルエステルワックス、セテアリルアルコール、2 オクチルドデカノール、ベンジルアルコールおよび水が挙げられる。

【0154】

眼への使用に対して、医薬組成物は、塩化ベンジルアルコニウムなどの防腐剤を含む、

10

20

30

40

50

または含まない、等張の、pH調整された無菌食塩水中の微粉化された懸濁剤として、または具体的には、等張の、pH調整された無菌の食塩水中液剤として、製剤化することができる。代わりに、眼への使用に対して、医薬組成物は、ワセリンなどの軟膏剤へと製剤化することもできる。

【0155】

医薬組成物はまた、鼻のエアゾール剤または吸入剤により投与することもできる。このような組成物は、当技術分野で周知の医薬製剤の技法に従い調製され、ベンジルアルコールまたは他の適切な防腐剤、バイオアベイラビリティを増強する吸収プロモーター、フルオロカーボン、および/または他の従来の可溶化剤または分散化剤を用いて、食塩水中溶液として調製することができる。

10

【0156】

本発明の方法における使用のための化合物は、単位剤形で製剤化することができる。「単位剤形」という用語は、処置を受けている被験体に対する単位投薬量として適切な物理的に別個の単位を指し、各単位は、任意選択で適切な薬学的キャリアと共同して、所望の治療効果を生じるように計算した既定量の活性物質を含有する。単位剤形は、単一の日用量または複数の日用量のうちの1つ（例えば、1日当たり約1～4回またはそれ超）についてのものであってよい。複数の日用量が使用される場合、単位剤形は、各用量に対して同じまたは異なっているものでよい。

【0157】

例証

20

【0158】

本開示はここで全般的に記載されており、以下の実施例を参照することで、本開示はより容易に理解されるが、これらの実施例は本開示のある特定の態様および実施形態の単に例証目的のために含まれているもので、本開示を限定することを意図しない。

【実施例】

【0159】

（実施例）

【0160】

（実施例1）

インフルエンザA型ウイルスバリエーションの同定

30

【0161】

in vitro 選択実験を3種のインフルエンザウイルスについて実施した：A/Puerto Rico/8/34、広く特徴付けられたH1N1実験室株、A/California/07/2009、現代の世界的流行、ブタ起源のH1N1株、およびA/Wisconsin/67/2005、治験2A相における使用のために選択されたH3N2株（表1）。野生型およびバリエーションインフルエンザ分離株に対する化合物1の抗ウイルス活性を、MDCK細胞を使用して、3日間の細胞変性効果（CPE）ベースのアッセイにおいて測定した。MOI 1.0のインフルエンザウイルスで、MDCK細胞を含有する複製ウェルを感染させることによって、化合物1に対する感受性を低下させたバリエーションを*in vitro*で選択し、ウイルス複製に対する代用物としてのCPEの発生をモニターした。1×から128×のEC₅₀の範囲の、化合物1の8つの濃度のそれぞれにおいて32個の複製ウェルを使用して、選択実験を384ウェルプレート内で実施した。ウイルスを上清からサンプリングし、新規細胞に継代した。阻害剤の存在下でウイルス増殖を示すウェルからの上清を使用して、小さなウイルスストックを増やし、これらを化合物1感受性および複製能について特徴付けた。化合物1に対する感受性を低下させたウイルスについて、ウイルスRNAを抽出し、逆転写させ、PCR-増幅し、続いてPA、PB1およびPB2コード領域のSangerベースの集団配列決定を行った。リバーシジェネティクス系を使用して、化合物1に対するウイルス感受性についての一次アミノ酸の変化の効果の確認を実施し、同定したバリエーションの自然頻度を分析した。

40

【0162】

50

一連の濃度の阻害剤の存在下で、A / P u e r t o R i c o / 8 / 3 4、A / C a l i f o r n i a / 0 7 / 2 0 0 9、またはA / W i s c o n s i n / 6 7 / 2 0 0 5 インフルエンザウイルス株を繰り返し継代することによって、化合物 1 に対する感受性 (sensitivity) を低下させたバリエーションを単離した。各選択では、化合物 1 に対する耐性を付与されたバリエーションを P B 2 タンパク質のキャップ結合ポケットにおいて同定した。キャップ結合ポケット内の耐性バリエーションの単離は、インフルエンザポリメラーゼ複合体の本質的な「キャップ転用」活性の阻害剤としての化合物 1 の作用機序を支持する。P B 2 アミノ酸 3 0 6、3 2 3、3 2 4、3 2 5、3 5 7、3 7 6、4 0 4、4 0 6、4 3 1、および 5 1 0 位でのバリエーションは、3 . 5 から > 7 6 7 倍の耐性を付与したが、最近または過去のヒトインフルエンザ配列において一般的に観察されていなかった (頻度は 0 . 0 1 % 未満)。

10

【 0 1 6 3 】

化合物 1 に対する感受性 (susceptibility) を低下させたバリエーションは、インフルエンザウイルス P B 2 遺伝子セグメントにおける特異的な変化を示したが、P A または P B 1 では示さなかった。P B 2 アミノ酸 Q 3 0 6、F 3 2 3、S 3 2 4、F 3 2 5、H 3 5 7、K 3 7 6、F 4 0 4、Q 4 0 6、M 4 3 1、および N 5 1 0 位でのバリエーションは、化合物 1 に対する感受性において 1 0 倍を超えるシフトを示した。これらの P B 2 変更を含有する、リバースジェネティクスで生成したウイルスは、化合物 1 に対する感受性の低下を確認した。

【 0 1 6 4 】

20

化合物 1 に対する感受性 (susceptibility) を低下させた、選択されたバリエーションの大部分 (アミノ酸 F 3 2 3、S 3 2 4、F 3 2 5、H 3 5 7、K 3 7 6、F 4 0 4、Q 4 0 6、および M 4 3 1 位) は、P B 2 キャップ - 結合領域内に位置している。Q 3 0 6 および N 5 1 0 において、他のものは、構造的情報が入手できない P B 2 領域に位置している。

【 0 1 6 5 】

化合物 1 に対する感受性 (susceptibility) の低下と関連するアミノ酸変化は、自然発生のインフルエンザ株では稀である。初代化合物 1 選択バリエーション (primary Compound 1-selected variant) は、自然発生のヒト分離株からの約 9 0 0 0 の P B 2 配列の調査データセットにおいて観察されなかった。

30

【 0 1 6 6 】

【表 1】

表 1 化合物 1 に対する感受性を低下させたバリエーションの選択のために使用

したウイルスの表

ウイルス名	サブタイプ	供給源
A/Puerto Rico/8/34	A/H1N1	ATCC, VR-1469
A/California/07/2009	A/H1N1	IRR, FR-201
A/Wisconsin/67/2005	A/H3N2	IRR, FR-397
ATCC: American Type Culture Collection; IRR: Influenza Resource Reagents		

40

【 0 1 6 7 】

(実施例 2)

化合物、増殖培地および培地補充物

【 0 1 6 8 】

化合物 1 を、V e r t e x P h a r m a c e u t i c a l s I n c o r p o r a t e d で合成し、濃度 1 0 m M で 1 0 0 % D M S O 中に溶解し、- 2 0 で保存した。D M

50

EM (カタログ番号 11960)、200mM L-グルタミン (カタログ番号 25030-081)、ペニシリン-ストレプトマイシン液体 (カタログ番号 15140-122) および HEPES 緩衝液 (カタログ番号 15630) は Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) から購入した。ウシ胎児血清 (FBS; カタログ番号 F4135 または 10091-148) は、それぞれ Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)、または Invitrogen から購入した。ジメチルスルホキシド (DMSO; カタログ番号 D2650) および Ex-CELL 無血清培地 (カタログ番号 M8303) は Sigma-Aldrich から購入した。Cell Titer Glo (登録商標) (カタログ番号 G7573) は Promega (Madison, WI, USA) から購入した。トリルスルホニルフェニルアラニルクロロメチルケトン (TPCK) 処理したトリプシン (カタログ番号 22725) は USB Corporation (Affymetrix, Fremont, CA, USA) から購入した。

10

【0169】

(実施例 3)

ウイルスのストック

【0170】

インフルエンザウイルス A / Puerto Rico / 8 / 34 (American Type Culture Collection, VR-95, Manassas, VA, USA)、A / California / 07 / 2009 (Influenza Reagent Resources, FR-201, Manassas, VA, USA) および A / Wisconsin / 67 / 2005 (IRR, FR-397) ストックを標準的方法 (World Health Organization (世界保健機関)) で調製した。簡単に説明すると、MDCK 細胞 (CCL-34, ATCC) を、2mM の L-グルタミン、1× 非必須アミノ酸、100 U / mL のペニシリン、100 µg / mL のストレプトマイシン (完全な DMEM; cDMEM) を、10% FBS と共に補充した DMEM 中で維持した。1 µg / mL TPCK 処理トリプシンを有する cDMEM (ウイルス増殖培地; VGM) 中で約 48 時間、細胞を低い感染効率 (MOI) で感染させ、その後、Beckman GS-6R 遠心分離機を用いて、650 × g で 10 分間遠心分離することによって上清を採取した。ウイルスストックは使用するまで -80 で凍結した。A / Wisconsin / 67 / 2005 を MDCK 細胞の感染に適応させるため、ウイルスを MDCK 細胞中で 10 回連続的に継代し、ブランクを精製し、上に述べられているように増殖させた。4 日間の細胞変性効果ベースのアッセイにおいて、MDCK 細胞に対する TCID₅₀ (50% の細胞培養物において病理学的変化を生成する感染因子の量) 感染力価を、ウイルスストックの段階希釈物を試験することによって決定し、Karber 法で結果を計算した。

20

30

【0171】

【表 2】

表 2: 装置

アイテム	モデル	会社	所在地
遠心分離機	GS-6R	Beckman Coulter	Brea, CA, USA
インキュベーター	NU-8700	Nuaire	Plymouth, MN, USA
液体ハンドラー	Biomek FX	Beckman Coulter	Brea, CA, USA
ルミノメーター	EnVision 2103 マルチラベルプレートリーダー	PerkinElmer	Waltham, MA, USA
分光光度計	NanoDrop, 8000 v.1.1	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA

10

【 0 1 7 2 】

【表 3】

表 3: ソフトウェア

目的	ソフトウェア	会社	所在地
CPE アッセイ	Condoseo	Genedata	Basel, Switzerland
データ保存および TCID ₅₀	Excel	Microsoft	Redmond, WA, USA
レポート作成	Word	Microsoft	Redmond, WA, USA
配列分析	Mutation Surveyor v3.20	SoftGenetics	State College, PA, USA

20

30

【 0 1 7 3 】

(実施例 4)

インフルエンザバリエーションの *in vitro* での選択

【 0 1 7 4 】

Biomek FX 液体ハンドラー (Beckman Coulter、Brea、CA、USA) を使用して、MDCK 細胞 (細胞 4×10^5 個 / mL) を、黒色、透明底の 384 ウェルプレートに、50 μ L のウイルス増殖培地 (VGM : ペニシリン / ストレプトマイシン、L - グルタミン、HEPES および 1 μ g / mL TPCCK 処理トリプシンを補充したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)) 中、ウェル 1 個当たり 2×10^4 個の細胞密度でプレーティングした。37 °C、5 % CO₂、加湿して 5 時間、細胞をインキュベートし、細胞が接着し単層を形成するのを可能にした。Biomek FX を使用して、40 μ L の培地を除去し、希釈薬物 (最終 DMSO 濃度 0.5 % DMSO) および 15 μ L の、MOI 1 のウイルス (20,000 TCID₅₀ / ウェル) を含有する 25 μ L の VGM を合計 50 μ L となるように加えた。1 × から 128 × の EC₅₀ の範囲の 8 つの濃度の化合物 1 のそれぞれにおいて、薬物を 32 個の複製ウェルに加えた。内部対照は、細胞のみを含有する 64 個のウェルおよび化合物の非存在下でウイルス感染細胞を有する 64 個のウェルからなった。プレートは、37 °C、5 % CO₂、飽和しつつある湿度で、72 時間インキュベートした。インキュベーション後、20 μ L の上清を採取し、150 μ L の cDMEM で希釈した。Biomek FX を使用して、CellTiter - Glo を、30 μ L の培地および細胞を含有するプレートに加え、室温で 10 分間イ

40

50

ンキュベートした。化合物の存在下で増殖させたウイルスの効果をモニターするための *EnVision* プレートリーダー (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を使用して、細胞中の全 ATP を介した細胞生存度の尺度である発光を測定した。希釈した上清ウイルスを新規ウェルに継代した。2 回の追加のウイルス継代を実施した。合計 3 回の継代後、阻害剤の存在下でウイルス増殖を示すウェルを小さなウイルスストックへと増やし、3 日間の MDC K 細胞防御アッセイにおいて、化合物 1 感受性についてこれらのストックを特徴付けた。化合物 1 に対する感受性の低下を示すストックに対して、RNA 単離、逆転写 PCR、PCR 増幅および Sanger ベースの集団配列決定を使用して、PB1、PB2、および PA コード配列を配列決定した。親株からのアミノ酸変化を同定し、12 - プラスミドリバースジェネティクス系を使用して、A / Puerto Rico / 8 / 34 インフルエンザバックグランドへとクローニングした。リバースジェネティクスインフルエンザ株の表現型を、3 日間の MDC K 細胞防御、阻害剤感受性アッセイにより再び特徴付けた。同定したバリアントの自然頻度を、インフルエンザ配列の公共のデータベースを検索することにより分析した。

【0175】

イヌの腎臓細胞株 (すなわち、MDC K) 内で生産的感染を可能にするために、A / Wisconsin / 67 / 2005 を、MDC K 細胞によって 10 回連続的に継代し、ブランクを精製して A / Wisconsin / 67 / 2005 - p5 を生成した (本明細書では A / Wisconsin / 67 / 2005 と称する)。

【0176】

化合物 1 に対する感受性を低下させたインフルエンザウイルスバリアントの選択を、 EC_{50} から $128 \times - EC_{50}$ の範囲の化合物濃度で実施した。1 個のウェル当たり同じ化合物濃度でのウイルスの 3 回の継代後、富化されたウイルスの集団を上清から採取した。16 個の潜在的な化合物 1 耐性バリアントを含有するウェル (すなわち、非感染のウェルと比較して、ATP レベルが 50 % を超える低減を有するもの) および 3 種のウイルスのそれぞれに対する 16 個の対照ウェルを確認的表現型分析およびポリメラーゼ遺伝子配列決定のために選択した (表 4 から表 9)。

【0177】

31 個の分離株が、化合物 1 に対する感受性が 10 倍超減少したことを示し、これらの分離株のうちの 29 個において、PB2 バリアントが観察された; Q306H、F323L、S324I / N / R、F325V、H357Q、K376Q / R、F404Y、Q406K、M431I、および N510K / T。最も一般的に単離されたバリアントは K376R ($n = 6$)、S324I ($n = 4$)、M431I ($n = 4$)、および N510K ($n = 3$) であったが、この試料のサイズが小さかったため、化合物 1 の選択圧 (すなわち、 EC_{50} 選択倍率) およびバリアント位置または同一性との間の明らかな相関関係は得られない。生物学的分離株は、化合物 1 EC_{50} において、10 ~ 1720 倍のシフトを有した。286 および 500 倍の EC_{50} シフトを有する残りの 2 個の分離株に対して、Sanger 配列決定法を使用して、PB2、PB1 または PA 領域には、いかなるポリメラーゼ変動も同定されなかった。1 つの可能な説明は、配列同定に対する閾値より下の耐性バリアントの存在である。いかなる初代インフルエンザ A 型ウイルスバリアント (primary influenza A virus variant) も PB1 または PA 遺伝子に見出されなかった。

【0178】

リバースジェネティクスベースの系で試験するために潜在的な化合物 1 耐性バリアントを同定するため、いくつかの判定基準を使用した。第 1 に、ウイルスは、化合物 1 感受性において 10 倍超の EC_{50} シフトを必要とした、これはアッセイ間のばらつきの 3 ~ 5 倍外側にある。第 2 に、化合物 1 に関係しない一般的な多形性を除去するために、DMSO 継代ウイルスにバリアントが観察された場合、これを除外した。

【0179】

リバースジェネティクス方法を使用した個々の潜在的な化合物 1 耐性バリアントの特徴

10

20

30

40

50

付けが現在進行中である。今日までにこれらのウイルスは、3.5 から > 769 倍の範囲の化合物 1 EC_{50} シフトを付与した (表 10)。これは、PB2 における単一のアミノ酸変化が、化合物 1 に対する感受性の低下をもたらすことができることを示している。これらの検査に使用されたリバーシジェネティクス系は、M2 - 阻害剤耐性および NA I 感受性を付与する配列を含有する A / Puerto Rico / 8 / 34 から生成されたので、交差耐性検査は実施しなかった。

【 0 1 8 0 】

【表 4 - 1】

表 4: 化合物 1 を用いて選択された A/Puerto Rico/8/34 バリエーション

試料 番号	EC ₅₀ シフト	バリエーション概 要	PB2									PB1		PA
			F323	S324	H357	K376	F404	Q406	N510	I560	L571	F166	E656	D529
1	>714	S324I, PA D529N		I										N
5	>714	Q406K, I560V, L571L/Q						K		V	L/Q			
8	>714	N510T, I560V, PB1 F166L							T	V		L		
10	>714	S324I		I										
11	>714	S324I		I										
2	471	F404Y, PB1 F166F/L					Y					F/L		

10

20

【表 4 - 2】

試料 番号	EC ₅₀ シフト	バリエーション概 要	PB2									PB1		PA
			F323	S324	H357	K376	F404	Q406	N510	I560	L571	F166	E656	D529
9	374	K376R, PB1 F166F/L, PB1 E656E/K				R						F/L	E/K	
3	286													
12	245	K376R				R								
14	18	K357Q			Q									
16	12	I560V								V				
13	9	F323L, I560V	L							V				
4	1	PB1 F166L										L		
15	1	I560V, PB1 F166L								V		L		
6	NA	低い力価												
7	NA	低い力価												

【 0 1 8 1 】

10

20

【表 5 - 1】

表 5: 化合物 1 を用いて選択された A/California/07/2009 バリエント

試料 番号	EC ₅₀ シフト	バリエント概要	PB2						PB1			PA
			D253	S324	F325	K376	M431	N510	L10	A652	E18	A256
2	1720	F325V			V							
5	500											
1	417	N510K						K				
3	183	K376R, PB1 A652V				R				V		
4	176	F325V			V							
7	130	S324N		N								
8	95	K376R				R						
11	74	N510N/K						N/K				
6	31	M431I					I					
10	10	M431I, PB1 L10V, PAE18G					I		V		G	
9	2	D253N	N									
16	2											
12	1											
13	1	PA E18G									G	Q
14	1	PA E18G, PA A256Q									G	

【表 5 - 2】

試料 番号	EC ₅₀ シフト	バリエント概要	PB2						PB1			PA
			D253	S324	F325	K376	M431	N510	L10	A652	E18	A256
15	1	PA E18G									G	

【 0 1 8 2 】

【表 6】

表 6: 化合物 1 を用いて選択された A/Wisconsin/67/2005 バリエント

試料番号	EC ₅₀ シフト	バリエント概要	PB2					PA
			Q306	S324	K376	M431	N510	K213
1	>909	S324R		R				
5	>909	S324I		I				
12	>909	N510K, PA K213K/R					K	K/R
7	450	N510T					T	
4	309	K376Q			Q			
3	245	K376R			R			
11	209	Q306H	H					
2	209	K376R			R			
10	66	M431I				I		
9	65	M431I				I		
16	2							
13	1							
14	1							
15	1							
6	NA	低い力価						
8	NA	低い力価						

【 0 1 8 3 】

【表 7 - 1】

表 7: 化合物 1 なしで選択された A/Puerto Rico/8/34 対照バリエント

試料 番号	EC ₅₀ シフト	バリエント概要	PB2		PB1	PA		
			M243	I560	F166	V90	D529	N675
17	1	PB1 F166L			L			
18	1	I560V		V				
19	1	I560I/V		I/V				
20	1	PB1 F166F/L, PA N675N/T			F/L			N/T
21	1	M243K, PA V90I	K			I		
22	1							

【表 7 - 2】

試料 番号	EC ₅₀ シフト	バリエーション概要	PB2		PB1	PA		
			M243	I560	F166	V90	D529	N675
26	1	M243K, PA D529N	K				N	
27	1	PB1 F166L			L			
29	1	I560V, PB1 F166L		V	L			
23	NA							
24	NA							
25	NA							
28	NA							
30	NA							
31	NA							
32	NA							
NA: 力価は、表現型の評価に対して十分に高くなく、よって EC ₅₀ および配列は決定されなかった。								

【 0 1 8 4 】

10

20

【表 8】

表 8: 化合物 1 なしで選択された A/California/07/2009 対照バリエーション

試料 番号	EC ₅₀ シフト	バリエーション概要	PB2	PB1	PA
			K33	M111	E18
17	1	PA E18E/G			E/G
18	2	K33K/R, PA E18E/G	K/R		E/G
19	1	PA E18E/G			E/G
20	0.4	PA E18E/G			E/G
21	2	PA E18G			G
22	1	PA E18E/G			E/G
23	1				
24	0.3	PA E18E/G			E/G
25	1	PA E18E/G			E/G
26	1				
27	1	PA E18E/G			E/G
28	1	PB1 M111I, PA E18E/G		I	E/G
29	1	PA E18E/G			E/G
30	1				
31	1				
32	1	PA E18E/G			E/G

【 0 1 8 5 】

10

20

【表 9】

表 9: 化合物 1 なしで選択された A/Wisconsin/67/2005 対照バリエーション

試料 番号	EC ₅₀ シフト	バリエーション概要	PB2		PB1
			G222	I411	M290
31	2				
32	2				
17	1				
18	1				
19	1				
20	1	I411I/V		I/V	
22	1				
23	1	I411I/V		I/V	
24	1				
25	1		ND		
26	1				
27	1				
28	1				
29	1				
30	1				
21	0.4	G222G/S, PA M290M/I	G/S		M/I
ND: この試料に対する配列データが取得不可能					

【 0 1 8 6 】

10

20

30

【表 10 - 1】

表 10: in vitro で化合物 1 により選択された PB2 バリエーションの概要

リバー ジェネティクス 試験株	in vitro での選択中の PB2 置換の発生率			化合物 1 に対す る感受性 ^a		in vitro で の力価にお けるピーク のパーセント ^c	ヒトデー タセッ トにお ける 有病率
	A/PR/8/34 (H1N1)	A/Cali/07/2009 (pH1N1)	A/Wisc/67/2005 (H3N2)	EC ₅₀ (SD) μM	EC ₅₀ シフト 倍率		
PR8-野生型				0.0013 (0.011)	1.0	NA	NA
PR8-PB2- Q306H			1	ND ^b	ND ^b	6%	0/8919

【表 10 - 2】

リバース ジェネティクス 試験株	in vitro での選択中の PB2 置換の発生率			化合物 1 に対す る感受性 ^a		in vitro で の力価にお けるピークの パーセント ^c	ヒトデータ セット における 有病率
	A/PR/8/34 (H1N1)	A/Cali/07/2009 (pH1N1)	A/Wisc/67/2005 (H3N2)	EC ₅₀ (SD) μM	EC ₅₀ シフト 倍率		
PR8-PB2- F323L	1			0.11 (0.085)	8.5	ND ^b	3/8942
PR8-PB2- S324I	3		1	ND ^b	ND ^b	6%	0/8942
PR8-PB2- S324N		1		0.40 (0.29)	31	18%	1/8942
PR8-PB2- S324R			1	0.43 (0.44)	33	18%	0/8942
PR8-PB2- F325V		2		0.045 (0.022)	3.5	ND ^b	0/8942
PR8-PB2- H357Q	1			0.20 (0.12)	15	ND ^b	0/8906
PR8-PB2- K376Q			1	5.3 (3.1)	408	ND ^d	0/8910
PR8-PB2- K376R	2	2	2	3.0 (1.7)	231	10%	0/8910
PR8-PB2- F404Y	1			ND ^b	ND ^b	56%	3/8912
PR8-PB2- F406K	1			ND ^b	ND ^b	ND ^b	8912
PR8-PB2- M431I		2	2	1.7 (0.82)	131	8%	0/8914
PR8-PB2- N510K		2	1	ND ^b	ND ^b	1%	0/8926
PR8-PB2- N510T	1		1	ND ^b	ND ^b	32%	1/8926
EC ₅₀ :CPE ベースのアッセイにおいて、ATP が最大の半分である有効濃度;SD:標準偏差。 ^a 3 日間の MDCK 細胞 CPE ベースのアッセイにおけるリバースジェネティクスで生成したウイルスに対する化合物 1 EC ₅₀ 値。示されている値は、少なくとも 3 つの独立した実験の平均である。 ^b 値は、少なくとも 1 つの実験値が試験された化合物濃度の範囲の外側にあると決定され、これによって平均の決定が不可能となったため、ND(未決定)と列挙された。							

10

20

30

40

【表 10 - 3】

	in vitro での選択中の PB2 置換の発生率			化合物 1 に対す る感受性 ^a			
リバース ジェネティクス 試験株	A/PR/8/34 (H1N1)	A/Cali/07/2009 (pH1N1)	A/Wisc/67/2005 (H3N2)	EC ₅₀ (SD) μM	EC ₅₀ シフト 倍率	in vitro で の力価にお けるピークの パーセント ^c	ヒトデータ セット における 有病率
^c MDCK 細胞は、MOI=0.01 で、示されたウイルスに感染させて、上清を 62 時間にわたり 力価決定した。感染後 48 時間におけるバリエーションの平均逆対数力価を、野生型の平均 逆対数力価で割ったパーセンテージとしてピーク力価のパーセントを決定した。ウイルス複 製能は、1 つの実験で 3 回繰り返してアッセイした。							
^d ND: 力価が 48 時間において検出限界未満であったため、未決定。							

10

【0187】

(実施例 5)

化合物 1 に対するインフルエンザバリアントの感受性の特徴付け

【0188】

20

Cell Titer Glo を使用して細胞の ATP レベルにより測定される、インフルエンザウイルス感染の結果である MDCK 細胞死を予防するその能力により化合物抗ウイルス活性を評価した。簡単に説明すると、Biomek FX 液体ハンドラーを使用して、MDCK 細胞 (4×10^5 細胞/mL) を、黒色、透明底の 384 ウェルプレートに、50 μL の VGM 中、ウェル 1 個当たり 2×10^4 個の細胞密度でプレーティングした。37 °C、5% CO₂、飽和湿度で 5 時間、細胞をインキュベートし、細胞が接着し単層を形成することを可能にした。Biomek FX を使用して、40 μL の培地を除去し、希釈薬物 (最終 DMSO 濃度 0.5% DMSO)、および 15 μL のウイルスを 100 TCID₅₀ / ウェルの濃度で含有する 25 μL の VGM を加えた。内部対照は、細胞のみ含有するウェル、および化合物の非存在下でウイルスに感染させた細胞を含有するウェルからなった。プレートを、37 °C、5% CO₂、および飽和しつつある湿度で 72 時間インキュベートした。インキュベーション後、Biomek FX を使用して、20 μL の Cell Titer - Glo を各ウェルに加え、室温で 10 分間インキュベートした。EnVision プレートリーダー (PerkinElmer) を使用して発光を測定した。Levenburg Marquardt アルゴリズムの 4 - パラメーターカーブフィッティング法を使用して、化合物用量対応データフィッティングすることにより、EC₅₀ (CPE が対照の半分である化合物濃度) 値を計算した (Condoseo software; Genedata Basel, Switzerland)。

30

【0189】

(実施例 6)

ウイルス複製適格性の決定

40

【0190】

感染した MDCK 細胞における 62 時間増殖曲線を介してリバースジェネティクスバリアントについてのウイルス複製適格性をアッセイした。MDCK 細胞を、ウェル 1 個当たり 4×10^4 個の細胞密度で 96 - ウェルプレートにプレーティングし、化合物の非存在下で MOI = 0.01 でウイルスに感染させた。様々な時点で、プレートから採取し、ウイルス価について上清をアッセイした。ウイルス価を時間の経過と共にプロットし、野生型ウイルスについてのピーク力価を感染後 48 時間において生じると決定した。

【0191】

(実施例 7)

50

ウイルスのストックまたは感染したMDCK細胞からのインフルエンザA型ポリメラーゼ複合体の増幅および配列決定

【0192】

インフルエンザA型ウイルスの配列分析は、PB2、PB1、およびPAコード領域の約3キロベースのRNA断片の逆-転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応法(RT-PCR)増幅を利用した。変性条件下、100 μ Lのウイルスストックから、または300 μ Lの溶解緩衝液中の 2×10^6 個の感染したMDCK細胞からウイルスRNAを抽出した。RNaseasy Plus Mini法(カタログ番号74134、Qiagen、Valencia、CA、USA)またはQIAamp Virus RNA Mini法(カタログ番号52904、Qiagen)のいずれかを使用して、ウイルスRNAを標準的市販のシリカゲル膜で単離した。2.5 μ MのUniversal 12プライマー(AGCRAAAGCAGG)(配列番号2)、400UのSuperscript(商標)II Reverse Transcriptase(カタログ番号18080-044、Invitrogen、Carlsbad、CA)、40UのRNase OUT(カタログ番号10777-019、Invitrogen)、PC2反応緩衝液(50mM Tris-HCl pH9.1、16mMの硫酸アンモニウム、3.5mMの塩化マグネシウム、および150 μ g/mLのウシ血清アルブミン)(カタログ番号1001、AB Peptides、St. Louis、MO、USA)、500 μ MのdNTP(カタログ番号639125、Clontech、Mountain View、CA、USA)、および5mMのジチオソール(カタログ番号18080-044、Invitrogen)を含有する50 μ L反応物中のウイルスRNAから、変性ステップ(65で5分間)を用いて、続いてRT反応において、伸長温度を上昇させて(25で10分間、42で10分間、50で20分間、55で10分間、および70で15分間)相補DNA(cDNA)断片を合成した。インフルエンザA型ウイルスポリメラーゼサブユニットをコードする断片を、合成したcDNAプールから増幅するために、5 μ Lの完了したRT反応物を、PC2反応緩衝液、200 μ MのdNTP(カタログ番号639125、Clontech)、1.5Mのベタイン(カタログ番号、B0300、Sigma Aldrich)、3.2UのKlentaq DNAポリメラーゼ(カタログ番号1001、AB Peptides)、1.6UのPfu DNAポリメラーゼ(カタログ番号600160、Stratagene、La Jolla、CA、USA)、および400 μ Mの各プライマーと、最終の反応物容量が50 μ Lとなるよう合わせた(PAセグメントに対して:フォワード:5'-CGTCTCNGGGAGCGAAAGCAGGTACTGATCCAAAT(配列番号3)およびリバース:5'-CGTCTCNTATTAGTAGAAACAAGGTACTTTTTTTGGA(配列番号4)、PB1セグメントに対して:フォワード:5'-CGTCTCNGGGAGCGAAAGCAGGCAAAACCATTTGAA(配列番号5)およびリバース:5'-CGTCTCNTATTAGTAGGAACAAGGCATTTTTTTCATG(配列番号6)、PB2セグメントに対して:フォワード:5'-CGTCTCNGGGAGCGAAAGCAGGTCAATTATATTCAA(配列番号7)およびリバース:5'-CGTCTCNTATTAGTAGAAACAAGGTCGTTTTTAAAC(配列番号8))。反応物を94で2分間、続いて94で15秒間、68-0.4/サイクル(「タッチダウン」PCR)を20秒間、および68で3.5分間を40サイクルでインキュベートし、続いて68で7分間インキュベートした。QIAquick 96 PCR Purification キット(カタログ番号28181、Qiagen)を使用してPCR生成物を精製し、アリコートの質を1%アガロース(agarose)ゲル電気泳動で分析した。分光光度法(NanoDrop、8000v.1.1;Thermo Fisher Scientific)を使用して、精製したPCR生成物の純度および量を評価した。精製したDNAは、社内で配列決定するか、またはPB2、PB1およびPAセグメントの配列決定のためにBeckman-Coulter(Agencourt(登録商標)Biosciences;Danvers、MA、USA)に送った。

10

20

30

40

50

【0193】

Mutation Surveyorソフトウェア(SoftGenetics、State College、PA)を使用して、配列トレースを整列させ、解釈した。配列を耐性選択に対して使用した対応するウイルスと比較することによって、アミノ酸置換を検出した(すなわち、A/Puerto Rico/8/34、A/California/07/2009またはA/Wisconsin/67/2005)。

【0194】

(実施例8)

リバースジェネティクスのためのプラスミドの構築

【0195】

ウイルスゲノムセグメントをコードするプラスミド構築物を作製した。簡単に説明すると、インフルエンザA/Puerto Rico/8/34ウイルスのRNA単離およびcDNA合成であった。末端BsmB1制限エンドヌクレアーゼ部位を含有するオリゴを使用してcDNAを増幅し、増幅した生成物を、TOPO(登録商標)XL PCR Cloning Kit(カタログ番号K470010、Invitrogen)を使用してPCR-XL-TOPOシャトルベクターへとクローニングした。cDNAを含有するTOPOベクターをBsmB1で消化し、挿入物をRNAポリメラーゼIで駆動した発現ベクターpHH21にライゲーションした。プラスミドを配列決定することによって、cDNA断片の適切な組込みおよび望ましくない変異がないことを確認した。

【0196】

製造業者のプロトコールに従い、Quick Change(商標)II XL Site-Directed Mutagenesis Kit(カタログ番号200518、Agilent Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA)を使用して、耐性選択実験から同定した、親株からのアミノ酸変化を対応するpHH21-A/Puerto Rico/8/34プラスミドにクローニングした。簡単に説明すると、10 ngの野生型プラスミドおよび150 ngのそれぞれフォワード変異およびリバース変異を含有するプライマーを、5 µLの10×反応緩衝液、1 µLのdNTPミックス、3 µLのQuick Solutionおよび2.5 UのPfuUltra HF DNAポリメラーゼをPCR等級の水中で合わせ50 µLにし、変異をPCRで導入した。サーマルサイクリングは、最初の変性を95 °Cで1分間と、95 °Cで50秒間、60 °Cで50秒間、68 °Cで5分間を18サイクルと、最終伸長を68 °Cで7分間行った。残存する野生型プラスミドを、DpnI制限酵素で消化し、変異を含有するプラスミドを細菌中へと形質転換し、QIAGEN Plasmid Midi Kit(カタログ番号12143、Qiagen)を使用してプラスミドを単離した。プラスミドへの点変異の適切な組込みを配列決定することによって確認した。

【0197】

代わりに、スプライスオーバーラップエクステンションPCRにより変異を導入し、これによって、所望のアミノ酸置換を含有する内部プライマーを使用して、オーバーラップする3'末端および適当な制限部位を含んだフランキングプライマーを有する中間セグメントを生成した。提供されたプロトコールに従い、10 ngの鋳型プラスミドDNA、内部フォワード変異またはリバース変異を含有するプライマー、ならびにHigh Fidelity PCR Masterミックス(カタログ番号12140314001、Roche, Basel, Switzerland)を用いて、第1のラウンドのPCR増幅反応を実施した。サーマルサイクリング温度および回数は、94 °Cで4分間と、94 °Cで45秒間、55 °Cで30秒間、72 °Cで2分間を40サイクルと、最終伸長を72 °Cで10分間であった。生成物を、1.5%アガロースゲル上で、電気泳動によりゲル精製した。5 ngの第1のラウンドの各PCR生成物を、フランキング制限部位を含有するプライマーを使用して、第2のPCR反応のための鋳型として使用した。PCRラウンドの2つの生成物を再びゲル精製し、pHH21プラスミドを適当な制限酵素で消化し、ライゲーションし、5 µLの生成物を細菌の形質転換のために使用した。点変異の適切な組込み

10

20

30

40

50

を配列決定することによって確認した。

【0198】

(実施例9)

組換えウイルスの生成

【0199】

変異を調べるために、1.25 µgのpHH21変異を含有するプラスミドを含有するプラスミド混合物(残りの7つのpHH21野生型プラスミド、および4つのRNP複合体発現プラスミドのそれぞれ)を用いて、293T細胞(CRL-11268、ATCC)の一過性トランスフェクションにより、組換えウイルスを生成した。TransIT-LT1トランスフェクション試薬(カタログ番号MIR 2300、MirusBio、Madison、WI、USA)を用いて一過性トランスフェクションを実施した。簡単に説明すると、プラスミド混合物とトランスフェクション試薬の1:2混合物(w/v)を、1.5 mLのOPTI-MEM I培地(カタログ番号11058、Invitrogen)中、室温で15分間インキュベートした。次いで、1.5 mLのOPTI-MEM I中で、50%集密度で維持された293T細胞を含有するT-75フラスコに、トランスフェクション混合物を加えた。細胞を、5%CO₂中、37℃で48時間インキュベートした。インキュベーション後、上清を採取し、650×gで10分間遠心分離して、細胞デブリを除去し、低いMOIで感染させたMDCK細胞中でウイルスをさらに増殖させ、その後、ウイルスのストックを採取し、力価を求めた。

【0200】

他の実施形態

本発明は、その詳述な説明と併せて記載されているが、前述の記載は例示することを意図し、添付の特許請求の範囲により定義された本発明の範囲を限定するものではないことを理解されたい。他の態様、利点および修正は、以下の特許請求の範囲の範囲内である。

【配列表】

0006953307000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	7/01	(2006.01)	C 1 2 N	7/01	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 Q	1/04	(2006.01)	C 1 2 Q	1/04	
C 1 2 Q	1/6876	(2018.01)	C 1 2 Q	1/6876	Z
G 0 1 N	33/569	(2006.01)	G 0 1 N	33/569	L

- (72)発明者 リーマン, ジョシュア ロバート
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01890, ウィンチェスター, ミスティック パレー
パークウェイ 196
- (72)発明者 バイアン, ランダル
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01778, ウェイランド, ペンバートン ロード 7
- (72)発明者 ベネット, ハミルトン パーロウ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02148, モールデン, コロンビア ストリート 6
3
- (72)発明者 パーテルズ, ダグラス ジョン
アメリカ合衆国 アイオワ 52317, ノース リバティ, フォックス ラン 310

審査官 小田 浩代

- (56)参考文献 特表2008-544756(JP,A)
特表2014-521688(JP,A)
特開2013-116112(JP,A)
特表2017-536804(JP,A)
新開 敬行 ほか, インフルエンザウイルス(A/H1N1pdm09)の検出法の開発と流行株における抗原解析, 東京都健康安全研究センター研究年報, 2011年, Vol. 62, pp. 49-55, [retrieved on 12.23.2020]
GUILLIGAY, D. et al., The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2, Nat. Struct. Mol. Biol., 2008年, Vol. 15, pp. 500-506
内藤忠相 ほか, インフルエンザウイルスRNAポリメラーゼの構造生物学, ウイルス, 2009年, Vol. 59, pp. 1-12
CLARK, M. P. et al., Discovery of a novel, first-in-class, orally bioavailable azaindole inhibitor (VX-787) of influenza PB2, J. Med. Chem., 2014年08月14日, Vol. 57, pp. 6668-6678
FECHTER, P. et al., Two aromatic residues in the PB2 subunit of influenza A RNA polymerase are crucial for cap binding, J. Biol. Chem., Vol. 278, 2003年, pp. 20381-20388

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/00 - 15/90
C 0 7 K 1/00 - 19/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS
(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq

P u b M e d