

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成23年9月29日(2011.9.29)

【公表番号】特表2010-500880(P2010-500880A)

【公表日】平成22年1月14日(2010.1.14)

【年通号数】公開・登録公報2010-002

【出願番号】特願2009-524682(P2009-524682)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 0 7 K	14/11	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 0 7 K	16/08	(2006.01)
C 1 2 N	7/00	(2006.01)
A 6 1 K	38/00	(2006.01)
A 6 1 K	39/395	(2006.01)
A 6 1 K	48/00	(2006.01)
A 6 1 P	31/16	(2006.01)
G 0 1 N	33/53	(2006.01)
G 0 1 N	37/00	(2006.01)
C 1 2 P	21/08	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 0 7 K	14/11	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/00	A
C 0 7 K	16/08	
C 1 2 N	7/00	
A 6 1 K	37/02	
A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	31/16	
G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	37/00	1 0 2
C 1 2 P	21/08	

【誤訳訂正書】

【提出日】平成22年8月12日(2010.8.12)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【発明の詳細な説明】

【発明の名称】ヘマグルチニンポリペプチド、ならびにヘマグルチニンポリペプチドに関する試薬および方法

【技術分野】

【0001】

優先権の主張

本願は、2006年8月14日に出願された同時継続中の米国仮特許出願第60/837,868号、および2006年8月14日に出願された同時継続中の米国仮特許出願第60/837,869号に対する優先権を米国特許法のもとに主張する。米国仮特許出願第60/837,868号および同第60/837,869号のそれぞれの全ての内容は、本明細書中に参考として援用される。

【0002】

政府による支援

本発明は、契約番号第U54 GM62116のもと国立一般医科学研究所により、そして契約番号GM57073のもと国立衛生研究所により与えられた米国政府の支援によりなされた。米国政府は、本発明における一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

インフルエンザには、世界的流行、一時的流行、再流行、および突発の長い歴史がある。H5N1株を含むトリインフルエンザは接触感染性が高く、命にかかる可能性がある病原体であるが、現在のところは、ヒトに感染する能力は限られている。しかし、トリインフルエンザウイルスは、その宿主特異性を変化させ、そしてそれがヒトに容易に感染することを可能にする変異を蓄積していることが歴史的に観察されている。実際、前世紀の主要なインフルエンザウイルスの世界的流行のうちの2つは、ヒトへの感染を可能にするようにそれらの遺伝的構造が変化したトリインフルエンザウイルスから始まった。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

現在のH5N1、H7N7、H9N2、およびH2N2トリインフルエンザ株が、それらの宿主特異性を変化させ、そしてそれらがヒトに容易に感染することを可能にする変異を蓄積している可能性があることは、重要な懸案事項である。したがって、これらの株のHAタンパク質が実際に、ヒトに容易に感染できる形態に換わり得るかどうかを評価することが必要であり、さらに、そのような能力を有しているHA変異体を同定することが必要である。さらに、一般的には、様々な対象（特に、ヒト）への感染を可能にするか、または予防する、HAタンパク質の特徴を理解することも必要である。また、インフルエンザウイルスによって引き起こされる疾患の有効な処置またはそのような疾患の発症を遅延させるためのワクチンおよび治療ストラテジーも必要である。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明により、特定のグリカン結合特性を有しているヘマグルチニンポリペプチドが提供される。具体的には、本発明により、アンブレラ様トポロジーを有しているシアリル化されたグリカンに結合するヘマグルチニンポリペプチドが提供される。特定の実施形態においては、本発明のHAポリペプチドは、アンブレラグリカンに対して、高い親和性および/または特異性で結合する。いくつかの実施形態においては、本発明のHAポリペプチドは、コーントポロジー（cone-topology）グリカンと比較すると、アンブレラグリカンに対して優先的な結合を示す。

【0006】

本発明によってはまた、提供されたヘマグルチニンポリペプチドを伴う診断用および治療用の試薬と方法（ワクチンを含む）も提供される。

本発明の好ましい実施形態では、例えば以下のHAポリペプチドなどが提供される：  
(項目1)

アンブレラトポロジーグリカンに結合する、操作された H A ポリペプチド。

(項目 2 )

前記アンブレラトポロジーグリカンに 2 - 6 シアリル化グリカンが含まれる、項目 1 に記載の操作された H A ポリペプチド。

(項目 3 )

前記 H A ポリペプチドがアンブレラトポロジーグリカンに対して高い親和性で結合する、項目 1 または項目 2 に記載の操作された H A ポリペプチド。

(項目 4 )

前記 H A ポリペプチドが、アンブレラトポロジーグリカンに対して、ヒトの感染を媒介する野生型のヒトに適応した H A の親和性と匹敵する親和性で結合する、項目 3 に記載の操作された H A ポリペプチド。

(項目 5 )

前記 H A ポリペプチドが、アンブレラトポロジーグリカンに対して、ヒトの感染を媒介する野生型 H A の親和性の少なくとも 50 % の親和性で結合する、項目 3 に記載の操作された H A ポリペプチド。

(項目 6 )

前記 H A ポリペプチドが、アンブレラトポロジーグリカンに対して、ヒトの感染を媒介する野生型 H A の親和性の少なくとも 70 % の親和性で結合する、項目 3 に記載の操作された H A ポリペプチド。

(項目 7 )

前記 H A ポリペプチドが、アンブレラトポロジーグリカンに対して、ヒトの感染を媒介する野生型 H A の親和性の少なくとも 80 % の親和性で結合する、項目 3 に記載の操作された H A ポリペプチド。

(項目 8 )

前記 H A ポリペプチドが、アンブレラトポロジーグリカンに対して、ヒトの感染を媒介する野生型 H A の親和性の少なくとも 90 % の親和性で結合する、項目 3 に記載の操作された H A ポリペプチド。

(項目 9 )

前記 H A ポリペプチドが、アンブレラトポロジーグリカンに対して、ヒトの感染を媒介する野生型 H A の親和性の少なくとも 100 % の親和性で結合する、項目 3 に記載の操作された H A ポリペプチド。

(項目 10 )

前記 H A ポリペプチドが、コントポロジーグリカンと比較して、アンブレラトポロジーグリカンに対して優先的に結合する、項目 1 または項目 2 に記載の操作された H A ポリペプチド。

(項目 11 )

前記 H A ポリペプチドが、コントポロジーグリカン対アンブレラトポロジーグリカンについての少なくとも 2 の相対的親和性でアンブレラトポロジーグリカンに結合する、項目 10 に記載の操作された H A ポリペプチド。

(項目 12 )

前記 H A ポリペプチドが、コントポロジーグリカン対アンブレラトポロジーグリカンについての少なくとも 3 の相対的親和性でアンブレラトポロジーグリカンに結合する、項目 10 に記載の操作された H A ポリペプチド。

(項目 13 )

前記 H A ポリペプチドが、コントポロジーグリカン対アンブレラトポロジーグリカンについての少なくとも 4 の相対的親和性でアンブレラトポロジーグリカンに結合する、項目 10 に記載の操作された H A ポリペプチド。

(項目 14 )

前記 H A ポリペプチドが、コントポロジーグリカン対アンブレラトポロジーグリカンについての少なくとも 5 の相対的親和性でアンブレラトポロジーグリカンに結合する、項

目 1 0 に記載の操作された H A ポリペプチド。

(項目 15)

前記 H A ポリペプチドが、コントポロジーグリカン対アンブレラトポロジーグリカンについての少なくとも 1 0 の相対的親和性でアンブレラトポロジーグリカンに結合する、項目 1 0 に記載の操作された H A ポリペプチド。

(項目 16)

アンブレラトポロジーグリカン以外に結合する単離された H A ポリペプチドであって、 H A ポリペプチドは、以下の株のいずれに由来する H 1 タンパク質でもなく : A / South Carolina / 1 / 1918 ; A / Puerto Rico / 8 / 1934 ; A / Taiwan / 1 / 1986 ; A / Texas / 36 / 1991 ; A / Beijing / 262 / 1995 ; A / Johannesburg / 92 / 1996 ; A / New Caledonia / 20 / 1999 ; A / Solomon Islands / 3 / 2006 、または、以下の株のいずれに由来する H 2 タンパク質でもなく : A / Japan / 305+ / 1957 ; A / Singapore / 1 / 1957 ; A / Taiwan / 1 / 1964 ; A / Taiwan / 1 / 1967 、または、以下の株のいずれに由来する H 3 タンパク質でもない : A / Aichi / 2 / 1968 ; A / Philippines / 2 / 1982 ; A / Mississippi / 1 / 1985 ; A / Leningrad / 360 / 1986 ; A / Sichuan / 2 / 1987 ; A / Shanghai / 11 / 1987 ; A / Beijing / 353 / 1989 ; A / Shandong / 9 / 1993 ; A / Johannesburg / 33 / 1994 ; A / Nanchang / 813 / 1995 ; A / Sydney / 5 / 1997 ; A / Moscow / 10 / 1999 ; A / Panama / 2007 / 1999 ; A / Wyoming / 3 / 2003 ; A / Oklahoma / 323 / 2003 ; A / California / 7 / 2004 ; A / Wisconsin / 65 / 2005 、単離された H A ポリペプチド。

(項目 17)

アンブレラトポロジーグリカンに結合する操作された H A ポリペプチドの特徴的な部分。

(項目 18)

H A ポリペプチドの特徴的な部分であって、 H A ポリペプチドは、以下の株のいずれに由来する H 1 タンパク質でもなく : A / South Carolina / 1 / 1918 ; A / Puerto Rico / 8 / 1934 ; A / Taiwan / 1 / 1986 ; A / Texas / 36 / 1991 ; A / Beijing / 262 / 1995 ; A / Johannesburg / 92 / 1996 ; A / New Caledonia / 20 / 1999 ; A / Solomon Islands / 3 / 2006 、または、以下の株のいずれに由来する H 2 タンパク質でもなく : A / Japan / 305+ / 1957 ; A / Singapore / 1 / 1957 ; A / Taiwan / 1 / 1964 ; A / Taiwan / 1 / 1967 、または、以下の株のいずれに由来する H 3 タンパク質でもなく : A / Aichi / 2 / 1968 ; A / Philippines / 2 / 1982 ; A / Mississippi / 1 / 1985 ; A / Leningrad / 360 / 1986 ; A / Sichuan / 2 / 1987 ; A / Shanghai / 11 / 1987 ; A / Beijing / 353 / 1989 ; A / Shandong / 9 / 1993 ; A / Johannesburg / 33 / 1994 ; A / Nanchang / 813 / 1995 ; A / Sydney / 5 / 1997 ; A / Moscow / 10 / 1999 ; A / Panama / 2007 / 1999 ; A / Fuzian / 411 / 2002 ; A / Wyoming / 3 / 2003 ; A / Oklahoma / 323 / 2003 ; A / California / 7 / 2004 ; A / Wisconsin / 65 / 2005 、前記特徴的な部分がアンブレラトポロジーグリカンに結合する、特徴的な部分。

(項目 19)

項目 17 または項目 18 に記載の特徴的な部分が含まれているポリペプチド。

(項目 20)

項目 17 または項目 18 に記載の特徴的な部分をコードする核酸。

(項目 21)

項目 19 に記載のポリペプチドをコードする核酸。

(項目 22)

項目 20 に記載の核酸が含まれているベクター。

(項目 23)

項目 21 に記載の核酸が含まれているベクター。

(項目 24)

項目 20 に記載の核酸が含まれている宿主細胞。

(項目 25)

項目 21 に記載の核酸が含まれている宿主細胞。

(項目 26)

項目 22 に記載のベクターが含まれている宿主細胞。

(項目 27)

項目 23 に記載のベクターが含まれている宿主細胞。

(項目 28)

アンブレラトポロジーグリカンに結合する操作された HA ポリペプチドに結合する抗体

。

(項目 29)

HA ポリペプチドに結合する抗体であって、 HA ポリペプチドは、以下の株のいずれに由来する H1 タンパク質でもなく : A / South Carolina / 1 / 1918 ; A / Puerto Rico / 8 / 1934 ; A / Taiwan / 1 / 1986 ; A / Texas / 36 / 1991 ; A / Beijing / 262 / 1995 ; A / Johnn esburg / 92 / 1996 ; A / New Caledonia / 20 / 1999 ; A / Solomon Islands / 3 / 2006 、または、以下の株のいずれに由来する H2 タンパク質でもなく : A / Japan / 305+ / 1957 ; A / Singapore / 1 / 1957 ; A / Taiwan / 1 / 1964 ; A / Taiwan / 1 / 1967 、または、以下の株のいずれに由来する H3 タンパク質でもなく : A / Aichi / 2 / 1968 ; A / Philippines / 2 / 1982 ; A / Mississippi / 1 / 1985 ; A / Leningrad / 360 / 1986 ; A / Sichuan / 2 / 1987 ; A / Shanghai / 11 / 1987 ; A / Beijing / 353 / 1989 ; A / Shandong / 9 / 1993 ; A / Johannesburg / 33 / 1994 ; A / Nanchang / 813 / 1995 ; A / Sydney / 5 / 1997 ; A / Moscow / 10 / 1999 ; A / Panama / 2007 / 1999 ; A / Fujian / 411 / 2002 ; A / Wyoming / 3 / 2003 ; A / Oklahoma / 323 / 2003 ; A / California / 7 / 2004 ; A / Wisconsin / 65 / 2005 、前記 HA ポリペプチドがアンブレラトポロジーグリカンに結合する、抗体。

(項目 30)

抗体がポリクローナルである、項目 28 または項目 29 に記載の抗体。

(項目 31)

抗体がモノクローナルである、項目 28 または項目 29 に記載の抗体。

(項目 32)

アンブレラトポロジーグリカンに結合する操作された HA ポリペプチドが含まれているウイルス粒子。

(項目 33)

インフルエンザ感染を処置する方法であって、アンブレラトポロジーグリカンに結合する操作された HA ポリペプチド、アンブレラトポロジーグリカンに結合する操作された HA ポリペプチドの特徴的な断片が含まれているポリペプチド、アンブレラトポロジーグリカンに結合する操作された HA ポリペプチドに結合する抗体、またはその特徴的な部分、

アンブレラトポロジーグリカンに結合する操作されたH A ポリペプチドをコードする核酸、またはその特徴的な部分、あるいはそれらの組み合わせが含まれている組成物を投与することによる、方法。

(項目34)

ヒトの上気道組織の中のH A受容体上に見られるグリカンのうち、少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはそれ以上のグリカン構造が含まれている、グリカンアレイ。

(項目35)

H A ポリペプチドを同定または特性決定するための方法であって、以下の工程：  
H A タンパク質が含まれている試料を提供する工程；  
前記試料を項目26に記載のグリカンアレイと接触させる工程；および  
前記アレイ上の1つ以上のグリカンに対するH A の結合を検出する工程、  
が含まれる、方法。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1a】図1aは表1である。

【図1b】図1bは表1続きである。

【図1c】図1cは表2である。

【図1d】図1dは表3である。

【図1e】図1eは表3続きである。

【図1f】図1fは表3続きである。

【図1】野生型H Aの例示的な配列のアラインメント。配列は、NCBIのインフルエンザウイルス配列データベース(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.htm1>)から入手した。

【図1A】野生型H Aの例示的な配列のアラインメント。配列は、NCBIのインフルエンザウイルス配列データベース(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.htm1>)から入手した。

【図1B】野生型H Aの例示的な配列のアラインメント。配列は、NCBIのインフルエンザウイルス配列データベース(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.htm1>)から入手した。

【図1C】野生型H Aの例示的な配列のアラインメント。配列は、NCBIのインフルエンザウイルス配列データベース(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.htm1>)から入手した。

【図2】H Aグリカン結合ドメインの配列アラインメント。灰色：シアル酸への結合に関与している保存されているアミノ酸。赤色：Neu5Ac 2-3/6Galモチーフへの結合に関与している特定のアミノ酸。黄色：Q226(137、138)およびE190(186、228)の位置に影響を与えるアミノ酸。緑色：Neu5Ac 2-3/6Galモチーフに結合した他の単糖(または修飾されたもの)への結合に関与しているアミノ酸。ASI30、APR34、ADU63、ADS97、およびViet04についての配列は、それらのそれぞれの結晶構造から得た。他の配列は、SwissProt(<http://us.expasy.org>)から得た。省略形：ADA76、A/duck/Alberta/35/76(H1N1)；ASI30、A/Swine/Iowa/30(H1N1)；APR34、A/Puerto Rico/8/34(H1N1)；ASC18、A/South Carolina/1/18(H1N1)、AT91、A/Texas/36/91(H1N1)；ANY18、A/New York/1/18(H1N1)；ADU63、A/Duck/Ukraine/1/63(H3N8)；AAI68、A/Aichi/2/68(H3N2)；AM99、A/Moscow/10/99(H3N2)；ADS97、A/Duck/Singapore/3/97(H5N3)；Viet04、A/Vietnam/1203/2004(H5N1)。

【図2A】HAグリカン結合ドメインの配列アラインメント。灰色：シアル酸への結合に関与している保存されているアミノ酸。赤色：Neu5Ac 2-3/6Galモチーフへの結合に関与している特定のアミノ酸。黄色：Q226(137、138)およびE190(186、228)の位置に影響を与えるアミノ酸。緑色：Neu5Ac 2-3/6Galモチーフに結合した他の単糖（または修飾されたもの）への結合に関与しているアミノ酸。ASI30、APR34、ADU63、ADS97、およびViet04についての配列は、それらのそれぞれの結晶構造から得た。他の配列は、SwissProt(<http://us.expasy.org>)から得た。省略形：ADA76、A/duck/Alberta/35/76(H1N1)；ASI30、A/Swine/Iowa/30(H1N1)；APR34、A/Puerto Rico/8/34(H1N1)；ASC18、A/South Carolina/1/18(H1N1)、AT91、A/Texas/36/91(H1N1)；ANY18、A/New York/1/18(H1N1)；ADU63、A/Duck/Ukraine/1/63(H3N8)；AAI68、A/Aichi/2/68(H3N2)；AM99、A/Moscow/10/99(H3N2)；ADS97、A/Duck/Singapore/3/97(H5N3)；Viet04、A/Vietnam/1203/2004(H5N1)。

【図2B】HAグリカン結合ドメインの配列アラインメント。灰色：シアル酸への結合に関与している保存されているアミノ酸。赤色：Neu5Ac 2-3/6Galモチーフへの結合に関与している特定のアミノ酸。黄色：Q226(137、138)およびE190(186、228)の位置に影響を与えるアミノ酸。緑色：Neu5Ac 2-3/6Galモチーフに結合した他の単糖（または修飾されたもの）への結合に関与しているアミノ酸。ASI30、APR34、ADU63、ADS97、およびViet04についての配列は、それらのそれぞれの結晶構造から得た。他の配列は、SwissProt(<http://us.expasy.org>)から得た。省略形：ADA76、A/duck/Alberta/35/76(H1N1)；ASI30、A/Swine/Iowa/30(H1N1)；APR34、A/Puerto Rico/8/34(H1N1)；ASC18、A/South Carolina/1/18(H1N1)、AT91、A/Texas/36/91(H1N1)；ANY18、A/New York/1/18(H1N1)；ADU63、A/Duck/Ukraine/1/63(H3N8)；AAI68、A/Aichi/2/68(H3N2)；AM99、A/Moscow/10/99(H3N2)；ADS97、A/Duck/Singapore/3/97(H5N3)；Viet04、A/Vietnam/1203/2004(H5N1)。

【図3】H1 HAに特徴的な保存されているサブ配列を示している配列アラインメント。

【図3A】H1 HAに特徴的な保存されているサブ配列を示している配列アラインメント。

【図3B】H1 HAに特徴的な保存されているサブ配列を示している配列アラインメント。

【図4】H3 HAに特徴的な保存されているサブ配列を示している配列アラインメント。

【図4A】H3 HAに特徴的な保存されているサブ配列を示している配列アラインメント。

【図4B】H3 HAに特徴的な保存されているサブ配列を示している配列アラインメント。

【図5A】H5 HAに特徴的な保存されているサブ配列を示している配列アラインメント。

【図5A-1】H5 HAに特徴的な保存されているサブ配列を示している配列アラインメント。

【図5A-2】H5 HAに特徴的な保存されているサブ配列を示している配列アラインメント。

【図 5 B】H 5 HA に特徴的な保存されているサブ配列を示している配列アラインメント。

【図 5 B - 1】H 5 HA に特徴的な保存されているサブ配列を示している配列アラインメント。

【図 5 B - 2】H 5 HA に特徴的な保存されているサブ配列を示している配列アラインメント。

【図 5 B - 3】H 5 HA に特徴的な保存されているサブ配列を示している配列アラインメント。

【図 5 B - 4】H 5 HA に特徴的な保存されているサブ配列を示している配列アラインメント。

【図 5 B - 5】H 5 HA に特徴的な保存されているサブ配列を示している配列アラインメント。

【図 5 B - 6】H 5 HA に特徴的な保存されているサブ配列を示している配列アラインメント。

【図 6】グリカン受容体特異性を理解するための構想。 2 - 3 - および / または 2 - 6 - 結合グリカンは、様々なトポロジーを採用することができる。本発明にしたがって、特定のこれらのトポロジーに対して結合する HA ポリペプチドの能力は、様々な宿主、例えば、ヒトの感染を媒介する能力をこれに付与する。この図において示されるように、本発明では、2つの特に関連のあるトポロジー（「コーン」トポロジーと「アンブレラ」トポロジー）が定義される。コーントポロジーは、2 - 3 - および / または 2 - 6 - 結合グリカンによって採用され得、そして、コアに結合した短いオリゴ糖または分岐したオリゴ糖の典型である（しかし、このトポロジーは、特定の長いオリゴ糖によっても採用され得る）。アンブレラトポロジーは、2 - 6 - 結合グリカンだけによって採用され得（おそらく、2 - 6 結合の中に存在する余分な C 5 - C 6 結合によってもたらされる立体構造の数の増大が原因である）、そして長いオリゴ糖分岐（特に、モチーフ Neu5Ac 2 - 6 Gal 1 - 3 / 4 GlcNAc - を含むもの）を有している長いオリゴ糖または分岐したグリカンによって主に採用される。本明細書中に記載されるように、アンブレラグリカントポロジーに結合する HA ポリペプチドの能力により、ヒト受容体への結合、および / またはヒトの感染を媒介する能力が付与される。

【図 7】コーングリカントポロジー対アンブレラグリカントポロジーを有している HA 残基の相互作用。 HA - グリカンの共晶の分析により、 HA 結合部位に対する Neu5Ac の位置がほぼ不变であることが明らかにされている。 Neu5Ac との接触には、 F 98 、 S / T 136 、 W 153 、 H 183 、および L / I 194 のような高度に保存されている残基が関与している。他の糖との接触には、糖結合が 2 - 3 であるか、または 2 - 6 であるか、そしてグリカントポロジーがコーンであるか、またはアンブレラであるかに応じて、様々な残基が関与する。例えば、コーントポロジーにおいては、主要な接触は、 Neu5Ac と、および Gal 糖である。 E 190 および Q 226 は、この結合において特に重要な役割を担っている。この図はまた、コーン構造に対する結合に関与し得る他の位置（例えば、 137 、 145 、 186 、 187 、 193 、 222 ）も示している。いくつかの場合には、様々な残基が様々なグリカン構造と様々な接触を形成し得る。これらの位置にあるアミノ酸のタイプは、グリカン構造の中に様々な修飾および / または分岐パターンを有している受容体に結合する HA ポリペプチドの能力に影響を与える。アンブレラトポロジーにおいては、接触は、 Neu5Ac および Gal の域を超えて、複数の糖と形成される。この図では、アンブレラ構造への結合に関与し得る残基（例えば、 137 、 145 、 156 、 159 、 186 、 187 、 189 、 190 、 192 、 193 、 196 、 222 、 225 、 226 ）を示している。いくつかの場合には、様々な残基が、様々なグリカン構造と様々な接触を形成し得る。これらの位置にあるアミノ酸のタイプは、グリカン構造の中に様々な修飾および / または分岐パターンを有している受容体に結合する HA ポリペプチドの能力に影響を与える。いくつかの実施形態においては、 190 位の D 残基、および / または 225 位の D 残基が、アンブレラトポロジーへの結合に寄与する。

【図8】例示的なコートポロジー。この図は、コートポロジーを採用する特定の例示的な（しかし、包括的ではない）グリカン構造を説明している。

【図9】例示的なアンプレラトポロジー。この図は、アンプレラトポロジーを採用する特定の例示的な（しかし、包括的ではない）グリカン構造を説明している。

【図10A】ヒトの気管支上皮細胞およびヒト結腸上皮細胞のグリカンプロフィール。上気道組織の中でのグリカンの多様性をさらに調べるために、N結合グリカンをHBE（代表的な上気道細胞株）から単離し、そしてMALDI-MSを使用して分析した。HBE中のa2-6の顕著な発現を、シアリダーゼS（a2-3特異的）とシアリダーゼA（切断およびSA）での試料の事前処理によって確認した。長い分岐トポロジーを有しているグリカンの顕著な発現は、典型的な質量ピーク（シアンで強調）のTOF-TOFフラグメンテーション解析によってサポートされる。上気道組織におけるグリカンの多様性についての基準を得るために、ヒトの結腸上皮細胞（HT29；典型的な腸細胞株）のN結合グリカンプロフィールを得た。この細胞株は、現在のH5N1ウイルスが腸細胞に感染することが示されていることから選択した。シアリダーゼAとSでの事前処理の対照は、HT-29細胞において、a2-3グリカン（赤で強調）の顕著な発現を示した。さらに、長い分岐したグリカントポロジーは、HBEについて観察されたほどには観察されなかつた。したがって、H5N1 HAのヒトでの採用には、ヒトの上気道組織で発現された多様なグリカン（例えば、アンプレラグリカン）に対する高い親和性での結合を可能にするHA変異が含まれるであろう。

【図10B】ヒトの気管支上皮細胞およびヒト結腸上皮細胞のグリカンプロフィール。上気道組織の中でのグリカンの多様性をさらに調べるために、N結合グリカンをHBE（代表的な上気道細胞株）から単離し、そしてMALDI-MSを使用して分析した。HBE中のa2-6の顕著な発現を、シアリダーゼS（a2-3特異的）とシアリダーゼA（切断およびSA）での試料の事前処理によって確認した。長い分岐トポロジーを有しているグリカンの顕著な発現は、典型的な質量ピーク（シアンで強調）のTOF-TOFフラグメンテーション解析によってサポートされる。上気道組織におけるグリカンの多様性についての基準を得るために、ヒトの結腸上皮細胞（HT29；典型的な腸細胞株）のN結合グリカンプロフィールを得た。この細胞株は、現在のH5N1ウイルスが腸細胞に感染することが示されていることから選択した。シアリダーゼAとSでの事前処理の対照は、HT-29細胞において、a2-3グリカン（赤で強調）の顕著な発現を示した。さらに、長い分岐したグリカントポロジーは、HBEについて観察されたほどには観察されなかつた。したがって、H5N1 HAのヒトでの採用には、ヒトの上気道組織で発現された多様なグリカン（例えば、アンプレラグリカン）に対する高い親和性での結合を可能にするHA変異が含まれるであろう。

【図11A】データ検索プラットフォーム（図11A）には、データ検索プラットフォームの主要な要素が示されている。データベースから抽出されるデータオブジェクトから特徴が導かれる。特徴は、パターンまたは規則を導くための分類方法によって使用されるデータセットになるように準備される。（図11B）は、使用者がグリカンアレイデータにデータ検索プロセスを適用できる重要なソフトウェアモジュールを示す。

【図11B】データ検索プラットフォーム（図11A）には、データ検索プラットフォームの主要な要素が示されている。データベースから抽出されるデータオブジェクトから特徴が導かれる。特徴は、パターンまたは規則を導くための分類方法によって使用されるデータセットになるように準備される。（図11B）は、使用者がグリカンアレイデータにデータ検索プロセスを適用できる重要なソフトウェアモジュールを示す。

【図12A】データ検索分析で使用した特徴。この図は、グリカンマイクロアレイ上のグリカンからまとめた様々なタイプのペア、トリプレット、およびクアドロプレットを説明している典型的なモチーフとして、本明細書中で定義される特徴を示す。これらの特徴の選択の論理的根拠は、HAのグリカン結合部位に対するジ-四糖の結合に基づく。最終的なデータセットには、グリカンに由来する特徴と、さらに、アレイ上でスクリーニングしたHAのそれぞれについての結合シグナルが含まれる。様々な分類方法のうち、ルールイ

ンダクション分類法 (rule induction classification method) を利用した。この方法の主要な利点のうちの1つは、これにより、他の統計学的方法または数学的方法と比較した場合に、より簡単に解釈できるIF-THEN規則が生じることである。分類の2つの主要な目的は以下である：(1)高親和性のグリカンリガンド（これは結合を促進する）のセットについて存在する特徴を特定すること、および(2)結合に好ましくない低親和性のグリカンリガンドに存在する特徴を特定すること。

【図12B】データ検索分析で使用した特徴。この図は、グリカンマイクロアレイ上のグリカンからまとめた様々なタイプのペア、3つ、および4つを説明している典型的なモチーフとして、本明細書中で定義される特徴を示す。これらの特徴の選択の論理的根拠は、HAのグリカン結合部位に対するジ-四糖の結合に基づく。最終的なデータセットには、グリカンに由来する特徴と、さらに、アレイ上でスクリーニングしたHAのそれぞれについての結合シグナルが含まれる。様々な分類方法のうち、ルールインダクション分類法 (rule induction classification method) を利用した。この方法の主要な利点のうちの1つは、これにより、他の統計学的方法または数学的方法と比較した場合に、より簡単に解釈できるIF-THEN規則が生じることである。分類の2つの主要な目的は以下である：(1)高親和性のグリカンリガンド（これは結合を促進する）のセットについて存在する特徴を特定すること、および(2)結合に好ましくない低親和性のグリカンリガンドに存在する特徴を特定すること。

【図13】データ検索分析で使用した分類子。この図は、分類子idsと規則の表を示す。

【図14】Neu5Ac 2-3GalモチーフとNeu5Ac 2-6Galモチーフの立体構造のマップと溶媒露出度。パネルAは、Neu5Ac 2-3Gal結合の立体構造のマップを示す。富化領域2は、APR34\_H1\_23、ADU63\_H3\_23、およびADS97\_H5\_23共晶構造において観察されたトランス立体構造である。富化領域1は、AAI68\_H3\_23共晶構造において観察された立体構造である。パネルBは、Neu5Ac 2-6Galの立体構造のマップを示し、ここで、シス立体構造（富化領域3）が、HA-2-6シアリル化グリカン共晶構造の全てにおいて観察される。パネルCは、それぞれのHA-グリカン共晶構造中のNeu5Ac 2-3と2-6シアリル化オリゴ糖の溶媒露出表面積 (SASA) の差を示す。赤とシアンの棒は、それぞれ、2-6（ポジティブな値）または2-3（ネガティブな値）シアリル化グリカンの中のNeu5Acが、グリカン結合部位とさらに接触することを示している。パネルDは、ブタとヒトのH1 (H1\_2-3)、トリおよびヒトのH3 (H3\_2-3)に結合した2-3シアリル化グリカンのNeuAcのSASAと、ブタおよびヒトのH1 (H1\_2-6)に結合した2-6シアリル化グリカンのNeuAcのSASAとの差を示す。H3\_2-3についてのシアンのネガティブな棒は、トリのH3と比較して、ヒトH3 HAのNeu5Ac 2-3Galとのより少ない接触を示している。ねじれ角- : C2-C1-O-C3 (Neu5Ac 2-3/6結合について) ; : C1-O-C3-H3 (Neu5Ac 2-3Gal結合について)、またはC1-O-C6-C5 (Neu5Ac 2-6Gal結合について) ; : O-C6-C5-H5 (Neu5Ac 2-6Gal結合について)。マップは、Martin Frank博士とClaus-Wilhelm von der Lieth博士 (German Cancer Research Institute, Heidelberg, Germany) によって開発されたGlycoMaps DB (<http://www.glycosciences.de/modeling/glycomapsdb/>) から得た。高エネルギーから低エネルギーまでの着色図解は、それぞれ、明るい赤から明るい緑である。

【図15A】2-3/6シアリル化グリカンに対するH1、H3、およびH5 HAの結合に関与している残基。パネルA-Dは、ASI30\_H1、APR34\_H1、ADU63\_H3、およびADS97\_H5共晶構造において、それぞれ、2-3および

2 - 6 シアリル化グリカンと相互作用している残基の溶媒露出表面積 (SASA) の差 (横座標の ) を示す。緑色の棒はグリカンと直接相互作用する残基に対応し、そして明るいオレンジ色の棒は、Glu / Asp 190 と Gln / Leu 226 に近接している残基に対応する。緑色の棒についてのポジティブな の値は、その残基が 2 - 6 シアリル化グリカンとより接触することを示しており、一方、ネガティブな の値は、 2 - 3 シアリル化グリカンとより接触することを示している。パネル E には、表の形式で、H1、H3、および H5 HA の中の 2 - 3 / 6 シアリル化グリカンへの結合に関与している残基をまとめる。 2 - 3 シアリル化グリカンへの結合に関与している特定の重要な残基は青で色をつけ、 2 - 6 シアリル化グリカンへの結合に関与している特定の重要な残基には赤で色をつけた。

【図 15 B】 2 - 3 / 6 シアリル化グリカンに対する H1、H3、および H5 HA の結合に関与している残基。パネル A - D は、ASI 30\_H1、APR 34\_H1、ADU 63\_H3、および ADS 97\_H5 共晶構造において、それぞれ、 2 - 3 および 2 - 6 シアリル化グリカンと相互作用している残基の溶媒露出表面積 (SASA) の差 (横座標の ) を示す。緑色の棒はグリカンと直接相互作用する残基に対応し、そして明るいオレンジ色の棒は、Glu / Asp 190 と Gln / Leu 226 に近接している残基に対応する。緑色の棒についてのポジティブな の値は、その残基が 2 - 6 シアリル化グリカンとより接触することを示しており、一方、ネガティブな の値は、 2 - 3 シアリル化グリカンとより接触することを示している。パネル E には、表の形式で、H1、H3、および H5 HA の中の 2 - 3 / 6 シアリル化グリカンへの結合に関与している残基をまとめる。 2 - 3 シアリル化グリカンへの結合に関与している特定の重要な残基は青で色をつけ、 2 - 6 シアリル化グリカンへの結合に関与している特定の重要な残基には赤で色をつけた。

【図 15 C】 2 - 3 / 6 シアリル化グリカンに対する H1、H3、および H5 HA の結合に関与している残基。パネル A - D は、ASI 30\_H1、APR 34\_H1、ADU 63\_H3、および ADS 97\_H5 共晶構造において、それぞれ、 2 - 3 および 2 - 6 シアリル化グリカンと相互作用している残基の溶媒露出表面積 (SASA) の差 (横座標の ) を示す。緑色の棒はグリカンと直接相互作用する残基に対応し、そして明るいオレンジ色の棒は、Glu / Asp 190 と Gln / Leu 226 に近接している残基に対応する。緑色の棒についてのポジティブな の値は、その残基が 2 - 6 シアリル化グリカンとより接触することを示しており、一方、ネガティブな の値は、 2 - 3 シアリル化グリカンとより接触することを示している。パネル E には、表の形式で、H1、H3、および H5 HA の中の 2 - 3 / 6 シアリル化グリカンへの結合に関与している残基をまとめる。 2 - 3 シアリル化グリカンへの結合に関与している特定の重要な残基は青で色をつけ、 2 - 6 シアリル化グリカンへの結合に関与している特定の重要な残基には赤で色をつけた。

【図 15 D】 2 - 3 / 6 シアリル化グリカンに対する H1、H3、および H5 HA の結合に関与している残基。パネル A - D は、ASI 30\_H1、APR 34\_H1、ADU 63\_H3、および ADS 97\_H5 共晶構造において、それぞれ、 2 - 3 および 2 - 6 シアリル化グリカンと相互作用している残基の溶媒露出表面積 (SASA) の差 (横座標の ) を示す。緑色の棒はグリカンと直接相互作用する残基に対応し、そして明るいオレンジ色の棒は、Glu / Asp 190 と Gln / Leu 226 に近接している残基に対応する。緑色の棒についてのポジティブな の値は、その残基が 2 - 6 シアリル化グリカンとより接触することを示しており、一方、ネガティブな の値は、 2 - 3 シアリル化グリカンとより接触することを示している。パネル E には、表の形式で、H1、H3、および H5 HA の中の 2 - 3 / 6 シアリル化グリカンへの結合に関与している残基をまとめる。 2 - 3 シアリル化グリカンへの結合に関与している特定の重要な残基は青で色をつけ、 2 - 6 シアリル化グリカンへの結合に関与している特定の重要な残基には赤で色をつけた。

【図 15 E】 2 - 3 / 6 シアリル化グリカンに対する H1、H3、および H5 HA の

結合に関与している残基。パネルA - Dは、A S I 3 0 \_ H 1、A P R 3 4 \_ H 1、A D U 6 3 \_ H 3、およびA D S 9 7 \_ H 5共晶構造において、それぞれ、2 - 3および2 - 6シアリル化グリカンと相互作用している残基の溶媒露出表面積 (S A S A) の差 (横座標の ) を示す。緑色の棒はグリカンと直接相互作用する残基に対応し、そして明るいオレンジ色の棒は、G l u / A s p 1 9 0 とG l n / L e u 2 2 6 に近接している残基に対応する。緑色の棒についてのポジティブな の値は、その残基が 2 - 6シアリル化グリカンとより接触することを示しており、一方、ネガティブな の値は、2 - 3シアリル化グリカンとより接触することを示している。パネルEには、表の形式で、H 1、H 3、およびH 5 HAの中の 2 - 3 / 6シアリル化グリカンへの結合に関与している残基をまとめた。2 - 3シアリル化グリカンへの結合に関与している特定の重要な残基は青で色をつけ、2 - 6シアリル化グリカンへの結合に関与している特定の重要な残基には赤で色をつけた。

【図16】二分岐の 2 - 6シアリル化グリカン (コートポロジー) に対するV i e t 0 4 \_ H 5 HAの結合。伸張配座 (百日咳毒素の共晶構造から得られた; P D B I D : 1 P T O ) での、N e u 5 A c 2 - 6 G a 1 結合を有している表面に露出しているV i e t 0 4 \_ H 5 グリカン結合部位の立体視。L y s 1 9 3 (オレンジ色) は、この立体構造においてはグリカンと全く接触していない。この立体構造においてグリカンへの結合に関与している可能性があるさらに別のアミノ酸は、A s n 1 8 6、L y s 2 2 2、およびS e r 2 2 7 である。しかし、シス立体構造の 2 - 6シアリル化オリゴ糖へのHAの結合において観察された特定の接触は、伸張配座においては存在しない。いずれの特定の理論にも束縛されることはないが、本発明者らは、これが、伸張配座が (シス - 立体構造ほど最適に) HAに結合しない場合があることを示唆していることに注目する。分岐したN結合グリカン (この場合、N e u 5 A c 2 - 6 G a 1 1 - 4 G l c N A c b 分岐が、M a n 1 - 3 M a n (P D B I D : 1 L G C ) とM a n 1 - 6 M a n (P D B I D : 1 Z A G ) に結合させられている) の構造は、この結合のシス立体構造と伸張配座のいずれについても、V i e t 0 4 \_ H 5 HA結合部位のN e u 5 A c 2 - 6 G a 1 結合に対して重なりあった。この重なり合うことは、コアのM a n 1 - 6 M a n に結合させられたN e u 5 A c 2 - 6 G a 1 1 - 4 G l c N A c 分岐を有している構造が、(いずれの立体構造においても) 結合部位との好ましくない立体的重複を有していることを示している。一方、コアのM a n 1 - 3 M a n に結合させられたこの分岐を有している構造 (トリマンノースコアが紫色に着色されている図に示される) は、シス立体構造においては、L y s 1 9 3 と立体的な重複を有するが、伸張配座においてはL y s 1 9 3 と接触することなく結合することができるが、好ましくない。

【図17】W T H 1、H 3、およびH 5 HAの生産。パネルAは、4 ~ 1 2 %のS D S - ポリアクリルアミドゲルに上で泳動させ、ニトロセルロース膜上にプロットした、H 1 N 1 (A / S o u t h C a r o l i n a / 1 / 1 9 1 8 )、H 3 N 2 (A / M o s c o w / 1 0 / 1 9 9 9 )、およびH 5 N 1 (A / V i e t n a m / 1 2 0 3 / 2 0 0 4 ) に由来するHAタンパク質の可溶性形態を示す。H 1 N 1 HAは、ヤギ抗インフルエンザA抗体と抗ヤギI g G - H R Pを使用してプローブした。H 3 N 2は、フェレット抗H 3 N 2 HA抗血清と抗フェレットH R Pを使用してプローブした。H 5 N 1は、抗トリH 5 N 1 HA抗体と抗ウサギI g G - H R Pを使用してプローブした。H 1 N 1 HAとH 3 N 2 HAはHA0として存在し、一方、H 5 N 1 HAはHA0およびHA1の両方として存在する。パネルBは、S D S - ポリアクリルアミドゲル上で泳動させ、ニトロセルロース膜の上にプロットした、全長のH 5 N 1 HAと2つの変異体 (G l u 1 9 0 A s p、L y s 1 9 3 S e r、G l y 2 2 5 A s p、G l n 2 2 6 L e u、"D S D L "、およびG L u 1 9 0 A s p L y s 1 9 3 S e r G l n 2 2 3 L e u G l y 2 2 8 S e r、"D S L S " ) を示す。HAは、抗トリH 5 N 1抗体と抗ウサギI g G - H R Pでプローブした。

【図18】上気道組織の切片のレクチン染色。J a c a l i n (緑色) とC o n A (赤色) での気管組織の同時染色により、気管の先端面上の杯細胞に対するJ a c a l i n (O

結合グリカンに特異的に結合する)の優先的な結合と、絨毛のある気管上皮細胞に対する c o n A (N結合グリカンに特異的に結合する)の優先的な結合が明らかとなった。いずれの特定の理論にも束縛されることは望まないが、本発明者らは、この知見が、杯細胞が O結合グリカンを主に発現し、一方、絨毛を有している上皮細胞はN結合グリカンを主に発現することを示唆していることに注目する。J a c a l i n と S N A (赤色; 2 - 6 に特異的に結合する)での気管の同時染色は、杯細胞と絨毛細胞の両方に対する S N A の結合を示す。一方、J a c a l i n (緑色)と M A L (赤色) (これは、2 - 3 シアリル化グリカンに特異的に結合する)での同時染色は、多列気管上皮に対する M A L の結合が、最弱から結合がないことを示したが、組織の基部領域に対しては多数の結合を示した。まとめると、レクチンの染色データは、気管上皮の先端面上にある絨毛細胞と杯細胞の中の、それぞれ、N結合グリカンとO結合グリカンの両方の一部としての、2 - 6 シアリル化グリカンの優勢な発現と広範囲の分布を示している。

【図 19】上気道組織切片および下気道組織切片に対する組み換え体 H 1、H 3 W T H A の用量応答結合。H A の結合は、ヨウ化プロピジウム染色 (赤色) に対して緑色で示される。気管組織の先端面は、長い分岐トポロジーを有している 2 - 6 グリカンを主に発現する。他方、肺胞組織は、a 2 - 3 グリカンを主に発現する。H 1 H A は気管の先端面に有意に結合し、その結合は、40 から 10 ug / ml までの稀釀で、段階的に減少する。H 1 H A もまた、最大濃度でのみ、肺胞組織に対して、いくらかの弱い結合を示す。H 3 H A の結合パターンは H 1 H A の結合パターンとは異なる。例えば、H 3 H A は、40 および 20 ug / ml で、気管組織切片と肺胞組織切片の両方に対して有意な結合を示す。しかし、10 ug / ml の濃度では、H 3 H A は、気管組織の先端面に対して主な結合を示し、肺胞組織に対してはわずかな結合を示すかまたは結合を示さない。まとめると、これらの組織結合データは、気管組織の先端面に対する高親和性結合の重要性を強調している。さらに、これらのデータは、2 - 6 シアリル化グリカンに対する高い特異性 (H 1 H A によって明らかにされたもののような) は、ヒトの感染を媒介するためには絶対的に必要なものではないことを明らかにしている。なぜなら、H 3 H A は、2 - 3 シアリル化グリカンに対していくらかの親和性を示すからである。

【図 20】H 1、H 3、および H 5 W T H A の直接的な結合用量応答。上部から下部に向かって、様々な濃度での野生型 H 1、H 3、および H 5 H A について、それぞれ、結合シグナル (およそ 8 0 0 0 0 0 の飽和レベルに対して正規化した) を示す。グリカンについての説明を差し込み図として示す。ここで、L N は、G a l b 1 0 4 G 1 c N A c に対応し、3' S L N と 6' S L N は、それぞれ、L N で 2 - 3 と 2 - 6 結合したシアル酸に対応する。H 1 H A および H 3 H A の特徴的な結合パターン (これは、ヒトに感染するために採用される) は、40 ug / ml から 5 ug / ml に減少するまでの稀釀範囲全体にわたる長い 2 - 6 (6' S L N - L N) グリカンに対する飽和濃度でのそれらの結合である。H 1 H A は、長い 2 - 6 シアリル化グリカンに対する結合については高度に特異的であるが、H 3 H A は、短い 2 - 6 シアリル化グリカン (6' S L N) に対して高い親和性で、そして長い 2 - 3 に対して、2 - 6 と比較して、低い親和性で結合する。H 1 H A および H 3 H A のこの直接的な結合用量応答は、組織結合パターンと一致する。さらに、長い 2 - 6 シアリル化グリカンに対する H 1 H A と H 3 H A の高親和性の結合は、気管組織の先端面 (これは、長い分岐トポロジーを有している 2 - 6 シアリル化グリカンを発現する) に対するそれらの広域結合と相関関係がある。この相関関係により、ヒトに適応した H 1 H A および H 3 H A の上気道組織の向性についての有用な知見がもたらされる。一方、H 5 H A は、2 - 6 シアリル化グリカンに対するその比較的低い親和性 (有意なシグナルは、20 ~ 40 ug / ml でしか見られない) と比較して、2 - 3 シアリル化グリカンに対して高い親和性 (40 ug / ml から 2.5 ug / ml の濃度に減少するまでの飽和シグナル) で結合する、反対のグリカン結合傾向を示す。したがって、いずれの特定の理論にも束縛されることは望まないが、本発明は、H A ポリペプチド (例えば、トリ H 5 H A) のヒトへの適応の必要条件が、ヒトの気道上部で主に発現される長い 2 - 6 シアリル化グリカン (例えば、アンブレ

ラトポロジーグリカン)に対して高い親和性で結合する能力を獲得することであると提起する。

【発明を実施するための形態】

【0008】

H A 配列エレメントについての記載

H A 配列エレメント 1

H A 配列エレメント 1 は、自然界に存在しているインフルエンザ単離物において見られる多くの H A タンパク質のおよそ 97 位～185 位の残基(ここで、残基位置は、H 3 H A を参考として使用して割り当てられる)に対応する配列エレメントである。この配列エレメントは、以下の基本構造を有する：

C (Y / F) P X<sub>1</sub> C X<sub>2</sub> W X<sub>3</sub> W X<sub>4</sub> H H P、ここで：

X<sub>1</sub> は、およそ 30～45 アミノ酸長である；

X<sub>2</sub> は、およそ 5～20 アミノ酸長である；

X<sub>3</sub> は、およそ 25～30 アミノ酸長である；そして、

X<sub>4</sub> は、およそ 2 アミノ酸長である。

【0009】

いくつかの実施形態においては、X<sub>1</sub> は、約 35～45、または約 35～43、または約 35、36、37、38、38、40、41、42、もしくは 43 アミノ酸長である。いくつかの実施形態においては、X<sub>2</sub> は、約 9～15、または約 9～14、または約 9、10、11、12、13、もしくは 14 アミノ酸長である。いくつかの実施形態においては、X<sub>3</sub> は、約 26～28、または約 26、27、もしくは 28 アミノ酸長である。いくつかの実施形態においては、X<sub>4</sub> は、配列 (G / A) (I / V) を有する。いくつかの実施形態においては、X<sub>4</sub> は、配列 G I を有する；いくつかの実施形態においては、X<sub>4</sub> は、配列 G V を有する；いくつかの実施形態においては、X<sub>4</sub> は、配列 A I を有する；いくつかの実施形態においては、X<sub>4</sub> は、配列 A V を有する。いくつかの実施形態においては、H A 配列エレメント 1 にはジスルフィド結合が含まれる。いくつかの実施形態においては、このジスルフィド結合は、97 位および 139 位(本明細書中で利用した標準的な H 3 ナンバリングシステムに基づく)に相当する残基を架橋する。

【0010】

いくつかの実施形態において、特に H 1 ポリペプチドにおいては、X<sub>1</sub> は、約 43 アミノ酸長であり、そして / または X<sub>2</sub> は、約 13 アミノ酸長であり、そして / または X<sub>3</sub> は、約 26 アミノ酸長である。いくつかの実施形態において、特に H 1 ポリペプチドにおいては、H A 配列エレメント 1 は以下の構造を有する：

C Y P X<sub>1A</sub> T (A / T) (A / S) C X<sub>2</sub> W X<sub>3</sub> W X<sub>4</sub> H H P、ここで：

X<sub>1A</sub> は、およそ 27～42、またはおよそ 32～42、またはおよそ 32～40、またはおよそ 26～41、またはおよそ 31～41、またはおよそ 31～39、またはおよそ 31、32、33、34、35、36、37、38、39、もしくは 40 アミノ酸長であり、X<sub>2</sub> から X<sub>4</sub> は上記のとおりである。

【0011】

いくつかの実施形態において、特に H 1 ポリペプチドにおいては、H A 配列エレメント 1 は以下の構造を有する：

C Y P X<sub>1A</sub> T (A / T) (A / S) C X<sub>2</sub> W (I / L) (T / V) X<sub>3A</sub> W X<sub>4</sub> H H P、ここで：

X<sub>1A</sub> は、およそ 27～42、またはおよそ 32～42、またはおよそ 32～40、またはおよそ 32、33、34、35、36、37、38、39、もしくは 40 アミノ酸長であり、

X<sub>3A</sub> は、およそ 23～28、またはおよそ 24～26、またはおよそ 24、25、もしくは 26 アミノ酸長であり、そして、X<sub>2</sub> と X<sub>4</sub> は上記のとおりである。

【0012】

いくつかの実施形態において、特に H 1 ポリペプチドにおいては、H A 配列エレメント

1 には配列：

Q L S S I S S F E K

が、通常は、 $X_1$  ( $X_{1A}$  の中を含む) の中に、特に  $X_1$  の約 12 位の残基で始まるよう に、(例えば、図 1 ~ 3 に示すように) 含まれる。

【0013】

いくつかの実施形態において、特に H3 ポリペプチドにおいては、 $X_1$  は、約 39 アミノ酸長であり、そして / または  $X_2$  は、約 13 アミノ酸長であり、そして / または  $X_3$  は、約 26 アミノ酸長である。

【0014】

いくつかの実施形態において、特に H3 ポリペプチドにおいては、HA 配列エレメント 1 は以下の構造を有する：

C Y P X<sub>1A</sub> S (S / N) (A / S) C X<sub>2</sub> W X<sub>3</sub> W X<sub>4</sub> H H P、ここで：

$X_{1A}$  は、およそ 27 ~ 42、またはおよそ 32 ~ 42、またはおよそ 32 ~ 40、またはおよそ 23 ~ 38、またはおよそ 28 ~ 38、またはおよそ 28 ~ 36、またはおよそ 28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、もしくは 40 アミノ酸長であり、 $X_2$  から  $X_4$  は、上記のとおりである。

【0015】

いくつかの実施形態において、特に H3 ポリペプチドにおいては、HA 配列エレメント 1 は以下の構造を有する：

C Y P X<sub>1A</sub> S (S / N) (A / S) C X<sub>2</sub> W L (T / H) X<sub>3A</sub> W X<sub>4</sub> H H P、ここで：

$X_{1A}$  は、およそ 27 ~ 42、またはおよそ 32 ~ 42、またはおよそ 32 ~ 40、またはおよそ 32、33、34、35、36、37、38、39、もしくは 40 アミノ酸長であり、

$X_{3A}$  は、およそ 23 ~ 28、またはおよそ 24 ~ 26、またはおよそ 24、25、もしくは 26 アミノ酸長であり、 $X_2$  と  $X_4$  は上記のとおりである。

【0016】

いくつかの実施形態において、特に H3 ポリペプチドにおいては、HA 配列エレメント 1 には、配列：

(L / I) (V / I) A S S G T L E F

が、通常は、 $X_1$  ( $X_{1A}$  の中を含む) の中に、特に、 $X_1$  の約 12 位の残基で始まるよう に、(例えば、図 1、2、および 4 に示すように) 含まれる。

【0017】

いくつかの実施形態において、特に H5 ポリペプチドにおいては、 $X_1$  は、約 42 アミノ酸長であり、そして / または  $X_2$  は、約 13 アミノ酸長であり、そして / または  $X_3$  は、約 26 アミノ酸長である。

【0018】

いくつかの実施形態において、特に H5 ポリペプチドにおいては、HA 配列エレメント 1 は以下の構造を有する：

C Y P X<sub>1A</sub> S S A C X<sub>2</sub> W X<sub>3</sub> W X<sub>4</sub> H H P、ここで：

$X_{1A}$  は、およそ 27 ~ 42、またはおよそ 32 ~ 42、またはおよそ 32 ~ 40、またはおよそ 23 ~ 38、またはおよそ 28 ~ 38、またはおよそ 28 ~ 36、またはおよそ 28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、もしくは 40 アミノ酸長であり、 $X_2$  から  $X_4$  は上記のとおりである。

【0019】

いくつかの実施形態において、特に H5 ポリペプチドにおいては、HA 配列エレメント 1 は以下の構造を有する：

C Y P X<sub>1A</sub> S S A C X<sub>2</sub> W L I X<sub>3A</sub> W X<sub>4</sub> H H P、ここで：

$X_{1A}$  は、およそ 27 ~ 42、またはおよそ 32 ~ 42、またはおよそ 32 ~ 40、またはおよそ 32、33、34、35、36、37、38、39、もしくは 40 アミノ酸長

であり、

$X_{3A}$  は、およそ 23 ~ 28、またはおよそ 24 ~ 26、またはおよそ 24、25、もしくは 26 アミノ酸長であり、 $X_2$  と  $X_4$  は上記のとおりである。

【0020】

いくつかの実施形態において、特に H5 ポリペプチドにおいては、HA 配列エレメント 1 は、以下の配列によって伸張される（すなわち、186 位 ~ 193 位に対応する位置で）：

N D A A E X X ( K / R )。

【0021】

いくつかの実施形態において、特に H5 ポリペプチドにおいては、HA 配列エレメント 1 には、配列：

Y E E L K H L X S X X N H F E K

が、通常は、 $X_1$  の中に、特に、 $X_1$  の 6 位の残基で始まるように、（例えば、図 1、2、および 5 に示されるように）含まれる。

【0022】

HA 配列エレメント 2

HA 配列エレメント 2 は、自然界に存在しているインフルエンザ単離物において見られる多くの HA タンパク質のおよそ 324 位 ~ 340 位の残基（ここでも、H3 HA に基づくナンバリングシステムを使用する）に対応する配列エレメントである。この配列エレメントは以下の基本構造を有する：

G A I A G F I E

いくつかの実施形態において、HA 配列エレメント 2 は、以下の配列を有する：

P X<sub>1</sub> G A I A G F I E、ここで：

$X_1$  は、およそ 4 - 14 アミノ酸長、または約 8 - 12 アミノ酸長、または約 12、11、10、9、もしくは 8 アミノ酸長である。いくつかの実施形態において、この配列エレメントは、HA 0 切断部位を提供し、それにより HA 1 と HA 2 の生産を可能にする。

【0023】

いくつかの実施形態において、特に H1 ポリペプチドにおいては、HA 配列エレメント 2 は以下の構造を有する：

P S ( I / V ) Q S R X<sub>1A</sub> G A I A G F I E、ここで：

$X_{1A}$  は、およそ 3 アミノ酸長である；いくつかの実施形態においては、 $X_{1A}$  は、G (L / I) F である。

【0024】

いくつかの実施形態において、特に H3 ポリペプチドにおいては、HA 配列エレメント 2 は以下の構造を有する：

P X K X T R X<sub>1A</sub> G A I A G F I E、ここで：

$X_{1A}$  は、およそ 3 アミノ酸長である；いくつかの実施形態においては、 $X_{1A}$  は、G (L / I) F である。

【0025】

いくつかの実施形態において、特に H5 ポリペプチドにおいては、HA 配列エレメント 2 は以下の構造を有する：

P Q R X X X R X X R X<sub>1A</sub> G A I A G F I E、ここで：

$X_{1A}$  は、およそ 3 アミノ酸長である；いくつかの実施形態においては、 $X_{1A}$  は、G (L / I) F である。

【0026】

定義

親和性：当該分野で公知であるように、「親和性」は、そのパートナー（例えば、HA 受容体）に対する特定のリガンド（例えば、HA ポリペプチド）の結合の緊密度の尺度である。親和性は、様々な方法で測定することができる。

【0027】

生物学的活性：本明細書中で使用される場合は、表現「生物学的に活性」は、生体系において、特に、有機体の中で活性を有している、任意の物質の特徴をいう。例えば、有機体に投与されると、その有機体に対して生物学的作用を有する物質は、生物学的に活性であると見なされる。特定の実施形態においては、タンパク質またはポリペプチドが生物学的に活性である場合には、そのタンパク質またはポリペプチドの少なくとも1つの生物学的活性を共有しているそのタンパク質またはポリペプチドの一部分が、通常は、「生物学的に活性な」部分と呼ばれる。

## 【0028】

広域ヒト結合(BSHB)H5 HAポリペプチド：本明細書中で使用される場合は、表現「広域ヒト結合H5 HA」は、ヒトの上皮組織において見られるHA受容体に対して、特に、2-6シアリル化グリカンを有しているヒトHA受容体に対して結合する、H5 HAポリペプチドのバージョンをいう。さらに、本発明のBSHB H5 HAは、複数の様々な2-6シアリル化グリカンに結合する。いくつかの実施形態においては、BSHB H5 HAは、ヒトの試料中に見られる十分な数の様々な2-6シアリル化グリカン（それらを含むそのウイルスは、ヒトの集団に感染する幅広い能力を有している）に対して結合し、特に、それらの集団中の上気道受容体に対して結合する。いくつかの実施形態においては、BSHB H5 HAは、本明細書中に記載されるように、アンブレラグリカン（例えば、長い2-6シアリル化グリカン）に結合する。

## 【0029】

特徴的な部分：本明細書中で使用される場合は、タンパク質またはポリペプチドの「特徴的な部分」という表現は、いずれもタンパク質またはポリペプチドの特徴である、アミノ酸の連続するストレッチ、またはアミノ酸の連続するストレッチのコレクションを含むものである。個々のそのような連続するストレッチには、一般的には、少なくとも2つのアミノ酸が含まれるであろう。さらに、当業者は、タンパク質にとって特徴的であるためには、通常は、少なくとも5個、10個、15個、20個、またはそれ以上のアミノ酸が必要であることを理解するであろう。一般的には、特徴的な部分は、上記で特定された配列同一性に加えて、関連する完全なタンパク質と、少なくとも1つの機能的特徴を共有するものである。

## 【0030】

特徴的な配列：「特徴的な配列」は、ポリペプチドまたは核酸のファミリーの全てのメンバーにおいて見られ、したがって、そのファミリーのメンバーを定義するために当業者によって使用され得る配列である。

## 【0031】

コーントポロジー：表現「コーントポロジー」は、本明細書中で、特定のグリカンによって、特にHA受容体上のグリカンによって採用される3次元配置を指して使用される。図6に示されるように、コーントポロジーは、2-3シアリル化グリカンによって、または2-6シアリル化グリカンによって採用され得、これは通常は短いオリゴヌクレオチド鎖であるが、いくつかの長いオリゴヌクレオチドもまたこの立体構造を採用することができる。コーントポロジーは、Neu5Ac 2-3Gal結合のグリコシドのねじれ角によって特性決定される。これは、およそ-60、60、または180の(C1-C2-O-C3/C6)値と、-60から60の(C2-O-C3/C6-H3/C5)試料によって与えられる最小エネルギーの立体構造の3つの領域の見本をとる（図14）。図8は、コーントポロジーを採用するグリカンの特定の代表的な（包括的ではない）例を示す。

## 【0032】

対応する：本明細書中で使用される場合は、用語「～に対応する」は、HAポリペプチド中のアミノ酸残基の位置/同一性を指す際に、頻繁に使用される。当業者は、便宜上、標準的なナンバリングシステム（野生型H3 HAに基づく）が本明細書中で利用され（例えば、図1～5に説明されるように）、その結果、例えば、190位の残基に「対応する」アミノ酸が実際に特定のアミノ酸鎖中の190番目のアミノ酸である必要はなく、む

しろ、野生型 H 3 HA の 190 位に見られる残基に対応することを理解するであろう；当業者は、対応するアミノ酸を特定するための方法を容易に理解するであろう。

#### 【 0 0 3 3 】

分離度で取り出された：本明細書中で使用される場合は、「分離度で取り出された」アミノ酸は、グリカン結合に対して間接的な作用を有している HA アミノ酸である。例えば、1 分離度で取り出されたアミノ酸は：(1) 直接結合するアミノ酸と相互作用する；および / または (2) あるいは直接結合するアミノ酸の宿主細胞の HA 受容体と会合するグリカンと相互作用する能力に影響を与えるかのいずれかである；そのような 1 分離度で取り出されたアミノ酸は、グリカン自体に結合する場合も、また、グリカン自体には直接は結合しない場合もある。2 分離度で取り出されたアミノ酸は、(1) 1 分離度で取り出されたアミノ酸と相互作用する；および / または (2) あるいは 1 分離度で取り出されたアミノ酸の能力に影響を与えて直接結合するアミノ酸と相互作用するなどのいずれかである。

#### 【 0 0 3 4 】

直接結合するアミノ酸：本明細書中で使用される場合は、表現「直接結合するアミノ酸」は、宿主細胞の HA 受容体と会合した 1 つ以上のグリカンと直接相互作用する HA ポリペプチドのアミノ酸をいう。

#### 【 0 0 3 5 】

操作された：用語「操作された」は、本明細書中で使用される場合は、そのアミノ酸配列がヒトによって選択されたポリペプチドを表す。例えば、操作された HA ポリペプチドは、自然界に存在しているインフルエンザ単離物において見られる HA ポリペプチドのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態においては、操作された HA ポリペプチドは、N C B I データベースに含まれる HA ポリペプチドのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有する。

#### 【 0 0 3 6 】

H 1 ポリペプチド：「H 1 ポリペプチド」は、この用語が本明細書中で使用される場合は、そのアミノ酸配列に、H 1 の特徴であり、そして他の HA サブタイプから H 1 を区別する少なくとも 1 つの配列エレメントが含まれている、HA ポリペプチドである。代表的なそのような配列エレメントは、例えば、図 1 ~ 3 に示されるもののようなアラインメントによって決定することができ、これには例えば、HA 配列エレメントの H 1 特異的実施形態に関して本明細書中に記載されるものが含まれる。

#### 【 0 0 3 7 】

H 3 ポリペプチド：「H 3 ポリペプチド」は、この用語が本明細書中で使用される場合は、そのアミノ酸配列に、H 3 の特徴であり、そして他の HA サブタイプから H 3 を区別する少なくとも 1 つの配列エレメントが含まれている、HA ポリペプチドである。代表的なそのような配列エレメントは、例えば、図 1、2、および 4 に示されるようなアラインメントによって決定することができ、これには例えば、HA 配列エレメントの H 3 特異的実施形態に関して本明細書中に記載されるものが含まれる。

#### 【 0 0 3 8 】

H 5 ポリペプチド：「H 5 ポリペプチド」は、この用語が本明細書中で使用される場合は、そのアミノ酸配列に、H 5 の特徴であり、そして他の HA サブタイプから H 5 を区別する少なくとも 1 つの配列エレメントが含まれている、HA ポリペプチドである。代表的なそのような配列エレメントは、例えば、図 1、2、および 5 に示されるようなアラインメントによって決定することができ、これには例えば、HA 配列エレメントの H 5 特異的実施形態に関して本明細書中に記載されるものが含まれる。

#### 【 0 0 3 9 】

ヘマグルチニン ( HA ) ポリペプチド：本明細書中で使用される場合は、用語「ヘマグルチニンポリペプチド」( または「 HA ポリペプチド」 ) は、そのアミノ酸配列に、 HA の少なくとも 1 つの特徴的な配列が含まれているポリペプチドをいう。インフルエンザ単離物に由来する多種多様な HA 配列が当該分野で公知である；実際、 National

Center for Biotechnology Information (NCBI) は、本願の出願時点で、9796のHA配列を含むデータベース (www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/flu.html) を保持している。当業者は、このデータベースを参照して、HAポリペプチドの一般的に特徴的な配列、および/または特定のHAポリペプチド（例えば、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15、もしくはH16ポリペプチド）に特徴的な配列：あるいは、特定の宿主（例えば、トリ、ラクダ、イヌ、ネコ、ジャコウネコ、環境、ウマ、ヒト、ヒョウ、ミンク、マウス、アザラシ、ストーンマーチン、ブタ、トラ、クジラなど）の感染を媒介するHAに特徴的な配列を容易に同定することができる。例えば、いくつかの実施形態においては、HAポリペプチドには、インフルエンザウイルスの自然界に存在している単離物において見られるHAタンパク質の、約97位と185位、324位と340位、96位と100位、および/または130位～230位の残基の間に見られる1つ以上の特徴的な配列エレメントが含まれる。いくつかの実施形態においては、HAポリペプチドは、本明細書中で定義されるHA配列エレメント1および2のうちの少なくとも1つが含まれているアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態においては、HAポリペプチドは、HA配列エレメント1および2が含まれているアミノ酸配列を有しており、いくつかの実施形態においては、互いに、約100～200、または約125～175、または約125～160、または約125～150、または約129～139、または約129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、もしくは139アミノ酸の間隔を隔てて有している。いくつかの実施形態においては、HAポリペプチドは、グリカンの結合に関与している96位～100位、および/または130位～230位の領域の中の位置に残基が含まれているアミノ酸配列を有する。例えば、多くのHAポリペプチドには、以下の残基のうちの1つ以上が含まれる：Tyr98、Ser/Thr136、Trp153、His183、およびLeu/Ile194。いくつかの実施形態においては、HAポリペプチドには、これらの残基のうちの少なくとも2個、3個、4個、または5個全てが含まれる。

#### 【0040】

単離された：用語「単離された」は、本明細書中で使用される場合は、(i) 最初に生産された（自然界において、または実験の設定においてかは問わない）際にそれが会合している成分のうちの少なくともいくつかから分離されているか；あるいは、(ii) 人の手によって生産されたかのいずれかである薬剤または物質をいう。単離された薬剤または物質は、それらが最初に会合していた他の成分のうちの少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ以上を分離することができる。いくつかの実施形態においては、単離された薬剤は、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%を超えて純粹である。

#### 【0041】

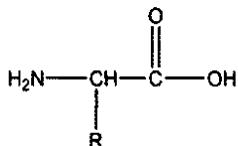
長いオリゴ糖：本開示の目的のために、オリゴ糖は、通常、これが少なくとも4個の糖残基を有している少なくとも1つの直鎖を含む場合に「長い」と見なされる。

#### 【0042】

自然界には存在しないアミノ酸：表現「自然界には存在しないアミノ酸」は、アミノ酸の化学構造（すなわち：

#### 【0043】

#### 【化1】



を有しており、したがって、少なくとも2つのペプチド結合に関与することができるが、自然界において見られるものとは異なるR基を有している物質をいう。いくつかの実施形

態においては、自然界には存在しないアミノ酸はまた、水素ではない第2のR基を有する場合もあり、そして／また、アミノ酸部分またはカルボン酸部分の上に1つ以上の他の置換を有する場合もある。

#### 【0044】

ポリペプチド：「ポリペプチド」は、一般的に言うと、ペプチド結合によって互いに結合させられた少なくとも2個のアミノ酸の並びである。いくつかの実施形態においては、ポリペプチドには、少なくとも3～5個のアミノ酸が含まれ得、これらのアミノ酸はそれぞれ、少なくとも1つのペプチド結合によって互いに結合される。当業者は、ポリペプチドに、それでもなおポリペプチド鎖に組み込むことができる「自然界には存在しない」アミノ酸または他の物質が任意に含まれる場合がしばしばあることを理解するであろう。

#### 【0045】

純粋：本明細書中で使用される場合は、薬剤または物質は、それに他の成分が実質的に含まれていない場合には「純粋」である。例えば、特定の薬剤または物質が90%より多くを占めている調製物は、通常、純粋な調製物とみなされる。いくつかの実施形態においては、薬剤または物質は、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%純粋である。

#### 【0046】

短いオリゴ糖：本開示の目的のために、オリゴ糖は、通常、任意の直鎖の中に4個未満、または確実には、3個未満の残基を有している場合には、「短い」と見なされる。

#### 【0047】

特異性：当該分野で公知であるように、「特異性」は、その結合パートナー（例えば、ヒトH A受容体、および具体的には、ヒト上気道H A受容体）を他の可能性のある結合パートナー（例えば、トリH A受容体）から区別する、特定のリガンド（例えば、H Aポリペプチド）の能力の尺度である。

#### 【0048】

治療薬：本明細書中で使用される場合は、表現「治療薬」は、所望される生物学的または薬理学的作用を誘発する任意の薬剤をいう。

#### 【0049】

処置：本明細書中で使用される場合は、用語「処置」は、疾患、障害、もしくは症状の1つ以上の症候または状況を緩和する、その発症を遅らせる、その重篤度または発生を軽減する、あるいはその予防を行うために使用される任意の方法をいう。本発明の目的のために、処置は、症候の発症の前、発症の間、および／または発症後に投与することができる。

#### 【0050】

アンブレラトポロジー：表現「アンブレラトポロジー」は、本明細書中では、特定のグリカンによって、特にH A受容体上のグリカンによって採用される3次元配置をいうために使用される。本発明には、アンブレラトポロジー／グリカンに対する結合が、ヒト宿主の感染を媒介するH Aタンパク質の特徴であることの認識が含まれる。図6に示されるように、アンブレラトポロジーは、通常、2-6シアリル化グリカンだけによって採用され、そして通常は長い（例えば、4糖よりも長い）オリゴ糖である。アンブレラトポロジーの一例は、およそ-60の、Neu5Ac 2-6Gal結合の角によって与えられる（例えば、図14を参照のこと）。図9は、アンブレラトポロジーを採用するグリカンの特定の代表的な（包括的ではない）例を示す。

#### 【0051】

ワクチン接種：本明細書中で使用される場合は、用語「ワクチン接種」は、（例えば、疾患の原因となる物質に対する）免疫応答を生じさせることが意図される組成物の投与をいう。本発明の目的のために、ワクチン接種は、疾患の原因となる物質への暴露の前に、その間に、および／またはその後に投与することができ、特定の実施形態においては、物質への暴露の前、間、および／または直後に投与することができる。いくつかの実施形態においては、ワクチン接種には、適切な時間の間隔をあけた、ワクチン組成物の複数回の

投与が含まれる。

#### 【0052】

変異体：本明細書中で使用される場合は、用語「変異体」は、その配列が比較される特定の目的のHAポリペプチドと「もとの」HAポリペプチドとの間での関係を表す相対的な用語である。目的のHAポリペプチドは、目的のHAポリペプチドが、もとのアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列を有しているが、特定の位置に少数の配列変化を有している場合に、もとのHAポリペプチドの「変異体」であると見なされる。通常は、変異体の残基の20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%未満が、もとの残基と比較して置換される。いくつかの実施形態においては、変異体は、もとの残基と比較して、10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個、2個、または1個の置換された残基を有する。多くの場合は、変異体は、極めて少ない数（例えば、5個、4個、3個、2個、または1個未満）の置換された機能的残基（すなわち、特定の生物学的活性に関与している残基）を有する。さらに、変異体は、通常、もとの残基と比較して、5個、4個、3個、2個、もしくは1個以下の付加または欠失を有し、そして多くの場合には、付加または欠失は有さない。さらに、任意の付加または欠失は、通常、約25個、20個、19個、181個、17個、16個、15個、14個、13個、10個、9個、8個、7個、6個未満であり、そして一般的には、約5個、4個、3個、または2個未満の残基である。いくつかの実施形態においては、もとのHAポリペプチドは、インフルエンザウイルスの自然界に存在している単離物（例えば、野生型HA）において見られるものである。

#### 【0053】

ベクター：本明細書中で使用される場合は、「ベクター」は、それに対して連結させられた別の核酸を輸送することができる核酸分子をいう。いくつかの実施形態においては、ベクターは、それに連結させられた核酸を、宿主細胞（例えば、真核生物細胞または原核生物細胞）の中で染色体外で複製および/または発現させることができる。動作可能に連結させられた遺伝子の発現を指示することができるベクターは、本明細書中では「発現ベクター」と呼ばれる。

#### 【0054】

野生型：当該分野で理解されているように、表現「野生型」は、一般的には、自然界において見られるタンパク質または核酸の通常の形態をいう。例えば、野生型HAポリペプチドは、インフルエンザウイルスの自然界に存在している単離物において見られる。多種多様な野生型HA配列を、NCBIのインフルエンザウイルス配列のデータベース、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.htm>において見ることができる。

#### 【0055】

本発明により、アンブレラトポロジーグリカンに結合するHAポリペプチドが提供される。いくつかの実施形態においては、本発明により、特定の標的種のHA受容体上に見られるアンブレラトポロジーグリカンに結合するHAポリペプチドが提供される。例えば、いくつかの実施形態においては、本発明により、ヒトHA受容体（例えば、ヒト上皮細胞上に見られるHA受容体）上に見られるアンブレラトポロジーグリカンに結合するHAポリペプチドが提供され、具体的には、上気道の中のヒトHA受容体上に見られるアンブレラトポロジーグリカンに結合するHAポリペプチドが提供される。

#### 【0056】

本発明により、ヒトの上気道の中の細胞上で見られるHA受容体に結合するHAポリペプチドが提供され、具体的には、指定された親和性および/または特異性でそのような受容体（および/またはそれらのグリカン、特に、それらのアンブレラグリカン）に結合するHAポリペプチドが提供される。

#### 【0057】

本発明には、アンブレラトポロジーグリカン（例えば、長いa2-6シアリル化グリカン）に結合する能力、特に、高い親和性で結合する能力の獲得が、ヒトに感染する能力を

HAポリペプチド変異体に付与することができる（そのもとのHAポリペプチドがヒトに感染できない場合）ことの認識が含まれる。いずれの特定の理論にも束縛されることは望まないが、本発明者らは、アンブレラトポロジーグリカンへの結合が最重要であり得ること、特に、他のタイプのグリカンへの結合の消滅は必要ない可能性があることを提起した。

#### 【0058】

本発明によってはさらに、本発明のHAポリペプチドを伴う様々な試薬と方法が提供され、これには例えば、それらを同定するためのシステム、それらを調製するためのストラテジー、それらに結合する抗体、ならびに、それらに関連する様々な診断および治療方法が含まれる。本発明のこれらの態様および他の態様の特定の実施形態についてのさらなる説明を以下に示す。

#### 【0059】

##### ヘマグルチニン（HA）

インフルエンザウイルスはRNAウイルスであり、これは、ウイルス粒子の膜の中に埋め込まれている2つの糖タンパク質（ヘマグルチニン（HA）とノイラミニダーゼ（NA））を含む、脂質膜エンベロープを特徴とする。16種類の公知のHAサブタイプと、9種類のNAサブタイプが存在しており、様々なインフルエンザ株は、その株のHAとNAサブタイプの番号に基づいて命名される。アミノ酸の配列同一性と結晶構造の比較に基づいて、HAサブタイプは2つの主要なグループと、4つのさらに小さいクレードに分類されている。様々なHAサブタイプは、必ずしも強いアミノ酸配列同一性を共有していないが、様々なHAサブタイプの全体的な3D構造は互いに類似しており、分類の目的のために使用することができるいくつかのわずかな差を有する。例えば、中心の-ヘリックスに関する膜の遠位サブドメインの特定の方向が、HAサブタイプを決定するために一般的に使用される1つの構造上の特徴である（Russellら、Virology, 325: 287, 2004）。

#### 【0060】

HAは、H1～H16と呼ばれる、16種類のサブタイプのうちの1つのホモ3量体として膜の中に存在する。これまでのところ、これらのサブタイプのうちの3種類（H1、H2、およびH3）だけが、ヒトへの感染に適応できた。ヒトに感染するように適応したHA（例えば、世界的大流行となったH1N1（1918）およびH3N2（1967～68）インフルエンザサブタイプに由来するHA）について報告されている1つの特徴は、2-3シアリル化グリカンに優先的に結合するこれらのトリの先祖と比較した、2-6シアリル化グリカンに優先的に結合するそれらの能力である（Skehel & Wiley, Annu Rev Biochem, 69: 531, 2000; Rogers, & Paulson, Virology, 127: 361, 1983; Rogersら、Nature, 304: 76, 1983; Sauterら、Biochemistry, 31: 9609, 1992; Connorら、Virology, 205: 17, 1994; Tumpeyら、Science, 310: 77, 2005）。しかし、本発明には、ヒト宿主に感染する能力が、特定の結合のグリカンに対する結合とより少なく、特定のトポロジーのグリカンに対する結合とより多く相関関係にあるとの認識が含まれる。したがって、本発明は、ヒトへの感染を媒介するHAがアンブレラトポロジーグリカンに対して結合し、多くの場合には、コーントポロジーグリカンを上回ってアンブレラトポロジーグリカンに対して優先性を示すことを明らかに示す（コーントポロジーグリカンは2-6シアリル化グリカンであり得るにもかかわらず）。

#### 【0061】

（2-3と2-6結合の両方の）シアリル化オリゴ糖に結合した、H1（ヒトおよびブタ）、H3（トリ）、およびH5（トリ）サブタイプに由来するHAのいくつかの結晶構造を利用することができ、これらは、これらのグリカンとのHAの異なる相互作用に関与している特異的なアミノ酸についての分子的洞察を提供する（Eisenら、Virology, 232: 19, 1997; Haら、Proc Natl Acad Sci

U S A , 9 8 : 1 1 1 8 1 , 2 0 0 1 ; Ha ら、 V i r o l o g y , 3 0 9 : 2 0 9 , 2 0 0 3 ; G a m b l i n ら、 S c i e n c e , 3 0 3 : 1 8 3 8 , 2 0 0 4 ; S t e v e n s ら、 S c i e n c e , 3 0 3 : 1 8 6 6 , 2 0 0 4 ; R u s s e l l ら、 G l y c o c o n j J 2 3 : 8 5 , 2 0 0 6 ; S t e v e n s ら、 S c i e n c e , 3 1 2 : 4 0 4 , 2 0 0 6 ) 。

#### 【 0 0 6 2 】

例えば、 H 5 ( A / d u c k / S i n g a p o r e / 3 / 9 7 ) 単独、あるいは、 2 - 3 または 2 - 6 シアリル化オリゴ糖に結合した H 5 の結晶構造により、結合したグリカンと直接相互作用する特定のアミノ酸が同定され、また、 1 以上の分離度で取り出されたアミノ酸も同定された ( S t e v e n s ら、 P r o c N a t l A c a d S c i U S A 9 8 : 1 1 1 8 1 , 2 0 0 1 ) 。いくつかの場合には、これらの残基の立体構造は、結合した状態と結合していない状態で異なる。例えば、 G l u 1 9 0 、 L y s 1 9 3 、および G l n 2 2 6 は全て、直接結合相互作用に関与しており、結合した状態と結合していない状態で異なる立体構造を有する。 A s n 1 8 6 の立体構造 ( これは、 G l u 1 9 0 に対して近位にある ) もまた、結合した状態と結合していない状態で有意に異なる。

#### 【 0 0 6 3 】

##### 本発明の H A ポリペプチドの結合特性

上記のように、本発明には、アンブレラトポロジーグリカンに対する結合が、特定の宿主 ( 例えば、ヒトを含む ) の感染を媒介する能力と相関関係があるとの知見が含まれる。したがって、本発明により、アンブレラグリカンに結合する H A ポリペプチドが提供される。特定の実施形態においては、本発明の H A ポリペプチドは、アンブレラグリカンに対して高い親和性で結合する。特定の実施形態においては、本発明の H A ポリペプチドは、複数の様々なアンブレラトポロジーグリカンに対して、多くの場合には、高い親和性および / または特異性で結合する。

#### 【 0 0 6 4 】

いくつかの実施形態においては、本発明の H A ポリペプチドは、アンブレラトポロジーグリカン ( 例えば、長い 2 - 6 シアリル化グリカン、例えば、 N e u 5 A c 2 - 6 G a l 1 - 4 G l c N A c 1 - 3 G a l 1 - 4 G l c N A c - ) に対して高い親和性で結合する。例えば、いくつかの実施形態においては、本発明の H A ポリペプチドは、アンブレラトポロジーグリカンに対して、ヒトへの感染を媒介する野生型 H A ( 例えば、 H 1 N 1 H A または H 3 N 2 H A ) について観察された親和性に匹敵する親和性で結合する。いくつかの実施形態においては、本発明の H A ポリペプチドは、アンブレラグリカンに対して、ヒトへの感染を媒介する野生型 H A について比較できる条件下で観察された親和性の、少なくとも 2 5 % 、 3 0 % 、 3 5 % 、 4 0 % 、 4 5 % 、 5 0 % 、 5 5 % 、 6 0 % 、 6 5 % 、 7 0 % 、 7 5 % 、 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % の親和性で結合する。いくつかの実施形態においては、本発明の H A ポリペプチドは、アンブレラグリカンに対して、ヒトへの感染を媒介する野生型 H A について比較できる条件下で観察された親和性よりも大きい親和性で結合する。

#### 【 0 0 6 5 】

特定の実施形態においては、本発明の H A ポリペプチドの結合親和性は、濃度の範囲にわたって評価される。そのようなストラテジーにより、特に、多価結合アッセイにおいて、 1 つの濃度での分析よりも有意なさらなる情報が提供される。いくつかの実施形態においては、例えば、本発明の H A ポリペプチドの結合親和性は、少なくとも 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 1 0 、またはそれ以上の倍率の濃度範囲にわたって評価される。

#### 【 0 0 6 6 】

特定の実施形態においては、本発明の H A ポリペプチドは、それらが、本明細書中に記載されるアッセイのような多価グリカンアレイ結合アッセイにおいて飽和シグナルを示す場合には、高い親和性を示す。いくつかの実施形態においては、本発明の H A ポリペプチドは、これらが、そのような実験において約 4 0 0 0 0 0 を上回る、またはそれ以上 ( 例えば、約 5 0 0 0 0 0 、 6 0 0 0 0 0 、 7 0 0 0 0 0 、 8 0 0 0 0 0 を上回るなど ) のシ

グナルを示す場合には、高い親和性を示す。いくつかの実施形態においては、H A ポリペプチドは、少なくとも 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、またはそれ以上の濃度範囲にわたり、アンブレラグリカンに対して飽和結合を示し、そしていくつかの実施形態においては、10 倍またはそれ以上の規模の濃度範囲でアンブレラグリカンに対して飽和結合を示す。

#### 【 0 0 6 7 】

さらに、いくつかの実施形態においては、本発明の H A ポリペプチドは、アンブレラトポロジーグリカンに対して、それらがコーントポロジーグリカンに対して結合するよりも強く結合する。いくつかの実施形態においては、本発明の H A ポリペプチドは、アンブレラグリカン対コーングリカンについて約 10、9、8、7、6、5、4、3、または 2 である相対的親和性を示す。

#### 【 0 0 6 8 】

いくつかの実施形態においては、本発明の H A ポリペプチドは、2 - 6 シアリル化グリカンに結合する；いくつかの実施形態においては、本発明の H A ポリペプチドは、2 - 6 シアリル化グリカンに優先的に結合する。特定の実施形態においては、本発明の H A ポリペプチドは、複数の様々な 2 - 6 シアリル化グリカンに結合する。いくつかの実施形態においては、本発明の H A ポリペプチドは、2 - 3 シアリル化グリカンには結合できず、他の実施形態においては、本発明の H A ポリペプチドは、2 - 3 シアリル化グリカンに結合できる。

#### 【 0 0 6 9 】

いくつかの実施形態においては、本発明の H A ポリペプチドは、ヒトの上気道上皮細胞上に見られる受容体に結合する。特定の実施形態においては、本発明の H A ポリペプチドは、気管支および / または気管の中の H A 受容体に結合する。いくつかの実施形態においては、本発明の H A ポリペプチドは、肺深部の受容体には結合できず、他の実施形態においては、本発明の H A ポリペプチドは、肺深部の受容体に結合できる。

#### 【 0 0 7 0 】

いくつかの実施形態においては、本発明の H A ポリペプチドは、ヒトの上気道組織（例えば、上皮細胞）の中の H A 受容体上に見られるグリカンのうち、少なくとも約 10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、またはそれ以上に結合する。

#### 【 0 0 7 1 】

いくつかの実施形態においては、本発明の H A ポリペプチドは、図 9 に示されるグリカンのうちの 1 つ以上に結合する。いくつかの実施形態においては、本発明の H A ポリペプチドは、図 9 に示される複数のグリカンに結合する。いくつかの実施形態においては、本発明の H A ポリペプチドは、図 9 に示されるグリカンに対して、高い親和性および / または特異性で結合する。いくつかの実施形態においては、本発明の H A ポリペプチドは、図 9 に示されるグリカンに対して、図 8 に示されるグリカンに対するそれらの結合と比較して、優先的に結合する。

#### 【 0 0 7 2 】

本発明により、指定された結合特異性を有している単離された H A ポリペプチドが提供され、アンブレラグリカンに関して指定された結合特性を有している操作された H A ポリペプチドもまた提供される。

#### 【 0 0 7 3 】

いくつかの実施形態においては、指定された結合特性を有している本発明の H A ポリペプチドは、H 1 ポリペプチドである。いくつかの実施形態においては、指定された結合特性を有している本発明の H A ポリペプチドは、H 2 ポリペプチドである。いくつかの実施形態においては、指定された結合特性を有している本発明の H A ポリペプチドは、H 3 ポリペプチドである。いくつかの実施形態においては、指定された結合特性を有している本発明の H A ポリペプチドは、H 4 ポリペプチドである。いくつかの実施形態においては、指定された結合特性を有している本発明の H A ポリペプチドは、H 5 ポリペプチドである

。いくつかの実施形態においては、指定された結合特性を有している本発明の H A ポリペプチドは、H 6 ポリペプチドである。いくつかの実施形態においては、指定された結合特性を有している本発明の H A ポリペプチドは、H 7 ポリペプチドである。いくつかの実施形態においては、指定された結合特性を有している本発明の H A ポリペプチドは、H 8 ポリペプチドである。いくつかの実施形態においては、指定された結合特性を有している本発明の H A ポリペプチドは、H 9 ポリペプチドである。いくつかの実施形態においては、指定された結合特性を有している本発明の H A ポリペプチドは、H 10 ポリペプチドである。いくつかの実施形態においては、指定された結合特性を有している本発明の H A ポリペプチドは、H 11 ポリペプチドである。いくつかの実施形態においては、指定された結合特性を有している本発明の H A ポリペプチドは、H 12 ポリペプチドである。いくつかの実施形態においては、指定された結合特性を有している本発明の H A ポリペプチドは、H 13 ポリペプチドである。いくつかの実施形態においては、指定された結合特性を有している本発明の H A ポリペプチドは、H 14 ポリペプチドである。いくつかの実施形態においては、指定された結合特性を有している本発明の H A ポリペプチドは、H 15 ポリペプチドである。いくつかの実施形態においては、指定された結合特性を有している本発明の H A ポリペプチドは、H 16 ポリペプチドである。

#### 【0074】

いくつかの実施形態においては、指定された結合特性を有している本発明の H A ポリペプチドは、H 1 ポリペプチドではなく、H 2 ポリペプチドではなく、そして / または H 3 ポリペプチドではない。

#### 【0075】

いくつかの実施形態においては、本発明の H A ポリペプチドには、以下の株のいずれに由来する H 1 タンパク質も含まれない：A / South Carolina / 1 / 1918 ; A / Puerto Rico / 8 / 1934 ; A / Taiwan / 1 / 1986 ; A / Texas / 36 / 1991 ; A / Beijing / 262 / 1995 ; A / Johannesburg / 92 / 1996 ; A / New Caledonia / 20 / 1999 ; A / Solomon Islands / 3 / 2006 。

#### 【0076】

いくつかの実施形態においては、本発明の H A ポリペプチドは、1957 ~ 58 のアジアで大流行したインフルエンザウイルスの株のいずれに由来する H 2 タンパク質でもない。いくつかの実施形態においては、本発明の H A ポリペプチドには、以下の株のいずれに由来する H 2 タンパク質も含まれない：A / Japan / 305+ / 1957 ; A / Singapore / 1 / 1957 ; A / Taiwan / 1 / 1964 ; A / Taiwan / 1 / 1967 。

#### 【0077】

いくつかの実施形態においては、本発明の H A ポリペプチドには、以下の株のいずれに由来する H 3 タンパク質も含まれない：A / Aichi / 2 / 1968 ; A / Philippines / 2 / 1982 ; A / Mississippi / 1 / 1985 ; A / Leningrad / 360 / 1986 ; A / Sichuan / 2 / 1987 ; A / Shanghai / 11 / 1987 ; A / Beijing / 353 / 1989 ; A / Shandong / 9 / 1993 ; A / Johannesburg / 33 / 1994 ; A / Nanchang / 813 / 1995 ; A / Sydney / 5 / 1997 ; A / Moscow / 10 / 1999 ; A / Panama / 2007 / 1999 ; A / Wyoming / 3 / 2003 ; A / Oklahoma / 323 / 2003 ; A / California / 7 / 2004 ; A / Wisconsin / 65 / 2005 。

#### 【0078】

##### 変異体 H A ポリペプチド

特定の実施形態においては、H A ポリペプチドは、そのアミノ酸配列はもとの H A のアミノ酸配列と同一であるが、少数の特定の配列変化を有している、もとの H A ポリペプチドの変異体である。いくつかの実施形態においては、もとの H A は、インフルエンザウイ

ルスの自然界に存在している単離物（例えば、野生型 H A ポリペプチド）の中に見られる H A ポリペプチドである。

#### 【 0 0 7 9 】

いくつかの実施形態においては、本発明の H A ポリペプチド変異体は、それらの対応するもとの H A ポリペプチドとは異なるグリカン結合特性を有する。いくつかの実施形態においては、本発明の H A 変異体ポリペプチドは、それらの同種のもとの H A ポリペプチドよりも、（例えば、コーングリカンに対する親和性および／または特異性と比較して）アンブレラグリカンに対して大きな親和性および／または特異性を有する。特定の実施形態においては、そのような H A ポリペプチド変異体は操作された変異体である。

#### 【 0 0 8 0 】

いくつかの実施形態においては、グリカン結合特性が変化した H A ポリペプチド変異体は、グリカン結合部位の中の残基に、またはグリカン結合部位に影響を与える残基に配列変化を有する。いくつかの実施形態においては、そのような置換は、結合したグリカンと直接相互作用するアミノ酸の置換である；他の実施形態においては、そのような置換は、結合したグリカンと相互作用するものから 1 分離度で取り出されたアミノ酸の置換である。ここで、1 分離度で取り出されたアミノ酸は：（1）直接結合するアミノ酸と相互作用する；（2）あるいは直接結合するアミノ酸のグリカンと相互作用する能力に影響を与えるが、グリカン自体とは直接は相互作用しない；または、（3）あるいは直接結合するアミノ酸のグリカンと相互作用する能力に影響を与え、また、グリカン自体とも直接相互作用するかのいずれかである。本発明の H A ポリペプチド変異体には、1 つ以上の直接結合するアミノ酸の置換、1 つ以上の 1 分離度のアミノ酸（first degree of separation - amino acids）の置換、1 つ以上の 2 分離度のアミノ酸（second degree of separation - amino acids）の置換、あるいは、これらの任意の組み合わせが含まれる。いくつかの実施形態においては、本発明の H A ポリペプチド変異体には、なおさらに高い分離度を有している 1 つ以上のアミノ酸の置換が含まれる場合がある。

#### 【 0 0 8 1 】

いくつかの実施形態においては、グリカン結合特性が変化した H A ポリペプチド変異体は、Neu5Ac および Gal の域を超えて糖と接触する残基に配列変化を有する（例えば、図 7 を参照のこと）。

#### 【 0 0 8 2 】

いくつかの実施形態においては、H A ポリペプチド変異体は、野生型のもとの H A と比較して、少なくとも 1 つのアミノ酸置換を有する。特定の実施形態においては、本発明の H A ポリペプチド変異体は、同種の野生型のもとの H A と比較して、少なくとも 2 個、3 個、4 個、5 個、またはそれ以上のアミノ酸置換を有する；いくつかの実施形態においては、本発明の H A ポリペプチド変異体は、2 個、3 個、または 4 個のアミノ酸置換を有する。いくつかの実施形態においては、全てのそのようなアミノ酸置換は、グリカン結合部位の中に配置される。

#### 【 0 0 8 3 】

いくつかの実施形態においては、H A ポリペプチド変異体は、137 位、145 位、156 位、159 位、186 位、187 位、189 位、190 位、192 位、193 位、196 位、222 位、225 位、226 位、および 228 位の残基のうちの 1 つ以上に対応する位置に配列置換を有する。いくつかの実施形態においては、H A ポリペプチド変異体は、156 位、159 位、189 位、192 位、193 位、および 196 位の残基のうちの 1 つ以上に対応する位置；ならびに／または、186 位、187 位、189 位、および 190 位の残基のうちの 1 つ以上に対応する位置；ならびに／または、190 位、222 位、225 位、および 226 位の残基のうちの 1 つ以上に対応する位置；ならびに／または、137 位、145 位、190 位、226 位、および 228 位の残基のうちの 1 つ以上に対応する位置に、配列置換を有する。いくつかの実施形態においては、H A ポリペプチド変異体は、190 位、225 位、226 位、および 228 位の残基のうちの 1 つ以上に

対応する位置に配列置換を有する。

#### 【0084】

特定の実施形態においては、H A ポリペプチド変異体、特にH 5 ポリペプチド変異体は、野生型のもとのH A（例えば、H 5）と比較して、9 8 位、1 3 6 位、1 3 8 位、1 5 3 位、1 5 5 位、1 5 9 位、1 8 3 位、1 8 6 位、1 8 7 位、1 9 0 位、1 9 3 位、1 9 4 位、1 9 5 位、2 2 2 位、2 2 5 位、2 2 6 位、2 2 7 位、および2 2 8 位の残基からなる群より選択される残基に、1つ以上のアミノ酸置換を有する。他の実施形態においては、H A ポリペプチド変異体、特にH 5 ポリペプチド変異体は、野生型のもとのH Aと比較して、グリカンに直接結合する受容体の領域の中に配置されたアミノ酸から選択される残基（9 8 位、1 3 6 位、1 5 3 位、1 5 5 位、1 8 3 位、1 9 0 位、1 9 3 位、1 9 4 位、2 2 2 位、2 2 5 位、2 2 6 位、2 2 7 位、および2 2 8 位の残基を含むがこれらに限定されない）に、1つ以上のアミノ酸置換を有する。さらなる実施形態においては、H A ポリペプチド変異体、特にH 5 ポリペプチド変異体は、野生型のもとのH Aと比較して、グリカンに直接結合する受容体の領域に隣接して配置されているアミノ酸から選択される残基（9 8 位、1 3 8 位、1 8 6 位、1 8 7 位、1 9 5 位、および2 2 8 位の残基を含むがこれらに限定されない）に、1つ以上のアミノ酸置換を有する。

#### 【0085】

いくつかの実施形態においては、本発明のH A ポリペプチド変異体、特にH 5 ポリペプチド変異体は、野生型のもとのH Aと比較して、1 3 8 位、1 8 6 位、1 8 7 位、1 9 0 位、1 9 3 位、2 2 2 位、2 2 5 位、2 2 6 位、2 2 7 位、および2 2 8 位の残基からなる群より選択される残基に1つ以上のアミノ酸置換を有する。他の実施形態においては、本発明のH A ポリペプチド変異体、特にH 5 ポリペプチド変異体は、野生型のもとのH Aと比較して、グリカンに直接結合する受容体の領域の中に配置されたアミノ酸から選択される残基（1 9 0 位、1 9 3 位、2 2 2 位、2 2 5 位、2 2 6 位、2 2 7 位、および2 2 8 位の残基を含むがこれらに限定されない）に、1つ以上のアミノ酸置換を有する。さらなる実施形態においては、本発明のH A ポリペプチド変異体、特にH 5 ポリペプチド変異体は、野生型のもとのH Aと比較して、グリカンに直接結合する受容体の領域に隣接して配置されているアミノ酸から選択される残基（1 3 8 位、1 8 6 位、1 8 7 位、および2 2 8 位の残基を含むがこれらに限定されない）に、1つ以上のアミノ酸置換を有する。

#### 【0086】

さらなる実施形態においては、H A ポリペプチド変異体、特にH 5 ポリペプチド変異体は、野生型のもとのH Aと比較して、9 8 位、1 3 6 位、1 5 3 位、1 5 5 位、1 8 3 位、1 9 4 位、および1 9 5 位の残基からなる群より選択される残基に、1つ以上のアミノ酸置換を有する。他の実施形態においては、H A ポリペプチド変異体、特にH 5 ポリペプチド変異体は、野生型のもとのH Aと比較して、グリカンに直接結合する受容体の領域に配置されているアミノ酸から選択される残基（9 8 位、1 3 6 位、1 5 3 位、1 5 5 位、1 8 3 位、および1 9 4 位の残基を含むがこれらに限定されない）に、1つ以上のアミノ酸置換を有する。さらなる実施形態においては、本発明のH A ポリペプチド変異体、特にH 5 ポリペプチド変異体は、野生型のもとのH Aと比較して、グリカンに直接結合する受容体の領域に隣接して配置されているアミノ酸から選択される残基（9 8 位および1 9 5 位の残基を含むがこれらに限定されない）に、1つ以上のアミノ酸置換を有する。

#### 【0087】

特定の実施形態においては、H A ポリペプチド変異体、特にH 5 ポリペプチド変異体は、野生型のもとのH Aと比較して、結合したグリカンと相互作用するものから1分離度で取り出されたアミノ酸から選択される残基（9 8 位、1 3 8 位、1 8 6 位、1 8 7 位、1 9 5 位、および2 2 8 位の残基を含むがこれらに限定されない）に、1つ以上のアミノ酸置換を有する。ここで、1分離度で取り出されたアミノ酸は、（1）直接結合するアミノ酸と相互作用する；（2）あるいは直接結合するアミノ酸のグリカンと相互作用する能力に影響を与えるが、グリカン自体とは直接は相互作用しない；または、（3）あるいは直接結合するアミノ酸のグリカンと相互作用する能力に影響を与え、またグリカン自体とも

直接相互作用するかのいずれかである。

【0088】

さらなる実施形態においては、H A ポリペプチド変異体、特にH 5 ポリペプチド変異体は、野生型のもとのH A と比較して、結合したグリカンと相互作用するものから1分離度で取り出されたアミノ酸から選択される残基(138位、186位、187位、および228位の残基を含むがこれらに限定されない)に、1つ以上のアミノ酸置換を有する。ここで、1分離度で取り出されたアミノ酸は、(1)直接結合するアミノ酸と相互作用する；(2)あるいは直接結合するアミノ酸のグリカンと相互作用する能力に影響を与えるが、グリカン自身とは直接は相互作用しない；または、(3)あるいは直接結合するアミノ酸のグリカンと相互作用する能力に影響を与える、またグリカン自身とも直接相互作用するかのいずれかである。

【0089】

さらなる実施形態においては、H A ポリペプチド変異体、特にH 5 ポリペプチド変異体は、野生型のもとのH A と比較して、結合したグリカンと相互作用するものから1分離度で取り出されたアミノ酸から選択される残基(98位および195位の残基を含むがこれらに限定されない)に、1つ以上のアミノ酸置換を有する。ここで、1分離度で取り出されたアミノ酸は、(1)直接結合するアミノ酸と相互作用する；(2)あるいは直接結合するアミノ酸のグリカンと相互作用する能力に影響を与えるが、グリカン自身とは直接は相互作用しない；または、(3)あるいは直接結合するアミノ酸のグリカンと相互作用する能力に影響を与える、またグリカン自身とも直接相互作用するかのいずれかである。

【0090】

特定の実施形態においては、H A ポリペプチド変異体、特にH 5 ポリペプチド変異体は、野生型のもとのH A と比較して、159位の残基にアミノ酸置換を有する。

【0091】

他の実施形態においては、H A ポリペプチド変異体、特にH 5 ポリペプチド変異体は、野生型のもとのH A と比較して、190位、193位、225位、および226位から選択される残基に、1つ以上のアミノ酸置換を有する。いくつかの実施形態においては、H A ポリペプチド変異体、特にH 5 ポリペプチド変異体は、野生型のもとのH A と比較して、190位、193位、226位、および228位から選択される残基に、1つ以上のアミノ酸置換を有する。

【0092】

いくつかの実施形態においては、本発明のH A ポリペプチド変異体、特にH 5 変異体は、以下のアミノ酸置換のうちの1つ以上を有する：Ser 137Ala、Lys 156Glu、Asn 186Pro、Asp 187Ser、Asp 187Thr、Ala 189Gln、Ala 189Lys、Ala 189Thr、Glu 190Asp、Glu 190Thr、Lys 193Arg、Lys 193Asn、Lys 193His、Lys 193Ser、Gly 225Asp、Gln 226Ile、Gln 226Leu、Gln 226Val、Ser 227Ala、Gly 228Ser。

【0093】

いくつかの実施形態においては、本発明のH A ポリペプチド変異体、特にH 5 変異体は、以下のアミノ酸置換のセットのうちの1つ以上を有する：

Glu 190Asp、Lys 193Ser、Gly 225Asp、およびGln 226Leu；  
Glu 190Asp、Lys 193Ser、Gln 226Leu、およびGly 228Ser；  
Ala 189Gln、Lys 193Ser、Gln 226Leu、Gly 228Ser；  
Ala 189Gln、Lys 193Ser、Gln 226Leu、Gly 228Ser；  
Asp 187Ser/Thr、Ala 189Gln、Lys 193Ser、Gln 22

6 L e u、G l y 2 2 8 S e r ;  
 A l a 1 8 9 L y s、L y s 1 9 3 A s n、G l n 2 2 6 L e u、G l y 2 2 8 S e r ;  
 A s p 1 8 7 S e r / T h r、A l a 1 8 9 L y s、L y s 1 9 3 A s n、G l n 2 2 6 L e u、G l y 2 2 8 S e r ;  
 L y s 1 5 6 G l u、A l a 1 8 9 L y s、L y s 1 9 3 A s n、G l n 2 2 6 L e u、G l y 2 2 8 S e r ;  
 L y s 1 9 3 H i s、G l n 2 2 6 L e u / I l e / V a l、G l y 2 2 8 S e r ;  
 L y s 1 9 3 A r g、G l n 2 2 6 L e u / I l e / V a l、G l y 2 2 8 S e r ;  
 A l a 1 8 9 L y s、L y s 1 9 3 A s n、G l y 2 2 5 A s p ;  
 L y s 1 5 6 G l u、A l a 1 8 9 L y s、L y s 1 9 3 A s n、G l y 2 2 5 A s p ;  
 S e r 1 3 7 A l a、L y s 1 5 6 G l u、A l a 1 8 9 L y s、L y s 1 9 3 A s n、G l y 2 2 5 A s p ;  
 G l u 1 9 0 T h r、L y s 1 9 3 S e r、G l y 2 2 5 A s p ;  
 A s p 1 8 7 T h r、A l a 1 8 9 T h r、G l u 1 9 0 A s p、L y s 1 9 3 S e r、G l y 2 2 5 A s p ;  
 A s n 1 8 6 P r o、A s p 1 8 7 T h r、A l a 1 8 9 T h r、G l u 1 9 0 A s p、L y s 1 9 3 S e r、G l y 2 2 5 A s p ;  
 A s n 1 8 6 P r o、A s p 1 8 7 T h r、A l a 1 8 9 T h r、G l u 1 9 0 A s p、L y s 1 9 3 S e r、G l y 2 2 5 A s p、S e r 2 2 7 A l a。いくつかのそのような実施形態においては、H Aポリペプチドは、野生型H Aと比較して少なくとも1つのさらなる置換を有しており、その結果、アンプレラグリカンに対する変異体の親和性および/または特異性が高まる。

#### 【0094】

いくつかの実施形態においては、本発明のH Aポリペプチド（H Aポリペプチド変異体を含む）は、D 1 9 0、D 2 2 5、L 2 2 6、および/またはS 2 2 8を含む配列を有する。いくつかの実施形態においては、本発明のH Aポリペプチドは、D 1 9 0とD 2 2 5を含む配列を有する；いくつかの実施形態においては、本発明のH Aポリペプチドは、L 2 2 6とS 2 2 8を含む配列を有する。

#### 【0095】

いくつかの実施形態においては、本発明のH Aポリペプチド変異体は、もとのH Aと、特にもとの野生型H Aと比較して、開いた結合部位を有する。

#### 【0096】

##### H Aポリペプチドの一部または断片

本発明によりさらに、本発明のH Aポリペプチドの特徴的な部分と、それらをコードする核酸が提供される。一般的には、特徴的な部分は、いずれもH Aポリペプチドの特徴である、アミノ酸の連続するストレッチ、またはアミノ酸の連続するストレッチのコレクションを含むものである。それぞれのそのような連続するストレッチには、一般的には、少なくとも2つのアミノ酸が含まれるであろう。さらに、通常、少なくとも5個、10個、15個、20個、またはそれ以上のアミノ酸が、H 5 H Aポリペプチドの特徴であるために必要であることは、当業者に明らかであろう。一般的には、特徴的な部分は、上記の配列同一性に加えて、関連する完全なH Aポリペプチドと少なくとも1つの機能的特長を共有するものである。いくつかの実施形態においては、本発明のH Aポリペプチドの特徴的な部分は、関連する全長のH Aポリペプチドとグリカン結合特性を共有する。

#### 【0097】

##### H Aポリペプチドの生産

本発明のH Aポリペプチド、および/またはその特徴的な部分、あるいはそれらをコードする核酸は、任意の利用可能な手段によって生産することができる。

#### 【0098】

本発明の H A ポリペプチド（または、特徴的な部分）は、例えば、本発明の H A - ポリペプチドをコードする核酸を発現するように操作された宿主細胞システムを利用することによって生産することができる。

#### 【 0 0 9 9 】

卵、バキュロウイルス、植物、酵母、M a d i n - D a r b y イヌ腎臓細胞（M a d i n - D a r b y C a n i n e K i d n e y c e l l ( M D C K ) ）、またはV e r o（アフリカミドリザル腎臓）細胞のような任意のシステムを、H A ポリペプチド（または特徴的な部分）を生産するために使用することができる。あるいは、または加えて、H A ポリペプチド（または特徴的な部分）は、組み換え技術を使用して、例えば、発現ベクターの使用を通じて、細胞の中で発現させることができる（S a m b r o o k ら、M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l , C S H L P r e s s , 1 9 8 9 ）。

#### 【 0 1 0 0 】

あるいは、または加えて、本発明の H A ポリペプチド（またはその特徴的な部分）は、合成手段によって生産することができる。

#### 【 0 1 0 1 】

あるいは、または加えて、本発明の H A ポリペプチド（またはその特徴的な部分）は、完全なウイルスの（そうでなければ、野生型であるか、弱毒化されているか、死滅させられたかなどは問わず）状況において生産され得る。本発明の H A ポリペプチド、またはその特徴的な部分はまた、ウイルス様粒子の状況においても生産される場合がある。

#### 【 0 1 0 2 】

いくつかの実施形態においては、H A ポリペプチド（またはその特徴的な部分）は、インフルエンザウイルスから単離され得、そして／または精製され得る。例えば、ウイルスは、卵（例えば、孵化鶏卵）の中で増殖させることができる。この場合、回収された材料は、通常は、尿膜腔液である。あるいは、または加えて、インフルエンザウイルスは、ウイルスを増殖させるために組織培養を使用する任意の方法によって導くことができる。ウイルスを増殖させるための適切な細胞基質としては、例えば、イヌ腎臓細胞（例えば、M D C K 、またはM D C K のクローニング由来の細胞、M D C K 様細胞）、サル腎臓細胞（例えば、V e r o 細胞を含むA G M K 細胞）、無限継代細胞株としての培養された上皮細胞、2 9 3 T 細胞、B K - 2 1 細胞、C V - 1 細胞、あるいは、商用供給業者（例えば、A T C C , R o c k v i l l e , M d . ）から容易に入手することができる、ワクチン目的のためのインフルエンザの生産に適している任意の他の哺乳動物細胞のタイプが挙げられる。適切な細胞基質にはまた、M R C - 5 細胞のようなヒト細胞も含まれる。適切な細胞基質は細胞株に限定されない；例えば、ニワトリの胚線維芽細胞のような初代細胞もまた含まれる。

#### 【 0 1 0 3 】

また、本明細書中に記載される H A ポリペプチド、特に変異体 H A ポリペプチドを、アンブレラトポロジーグリカンに結合することができる H A ポリペプチドのスクリーニングおよび／または選択を容易にすることができる条件下で、H A（単独であるか、または複合体の一部としてであるかは問わず、ウイルス粒子もしくはウイルスの一部としてを含む）を生産する細胞または有機体を培養することによって、作成、同定、単離、および／または生産することができることも、当業者に明らかであろう。一例ではあるが例を挙げると、いくつかの実施形態において、アンブレラトポロジーグリカンに対して（例えば、特定の特異性および／または親和性で）結合するそのような変異体を明らかにする、そして／またはそのような変異体に好ましい条件下で、H A 変異体のコレクションを生産および／または実験することが、有用であり得る。いくつかの実施形態においては、そのような H A 変異体のコレクションは、自然界での進化によって生じる。いくつかの実施形態においては、そのような H A 変異体のコレクションは操作によって生じる。いくつかの実施形態においては、H A 変異体のそのようなコレクションは、操作と自然界での進化の組み合わせによって生じる。

## 【0104】

## H A受容体

H Aは、糖タンパク質受容体に結合することによって細胞の表面と相互作用する。H A受容体に対するH Aの結合は、H A受容体上のN結合グリカンによって主に媒介される。具体的には、インフルエンザウイルス粒子の表面上のH Aが、細胞性宿主の表面上のH A受容体と会合するシアリル化グリカンを認識する。認識および結合の後、宿主細胞は、ウイルス細胞を包み込み、ウイルスは複製して、近隣の細胞に対して分配されるさらに多くのウイルス粒子を生産することができる。

## 【0105】

H A受容体は、受容体のH A結合部位の近くにある、2-3または2-6シアリル化グリカンのいずれかによって修飾され、受容体に結合したグリカンの結合のタイプは、受容体のH A結合部位の立体構造に影響を与え、それにより、様々なH Aに対する受容体の特異性に影響を与える。

## 【0106】

例えば、トリH Aのグリカン結合ポケットは狭い。本発明にしたがうと、このポケットは2-3シアリル化グリカンのトランス立体構造に対して、および/またはコートポロジーグリカンに対しては、2-3結合しているか、または2-6結合しているかを問わず、結合する。

## 【0107】

トリ組織の中のH A受容体、そして、ヒト深部肺および消化管(G I)組織の中のH A受容体も、2-3シアリル化グリカン結合を特徴とし、さらに、(本発明にしたがって)コートポロジーを主に採用するグリカン(2-3シアリル化グリカン、および/または2-6シアリル化グリカンを含む)を特徴とする。

## 【0108】

対照的に、上気道の気管支および気管の中のヒトH A受容体は、2-6シアリル化グリカンによって修飾される。2-3モチーフとは異なり、2-6モチーフは、C6~C5結合が原因で、さらなる立体構造の自由度を有する(Russellら、Glycogen J 23: 85, 2006)。そのような2-6シアリル化グリカンに結合するH Aは、この立体構造の自由度によって生じる構造の多様性に順応するための、さらなる開いた結合ポケットを有する。さらに、本発明にしたがうと、H Aは、アンブレラトポロジー中のグリカン(例えば、2-6シアリル化グリカン)に結合する必要があり得、特に、ヒトの上気道組織の感染を効率的に媒介するためには、強い親和性および/または特異性で、そのようなアンブレラトポロジーグリカンに結合する必要があり得る。

## 【0109】

これらの空間的拘束にされたグリコシル化プロフィールの結果として、ヒトは、通常は、多くの野生型のトリH A(例えば、トリH 5)を含むウイルスには感染しない。具体的には、ウイルスに遭遇する可能性がもっとも高いヒトの呼吸管の部分(すなわち、気管および気管支)には、コーングリカン(例えば、2-3シアリル化グリカン、および/または短いグリカン)を有している受容体はなく、そして野生型のトリH Aは、通常は、コーングリカン(例えば、2-3シアリル化グリカン、および/または短いグリカン)と会合した受容体に対して主に、またはそれだけに結合するので、ヒトは、トリウイルスには滅多に感染しなくなっている。アンブレラグリカン(例えば、長い2-6シアリル化グリカン)を有しているウイルスと深部肺および/または消化管受容体に接近することができるほど十分に近く接触した場合にのみ、ヒトの感染が起こる。

## 【0110】

## グリカンアレイ

既知の特異的なグリカン-グリカン結合タンパク質(G B P)相互作用についての現在の知識を迅速に拡大するために、国際的な共同研究を主導しているConsortium for Functional Glycomics(CFG; www.functionalglycomics.org)は、新しいグリカンリガンド特異性についてのG

BPの高スループットのスクリーニングを可能にするいくつかのグリカン構造が含まれているグリカンアレイを開発した。これらのグリカンアレイには、1価のグリカンモチーフと多価のグリカンモチーフの両方が含まれ（すなわち、ポリアクリルアミド骨格に結合させられ）、そしてそれぞれのアレイには、低濃度（10uM）と高濃度（100uM）で264種類のグリカンが、それぞれの濃度について6スポット含まれる（<http://www.functionalglycomics.org/static/consortium/resources/resourcecoreh5.shtml>を参照のこと）。

#### 【0111】

アレイには、N結合グリカンとO結合グリカンの生理的多様性をとらえる合成のグリカンが主に含まれる。合成のグリカンに加えて、様々な哺乳動物の糖タンパク質に由来するN結合グリカン混合物もまた、アレイ上に提示される。

#### 【0112】

本明細書中で使用される場合は、グリカン「アレイ」は、任意に固体支持体上に固定された、1つ以上のグリカンのセットをいう。いくつかの実施形態においては、「アレイ」は、空間において物理的に分けられた2つ以上の位置に、整理された配置またはパターンとして存在するグリカンのコレクションである。通常、グリカンアレイは、少なくとも4、8、16、24、48、96、または数百もしくは数千の分離された位置を有するであろう。一般的には、本発明のグリカンアレイは、任意のさまざまな形式を有し得る。生体分子に適応することができる様々な異なるアレイ形式は当該分野で公知である。例えば、膨大な数のタンパク質および／または核酸アレイが周知である。当業者は、本発明のグリカンアレイに適している標準的なアレイ形式をすぐに理解するであろう。

#### 【0113】

いくつかの実施形態においては、本発明のグリカンアレイは、「マイクロアレイ」形式で存在する。マイクロアレイは、通常、50～200ミクロン、またはそれ未満の距離で隔てられている試料位置を有し得、ナノからマイクロモルの範囲、もしくはナノからピコグラムの範囲の試料が固定される。当該分野で公知のアレイ形式としては、例えば、それぞれの分離された試料位置が例えば10ミクロンの大きさを有しているアレイ形式が挙げられる。

#### 【0114】

いくつかの実施形態においては、本発明のグリカンアレイには、支持体上に間隔をあけて固定された複数のグリカンが含まれる。本発明により、支持体上に整列させられたグリカン分子が提供される。本明細書中で使用される場合は、「支持体」は、グリカン分子を整列させるために使用されるに適している任意の材料をいう。当業者に明らかであろうように、任意の多種多様な材料が使用され得る。いくつかではあるが例を挙げると、本発明において使用され得る支持体材料としては、疎水性膜、例えば、ニトロセルロース、PVDF、またはナイロン膜が挙げられる。そのような膜は当該分野で周知であり、そして、例えば、Bio-Rad, Hemel Hempstead, UKから入手することができる。

#### 【0115】

さらなる実施形態においては、その上にグリカンが整列させられる支持体には金属酸化物が含まれ得る。適切な金属酸化物としては、酸化チタン、酸化タンタル、および酸化アルミニウムが挙げられるがこれらに限定されない。そのような材料の例は、Sigma-Aldrich Company Ltd, Fancy Road, Poole, Dorset. BH12 4QH UKから入手することができる。

#### 【0116】

なおさらなる実施形態においては、そのような支持体は金属酸化物ゲルであるか、またはそのような支持体に金属酸化物ゲルが含まれる。金属酸化物ゲルは、炭水化物が含まれている分子の固定を助けるために、所定の巨視的な領域の中に大きな表面積を提供すると考えられる。

## 【0117】

本発明にしたがって使用され得るさらに別の、または代わりの支持体材料としては、ゲル、例えば、シリカゲルまたは酸化アルミニウムゲルが挙げられる。そのような材料の例は、例えば、Merck KGaA, Darmstadt, Germany から入手することができる。

## 【0118】

本発明のいくつかの実施形態においては、グリカンアレイは、通常の使用的間の大きさまたは形状の変化に耐えられる支持体上に固定される。例えば、支持体は、グリカンを整列させるために使用されるに適している成分材料でコーティングされたガラススライドであり得る。また、一部の複合材料は、支持体に所望される硬さをもたらすことができる。

## 【0119】

本明細書中に示されるように、本発明のアレイは、様々な HA ポリペプチドとそれらの結合特性の同定および / または特性決定に有用である。特定の実施形態においては、本発明の HA ポリペプチドは、アンブレラトポロジーグリカンに対して（例えば、2 - 6 シアリル化グリカンに対して、特にアンブレラトポロジーで配置された長い 2 - 6 シアリル化グリカンに対して）結合するそれらの能力を評価するために、そのようなアレイ上で試験される。

## 【0120】

実際、本発明により、2 - 6 シアリル化グリカン、そして任意に、2 - 3 シアリル化グリカンのアレイが提供される。これは、HA ポリペプチドの結合能力を特性決定するために、そして / または、例えば、ヒトに結合する HA ポリペプチドを検出するための診断薬として使用することができる。いくつかの実施形態においては、本発明のアレイには、アンブレラトポロジーのグリカン（例えば、2 - 6 シアリル化グリカン、特に長い 2 - 6 シアリル化グリカン）が含まれる。当業者に明らかであろうように、そのようなアレイは、任意の HA ポリペプチド（例えば、研究者によって設計されたそして / または調製されたものに加えて、自然界に存在しているインフルエンザ単離物において見られるものを含む）を特性決定する、あるいは検出するために有用である。

## 【0121】

いくつかの実施形態においては、そのようなアレイには、ヒト HA 受容体、特にヒト上気道 HA 受容体上に見られるグリカン（例えば、アンブレラグリカンであり、これは多くの場合は、2 - 6 シアリル化グリカン、特に、長い 2 - 6 シアリル化グリカンであろう）のうちの、約 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはそれ以上を示すグリカンが含まれる。いくつかの実施形態においては、本発明のアレイには、図 10 に示されるグリカン構造のうちのいくつか、または全てが含まれる。いくつかの実施形態においては、アレイには、これらの示されたグリカンのうちの、少なくとも約 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはそれ以上が含まれる。

## 【0122】

本発明により、グリカンアレイを使用して HA タンパク質を同定または特性決定するための方法が提供される。いくつかの実施形態においては、例えば、そのような方法には、（1）HA ポリペプチドが含まれている試料を提供する工程、（2）上記試料をグリカンアレイと接触させる工程、および（3）アレイ上の 1 つ以上のグリカンに対する HA ポリペプチドの結合を検出する工程が含まれる。

## 【0123】

本発明にしたがって、グリカンアレイと接触させられる HA ポリペプチドが含まれている試料についての適切な供給源としては、病理学的試料（例えば、血液、血清 / 血漿、末梢血単核細胞 / 末梢血リンパ球（PBMC / PBL）、痰、尿、糞便、咽頭スワブ、皮膚病変のスワブ、脳脊髄液、頸管スミア、膿試料、フードマトリックス、ならびに、脳、脾

臓、および肝臓のような体の様々な部分に由来する組織)が挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、または加えて、HAポリペプチドが含まれている試料についての他の適切な供給源としては、土壤、水、および微生物叢のような環境試料が挙げられるが、これらに限定されない。なお他の試料としては、研究室試料(例えば、研究者によって設計され、そして/または調製された操作されたHAポリペプチド)が挙げられる。列挙されていない他の試料もまた適切である場合がある。

#### 【0124】

本発明のグリカンアレイに対するHAポリペプチドの結合を評価するために適している多種多様な検出システムは当該分野で公知である。例えば、HAポリペプチドは、アレイとの接触の前、または後に、検出可能であるように(直接または間接的に)標識することができる;その後、結合が、局在化させられた標識の検出によって検出され得る。いくつかの実施形態においては、スキャンデバイスを、アレイ上の特定の位置を試験するために使用することができる。

#### 【0125】

あるいは、または加えて、整列させられたグリカンに対する結合は、例えば、比色、蛍光、または放射活性検出システム、あるいは、他の標識方法、あるいは、標識が必要ではない他の方法を使用して測定することができる。一般的には、蛍光の検出には、通常、蛍光分子でアレイを直接プローブすること、そして蛍光シグナルをモニターすることが含まれる。あるいは、または加えて、アレイは、間接的な蛍光の検出のために(例えば、ビオチンで)タグを付けられた分子で(この場合、蛍光標識されたストレプトアビシンの結合について試験することによって)プローブすることができる。あるいは、または加えて、蛍光の消光方法を利用することができ、ここで、整列させられたグリカンが蛍光標識され、そして試験分子(これは、別の蛍光色素分子で標識される場合も、標識されない場合もある)でプローブされる。そのような実施形態においては、アレイに対する結合は、整列させられたグリカンから放たれる蛍光を抑えるように作用し、したがって、結合は蛍光の放射の消滅によって検出される。あるいは、または加えて、整列させられたグリカンは、放射活性物質の存在下で増殖させられた生存している組織試料でプローブすることができ、放射活性で標識されたプローブを得ることができます。そのような実施形態における結合は、放射活性の放射を測定することによって検出することができる。

#### 【0126】

そのような方法は、本発明のグリカンアレイに対するHAポリペプチドの結合の事実、および/または結合の程度を決定するために有用である。本発明のいくつかの実施形態においては、そのような方法はさらに、グリカン-HAポリペプチドの相互作用を妨害するか、あるいは変化させる物質を同定および/または特性決定するために使用することができる。

#### 【0127】

以下に記載される方法は、例えば、炭水化物と相互作用できると考えられる分子が実際にそうであり得るかどうかを同定することにおいて、または、分子が炭水化物と相互作用する能力を予想以上に有しているかどうかを同定するために、特に有用であり得る。

#### 【0128】

本発明によってはまた、例えば、試験試料の中の特定の物質を検出するために、本発明のアレイを使用する方法も提供される。例えば、そのような方法には、(1)グリカンアレイを試験試料(例えば、HAポリペプチドを含むと考えられる試料)と接触させる工程;および、(2)アレイに対する試験試料中の任意の物質の結合を検出する工程が含まれ得る。

#### 【0129】

なおさらに、本発明のアレイに対する結合は、例えば、結合物質とグリカンとの間での相互作用の速度論を決定するために利用することができる。例えば、相互作用の速度論を決定するための本発明の方法には、(1)グリカンアレイを試験される分子と接触させる工程;および(2)結合物質と整列させられたグリカン(単数または複数)との間での相

互作用の速度論を測定する工程が含まれ得る。

#### 【0130】

結合物質の、本発明のアレイの中の任意のグリカンとの相互作用の速度論は、上記に詳述したように、例えば、比色または蛍光シグナルの実時間変化によって測定することができる。そのような方法は、例えば、特定の結合物質が、特異的な炭水化物と相互作用する異なる結合物質よりも、高い結合の程度で同じ炭水化物と相互作用することができるかどうかを決定することにおいて、特に有用であり得る。

#### 【0131】

もちろん、本発明のHAポリペプチドによるグリカンの結合を、アレイ形式自体の中には存在しないグリカン試料または供給源について評価することができることは、明らかであろう。例えば、本発明のHAポリペプチドは、それらのグリカン結合特性を評価するために組織試料および/または細胞株に対して結合させることができる。適切な細胞株としては、例えば、任意の様々な哺乳動物細胞株、特に、アンブレラトポロジー-グリカンを含む（例えば、そのうちの少なくともいくつかが、2-6シアリル化グリカン、特に長い

2-6シアリル化グリカンであり得る）HA受容体を発現する細胞株が挙げられる。いくつかの実施形態においては、利用される細胞株は、アンブレラトポロジーを有している個々のグリカンを発現する。いくつかの実施形態においては、利用される細胞株は、多様なグリカンを発現する。いくつかの実施形態においては、細胞株は、臨床分離株から得られる；場合によっては、これらは、所望されるグリカンの分布および/または罹患率を有するように維持されるか、または操作される。いくつかの実施形態においては、組織試料および/または細胞株は、哺乳動物の上気道上皮細胞に特徴的なグリカンを発現する。

#### 【0132】

##### データ検索プラットフォーム

本明細書中で議論されるように、本発明にしたがって、HAポリペプチドは、グリカン結合実験、構造についての情報（例えば、HAの結晶構造）、および/またはタンパク質構造の予想プログラムによるデータを検索することにより、同定および/または特性決定することができる。

#### 【0133】

本発明者らによって利用される（そして、本明細書中で説明される）特定のデータ検索プロセスに含まれる主要な工程は、図11に説明される。これらの工程には、以下の3つのエレメントについての操作が含まれる：「データオブジェクト（data objects）」、特徴、および分類子。「データオブジェクト」は、データベースの中で保存されている生のデータである。グリカンアレイデータの場合には、単糖および結合に関するグリカン構造についての化学的な記述と、スクリーニングした様々なGBPを有するこれらの結合シグナルが、データオブジェクトを構成していた。データオブジェクトの性質は「特徴」であった。特徴に基づいて得られた規則またはパターンを、データオブジェクトを記載するために選択した。「分類子」は、データオブジェクトを特異的なクラスに集めるため、あるいは、複数の特徴の間で、またはそれらの中での関係性を決定するためのいずれかに使用した規則またはパターンである。分類子は、GBPに対して高い親和性で結合するグリカンによって満たされる特異的な特徴を提供する。これらの規則には2つの種類がある：（1）結合を促進すると考えることができる、高親和性グリカンリガンドのセットについて存在する特徴、および（2）結合には好ましくないと考えることができる、高親和性グリカンリガンドの中には存在するべきではない特徴。

#### 【0134】

本明細書中で利用されるデータ検索プラットフォームには、上記の操作を実行するための、互いに相互作用するソフトウェアモジュールを含めた（図11）。特徴抽出装置（feature extractor）は、特徴を抽出するためにCFGデータベースにインターフェースで接続され、CFGによって使用されるオブジェクトベースの関係性（object-based relational）データベースは、柔軟性のある特徴の定義を容易にする。

## 【0135】

## 特徴の抽出とデータの準備

グリカンアレイ上のグリカンから抽出された代表的な特徴が表1に列挙される。

## 【0136】

## 【表1A】

表1. グリカンアレイ上のグリカンから抽出した特徴

この表に記載する特徴を、特異的なG B Pに対する結合を特性決定するパターンを同定するための規則に基づく分類アルゴリズムによって使用した。

抽出した特徴	特徴の記述
単糖レベル	
組成	h e x、h e x N A c、d H e x、シアル酸などの数【図1においては、組成は、H e x = 5；H e x N A c = 4である】。最終的な組成は、区別して記録される【図1においては、最終的な組成は、H e x = 2；H e x N A c = 2である】。
明確な組成	G I c、G a l、G I c N A c、F u c、G a l N A c、N e u 5 A c、N e u 5 G cなどの数【図1においては、明確な組成は、M a n = 5；G I c N A c = 4である】。最終的な明確な組成は、明確に記録される【図1においては、最終的な明確な組成は、M a n = 2；G I c N A c = 2である】。
より高次の特徴	
ペア	ペアは、連結によって共有結合された単糖の対をいう。

## 【0137】

## 【表1B】

	ペアは、非還元末端で終結する1つの単糖を有しているペアの間を区別するために、2つのカテゴリー：標準（regular）[B]と末端（terminal）[T]に分類される[図2]。ペアの頻度を特徴として抽出した
トリプレット	トリプレットは、2つの連結によって共有結合された3個の単糖のセットをいう。本発明者らは、これらを3つのカテゴリー、すなわち、標準[B]、末端[T]、および表面（surface）[S]に分類する[図2]。それぞれのカテゴリーのトリプレットの組成を特徴として抽出した。
クアドロプレット	トリプレットの特徴と同様に、クアドロプレットの特徴もまた、4個の単糖とそれらの連結を用いて抽出した[図2]。クアドロプレットは、2つのバラエティー：標準[B]と表面[S]に分類される。様々なクアドロプレットの頻度を特徴として抽出した。
クラスター	上記の表面トリプレットおよびクアドロプレットの場合は、連結の情報を無視されれば、本発明者らは、単糖のクラスターのセットを得ることができ、それらの出現頻度（組成）が一覧にされる。これらの特徴を、単糖の間での連結のタイプの重要性を分析するために選択した。
平均のリーフの深さ（Leaf Depth）	有効なプローブ長の指標として、系図の還元末端の平均の深さが、グリカンの特徴として抽出される。図2Bにおいては、リーフの深さは、3、4、および3であり、平均は3.34である。
リーフの数	グリカン系図の広がりの尺度として、非還元性の単糖の数が特徴として抽出される。図2Bにおいては、リーフの数は3である。図1については4である。
GBP結合の特徴	これらの特徴は、アレイを使用してスクリーニングした全てのGBPについて得られた。
グリカンあたりの平均のシグナル	同じグリカンの（アレイのバージョンに応じて）3連または4連の代表物について平均した未処理のシグナル値
シグナル対ノイズ比	シグナル対ノイズ比[S/N]を計算するために、ネガティブ対照[CFG]によって開発された標準化方法に基づいてコンピューターで処理した平均ノイズ

示されたこれらの特定の特徴の選択の背後にある論理的根拠は、GBP上のグリカン結合部位が、通常は、ジ-4糖を提供することである。系図(tree)をベースとする表現を、グリカン構造中の単糖および結合(還元末端にある系図の根元)についての情報を得るために使用した。この表現により、単糖のトリプレットなどの連結されたセットのようなさらに高次の特徴を含む様々な特徴の抽出が容易になった(図12)。データの準備には、それぞれのグリカンについて抽出された特徴(表1)とともに、グリカンアレイの中の全てのグリカンの列方向のリストを作成することを含めた。グリカンとそれらの特徴についてのこの基本の表から、サブセットを、特異的なGBP、またはGBPのセットに対する結合を支配する特異的なパターンを決定するための、規則に基づく分類(以下を参照のこと)のために選択した。

## 【0138】

## 分類子

様々なタイプの分類子が開発されており、多くの用途において使用されている。これらは、主に以下の3つの主要なカテゴリーに分類される：数学的方法、距離的方法、および論理的方法。これらの様々な方法、およびそれらの利点と欠点は、Weiss & Indrukhy (Predictive data mining - A practical guide. Morgan Kaufmann, San Francisco, 1998)において詳細に議論されている。この特異的な用途のために、本発明者らは、論理的方法に含まれる、規則誘導(Rule Induction)と呼ばれる方法を選択した。規則誘導の分類子は、IF - THEN規則の形態でパターンを作成する。

## 【0139】

論理的方法、具体的には、IF - THEN 規則を作成する規則誘導法のような分類子についての主要な利点の 1 つは、分類子の結果が、他の統計学的方法または数学的方法と比較した場合に、より簡単に説明できることである。これにより、発見された規則またはパターンの構造的および生物学的有意性を研究することが可能となる。先に記載された特徴(表 1)を使用して作成された例示的な規則は以下である:もし(IF) A グリカンに、「Galb4GalcNAcb3Gal[B]」が含まれ、「Fucα3GalcNAc[B]」は含まれない場合は、そのとき(THEN) グリカンはガレクチン 3 に対してより高い親和性で結合するであろう。この場合に使用される特異的な規則誘導アルゴリズムは、Weiss & Indurkya (Predictive data mining - A practical guide. Morgan Kaufmann, San Francisco, 1998) によって開発されたアルゴリズムである。

#### 【0140】

##### 結合レベル

低親和性の結合と高親和性の結合を識別する閾値が、グリカンアレイスクリーニングデータセットのそれぞれについて定義された。

#### 【0141】

##### 核酸

特定の実施形態においては、本発明により、HA ポリペプチド、または HA ポリペプチドの特徴的なもしくは生物学的に活性な部分をコードする核酸が提供される。他の実施形態においては、本発明により、HA ポリペプチド、または HA ポリペプチドの特徴的なもしくは生物学的に活性な部分をコードする核酸に対して相補的である核酸が提供される。

#### 【0142】

他の実施形態においては、本発明により、HA ポリペプチド、または HA ポリペプチドの特徴的なもしくは生物学的に活性な部分をコードする核酸に対してハイブリダイズする核酸分子が提供される。そのような核酸は、例えば、プライマーとして、またはプローブとして使用することができる。いくつかではあるが例を挙げると、そのような核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) においてプライマーとして、ハイブリダイゼーション (インサイチュハイブリダイゼーションを含む) のためのプローブとして、そして / または、逆転写 - PCR (RT - PCR) のためのプライマーとして使用することができる。

#### 【0143】

特定の実施形態においては、核酸は DNA または RNA であり得、一本鎖でも、また二本鎖でもあり得る。いくつかの実施形態においては、本発明の核酸には、1 つ以上の自然界には存在しないヌクレオチドが含まれる場合がある; 他の実施形態においては、本発明の核酸には、自然界に存在しているヌクレオチドだけが含まれる。

#### 【0144】

##### 抗体

本発明により、本発明の HA ポリペプチドに対する抗体が提供される。これらは、モノクローナル抗体でも、また、ポリクローナル抗体であり得、当業者に公知の任意の様々な技術によって調製することができる(例えば、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 を参照のこと)。例えば、抗体は、組み換え体抗体の生産を可能にするための、細胞培養技術(モノクローナル抗体の作成を含む)によって、または、適切な細菌もしくは哺乳動物細胞宿主への抗体遺伝子のトランスフェクションにより生産することができる。

#### 【0145】

##### 薬学的組成物

いくつかの実施形態においては、本発明により、HA ポリペプチド(単数または複数)、そのようなポリペプチドをコードする核酸、そのようなポリペプチドもしくは核酸の特徴的なまたは生物学的に活性な断片、そのようなポリペプチドもしくは断片に結合する抗体、そのようなポリペプチドと、もしくはそれらに結合するグリカンと相互作用する低分

子などが含まれている薬学的組成物が提供される。

#### 【0146】

本発明には、そのような本発明の薬学的組成物の投与によるインフルエンザ感染の処置が含まれる。いくつかの実施形態においては、処置はワクチンの投与によって行われる。今日までに、インフルエンザワクチンの開発においては有意な成果が得られているが、さらなる改良の余地がある。本発明により、本発明のHAポリペプチドが含まれているワクチン、特にアンブレラグリカン（例えば、2-6結合アンブレラグリカン、例えば、長い2-6シアリル化グリカン）に結合するHAポリペプチドが含まれているワクチンが提供される。

#### 【0147】

一例ではあるが例を挙げると、ヒトにおいて、H5N1株に特異的なワクチンを作成する試みは、一般的には、H5 HAの低い免疫原性が少なくとも一部の原因であって、成功していない。1つの実験においては、H5N1株に特異的なワクチンが、1:40の抗体力値を生じることが示されているが、これは、感染からの防御を保障するために十分に高い力値ではない。さらに、なおさらには適度な1:40の抗体力値を生じさせるために必要な投与量（精製された死滅ウイルスまたは抗原の90 μgの2用量）は、一般的な季節的なインフルエンザウイルスワクチンに通常使用される投与量の12倍であった（Treanorら、*Eng J Med*, 354:1343, 2006）。他の実験も同様に、現在のH5ワクチンはそれほど免疫原性が高くないことを示していた（Bressonら、*Lancet*, 367:1657, 2006）。いくつかの実施形態においては、本発明のワクチンは、低用量のH5 HAタンパク質の使用を可能にし、そして/または高い免疫原性を得るように意図される1つ以上のストラテジー（例えば、Enserink, *Science*, 309:996, 2005を参照のこと）を利用して処方される。例えば、いくつかの実施形態においては、多価の程度が（例えば、デンドリマーの使用を通じて）改善される；いくつかの実施形態においては、1つ以上のアジュバントが利用されるなどである。

#### 【0148】

いくつかの実施形態においては、本発明により、ワクチンと、ヒト対象へのこれらのワクチンの投与が提供される。特定の実施形態においては、ワクチンは、以下の1つ以上が含まれている組成物である：（1）不活化ウイルス、（2）生の弱毒化インフルエンザウイルス、例えば、複製欠損ウイルス、（3）本発明のHAポリペプチド、またはその特徴的なもしくは生物学的活性な部分、（4）HAポリペプチド、またはその特徴的なもしくは生物学的活性な部分をコードする核酸、（5）HAポリペプチド、またはその特徴的なもしくは生物学的活性な部分をコードするDNAベクター、ならびに/あるいは（6）発現システム、例えば、抗原として使用される1つ以上のインフルエンザタンパク質を発現する細胞。

#### 【0149】

したがって、いくつかの実施形態においては、本発明により、不活化インフルエンザワクチンが提供される。特定の実施形態においては、不活化インフルエンザワクチンには、以下3つのタイプの抗原調製物のうちの1つが含まれる；不活化された完全なウイルス、サブビリオン（精製されたウイルス粒子が脂質エンベロープを可溶化させるための界面活性剤または他の試薬で破壊される（「分割」ワクチン））、または精製されたHAポリペプチド（「サブユニット」ワクチン）。特定の実施形態においては、ウイルスは、ホルムアルデヒド、-プロピオラクトン、エーテル、界面活性剤（例えば、Tween-80）を含むエーテル、臭化セチルトリメチルアンモニウム（CTAB）、およびTrition N101、デオキシコール酸ナトリウム、およびトリ（n-ブチル）リン酸塩での処理によって不活化させることができる。不活化は、尿膜腔液（卵の中で生産されたウイルスに由来する）の浄化の後、または前に行うことができる；ビリオンは遠心分離によって単離し、そして精製される（Nicholsonら編、*Textbook of Influenza*, Blackwell Science, Malden, MA, 1998）。

。ウイルスの効力を評価するためには、一元放射免疫拡散法 (single radioimmuno diffusion) (SRD) の試験を使用することができる (Schildら、Bull. World Health Organ., 52: 43-50 & 223-31, 1975; Mostowら、J. Clin. Microbiol., 2: 531, 1975)。

#### 【0150】

本発明によってはまた、生の弱毒化インフルエンザウイルスが提供され、弱毒化のための方法は当該分野で周知である。特定の実施形態においては、弱毒化は、逆遺伝学、例えば、部位特異的突然変異誘発法の使用によって行われる。

#### 【0151】

いくつかの実施形態においては、ワクチンに使用されるインフルエンザウイルスは、卵、例えば、孵化鶏卵の中で増殖させられる。この場合、回収される材料は尿膜腔液である。あるいは、または加えて、インフルエンザウイルスは、ウイルスを増殖させるために組織培養を使用する任意の方法によって誘導することができる。ウイルスを増殖させるための適切な細胞基質としては、例えば、イヌ腎臓細胞（例えば、MDCK、またはMDCKのクローン由来の細胞、MDCK様細胞）、サル腎臓細胞（例えば、Vero細胞を含むAGMK細胞）、無限継代細胞株としての培養された上皮細胞、293T細胞、BHK-21細胞、CV-1細胞、あるいは、商用供給業者（例えば、ATCC, Rockville, Md.）から容易に入手することができる、ワクチンの目的のためのインフルエンザの生産に適している任意の他の哺乳動物細胞のタイプ（上気道上皮細胞を含む）が挙げられる。適切な細胞基質にはまた、MRC-5細胞のようなヒト細胞も含まれる。適切な細胞基質は細胞株に限定されない；例えば、ニワトリの胚線維芽細胞のような初代細胞もまた含まれる。

#### 【0152】

いくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、さらに、1つ以上のアジュvantが含まれる。例えば、アルミニウム塩 (Baylorら、Vaccine, 20: S 18, 2002)、およびモノホスホリルリピッドA (MPL; Ribisら、(1986, Immunology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, p. 407, 1986)を、ヒトのワクチンにおいてアジュvantとして使用することができる。あるいは、または加えて、以下のような新しい化合物が、ヒトのワクチンにおいてアジュvantとして現在試験されている：MF59 (Chiron Corp., <http://www.chiron.com/investors/pressreleases/2005/051028.html>)、CPG7909 (Cooperら、Vaccine, 22: 3136, 2004)、およびサポニン、例えば、QS21 (Gochikyanら、Vaccine, 24: 2275, 2006)。

#### 【0153】

加えて、以下のようないくつかのアジュvantが、インフルエンザワクチンの免疫原性を増強させることができが当該分野で公知である：ポリ[ジ(カルボキシラトフェノキシ)カルボキラトフェノキシ] (PCCP; Payneら、Vaccine, 16: 92, 1998)、インターフェロン- (Caoら、Vaccine, 10: 238, 1992)、プロックコポリマーP1205 (CRL1005; Katzら、Vaccine, 18: 2177, 2000)、インターロイキン-2 (IL-2; Mbwuikeら、Vaccine, 8: 347, 1990)、およびポリメチルメタクリレート (PMMA; Kreuterら、J. Pharm. Sci., 70: 367, 1981)。

#### 【0154】

ワクチンに加えて、本発明により、ウイルス感染の処置に有用な他の治療用組成物が提供される。例えば、いくつかの実施形態において、処置は、本発明のHAポリペプチドの発現または活性を妨害する物質の投与によって行われる。例えば、処置は、抗体（例えば

、特定の H A ポリペプチド（例えば、アンブレラグリカンに結合する H A ポリペプチド）、核酸（例えば、R N A i に使用することができる、H A 配列に相補的な核酸配列）、H A 受容体に対する結合に競合するグリカン、グリカン - H A ポリペプチド相互作用に競合する低分子もしくは糖模倣物、またはそれらの組み合わせが含まれているウイルス粒子を認識する抗体）が含まれている組成物を用いて行うことができる。いくつかの実施形態においては、多様な構造を有している様々な薬剤のコレクションが利用される。いくつかの実施形態においては、治療用組成物には、1つ以上の多価の薬剤が含まれる。いくつかの実施形態においては、処置には、暴露または暴露の疑いの直後の緊急投与が含まれる。

#### 【 0 1 5 5 】

一般的には、薬学的組成物には、滅菌の生体適合性の担体（滅菌水、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、またはデキストロース溶液が含まれるがこれらに限定されない）のような1つ以上の不活性な物質に加えて、治療薬が含まれるであろう。あるいは、または加えて、組成物には、任意の様々な添加剤（例えば、安定剤、緩衝剤、賦形剤、または保存剤）が含まれ得る。特定の実施形態においては、薬学的組成物には、脂質小胞、生体利用可能なおよび／または生体適合性のおよび／または生体分解性のマトリックス、あるいは他の微粒子の中にカプセル化させられた、捕捉された、または結合させられた治療薬が含まれるであろう。

#### 【 0 1 5 6 】

本発明の薬学的組成物は単独で、あるいは、1つ以上の他の治療薬（ワクチンおよび／または抗体を含むがこれらに限定されない）と組み合わせて投与され得る。「と組み合わせて」によつては、複数の薬剤が同時に投与されなければならないこと、または複数の薬剤が一緒に送達されるように処方されなければならないことを暗に意味するようには意図しないが、これらの送達方法は本発明の範囲に含まれる。一般的には、それぞれの薬剤は、その薬剤について決定された投与量、および時間的スケジュールで投与されるであろう。加えて、本発明には、本発明の薬学的組成物の、それらの生体利用性を改善することができる、それらの代謝を減少させるかもしくは変化させることができる、それらの排出を阻害することができる、またはそれらの体内での分布を変化させることができる薬剤と組み合わせた送達が含まれる。本発明の薬学的組成物は、その必要がある任意の対象（例えば、任意の動物）の処置に使用できるが、これらは、ヒトの処置において使用されることが最も好ましい。

#### 【 0 1 5 7 】

本発明の薬学的組成物は様々な経路によって投与することができ、これには、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、皮下、心室内、経皮、皮内、直腸、腔内、腹腔内、局所（粉末剤、軟膏、クリーム剤、またはドロップ剤によって）、粘膜、口腔、あるいは、経口もしくは鼻腔用のスプレーまたはエアゾールとしての投与が含まれる。一般的には、最も適切な投与経路は、薬剤の性質（例えば、消化管の環境でのその安定性）、患者の状態（例えば、患者が経口投与に耐えられるかどうか）などを含む様々な要因に応じて変化するであろう。現在は、経口もしくは鼻腔用のスプレーまたはエアゾールの経路が、肺または呼吸系に治療薬を直接送達するために最も一般的に使用される。しかし、本発明には、薬物送達技術の進歩の可能性を考慮して、任意の適切な経路による本発明の薬学的組成物の送達が含まれる。

#### 【 0 1 5 8 】

皮内への本明細書中に記載される薬学的組成物の送達に使用される適切なデバイスとしては、例えば、米国特許第4,886,499号、同第5,190,521号、同第5,328,483号、同第5,527,288号、同第4,270,537号、同第5,015,235号、同第5,141,496号、同第5,417,662号に記載されているもののような、短い針のデバイスが挙げられる。皮内用の組成物はまた、皮膚への針の有効な貫通長さを制限するデバイス（例えば、引用により本明細書中に組み入れられるW O 99/34850に記載されているもの）、およびその機能的等価物によって投与される場合もある。ジェット式注射デバイスもまた適切である。これは、液体用のジェット式

注射器を通じて、または針（これは、角質層の孔をあけて、真皮に達する噴流を生じさせる）を通じて真皮に液体ワクチンを送達する。ジェット式注射デバイスは、例えば、米国特許第5,480,381号、同第5,599,302号、同第5,334,144号、同第5,993,412号、同第5,649,912号、同第5,569,189号、同第5,704,911号、同第5,383,851号、同第5,893,397号、同第5,466,220号、同第5,339,163号、同第5,312,335号、同第5,503,627号、同第5,064,413号、同第5,520,639号、同第4,596,556号、同第4,790,824号、同第4,941,880号、同第4,940,460、WO 97/37705、およびWO 97/13537に記載されている。皮膚の外層を貫通させて真皮に対して粉末形態のワクチンを加速させるために圧縮ガスを使用する、パリスティックパウダー／粒子送達デバイスもまた適している。加えて、従来の注射器が、伝統的な皮内投与のマントゥー方法において使用され得る。

#### 【0159】

薬学的な物質の処方および製造における一般的な考察は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 19版, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995に見ることができる。

#### 【0160】

##### 診断法 / キット

本発明により、病理学的試料（血液、血清／血漿、末梢血単核細胞／末梢血リンパ球（PBMC / PBL）、痰、尿、糞便、咽頭スワブ、皮膚病変のスワブ、脳脊髄液、頸管スミア、膿試料、フードマトリックス、ならびに、脳、脾臓、および肝臓のような体の様々な部分に由来する組織を含むがこれらに限定されない）中のHAポリペプチドを検出するため、特に、特定のグリカン結合特性（例えば、アンブレラグリカンに対して、2-6シアリル化グリカンに対して、長い2-6シアリル化グリカンに対して結合するなど）を有しているHAポリペプチドを検出するためのキットが提供される。本発明によってはまた、土壤、水、および微生物叢を含むがこれらに限定されない環境試料中の目的のHAポリペプチドを検出するためのキットも提供される。列挙されていない他の試料もまた適切である場合がある。

#### 【0161】

特定の実施形態においては、本発明のキットには、特定のグリカン結合特性を有しているHAポリペプチドを特異的に検出する1つ以上の試薬が含まれ得る。そのような試薬としては、例えば、特定のHAポリペプチド（例えば、アンブレラグリカンおよび／または2-6シアリル化グリカンおよび／または長い2-6シアリル化グリカンに結合するHAポリペプチド）を特異的に認識する抗体を挙げることができる。これは、ELISA、免疫蛍光、および／または免疫プロッティングによってそのようなHAポリペプチドを特異的に検出するために使用することができる。これらの抗体はまた、ウイルス中和試験においても使用することができ、ここで試料は、目的のHAポリペプチドに特異的な抗体で処理され、未処理の試料と比較して、培養細胞に感染するその能力について試験される。この試料中のウイルスにそのようなHAポリペプチドが含まれている場合には、抗体はウイルスを中和し、それが培養細胞に感染することを防ぐであろう。あるいは、または加えて、そのような抗体はまた、HA阻害試験においても使用することができる。ここで、HAタンパク質が所定の試料から単離され、特定のHAポリペプチドまたはHAポリペプチドのセットに特異的な抗体で処理され、赤血球を凝集させるその能力について、未処理の試料と比較して試験される。試料中のウイルスにそのようなHAポリペプチドが含まれている場合には、抗体はHAポリペプチドの活性を中和して、それが赤血球を凝集させることを防ぐであろう（Harlow & Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, CSHL Press, 1988; [http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO\\_CDS\\_CSR\\_NCS\\_2002\\_5/en/index.html](http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_NCS_2002_5/en/index.html)；

http://www.who.int/csr/disease/avian\_influenza/guidelines/labtests/en/index.html）。他の実施形態においては、そのような薬剤として、特定のHAポリペプチドをコードするヌクレオチドに特異的に結合する核酸を挙げることができ、これは、RT-PCRまたはインサイチュハイブリダイゼーションによってそのようなHAポリペプチドを特異的に検出するために使用することができる（http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO\_CDS\_CSR\_NCS\_2002\_5/en/index.html；http://www.who.int/csr/disease/avian\_influenza/guidelines/labtests/en/index.html）。特定の実施形態においては、試料から単離された核酸は、検出の前に増幅させられる。特定の実施形態においては、診断試薬は検出できるように標識することができる。

#### 【0162】

本発明によってはまた、インフルエンザウイルスおよびワクチンの作成のための、本発明の試薬が含まれているキットも提供される。キットの内容物としては、目的のHAポリペプチド（または特徴的なもしくは生物学的に活性な部分）をコードするHAヌクレオチド（または特徴的なもしくは生物学的に活性な部分）が含まれている発現プラスミドが挙げられるが、これに限定されない。あるいは、または加えて、キットには、目的のHAポリペプチド（または特徴的なもしくは生物学的に活性な部分）を発現する発現プラスミドが含まれ得る。ウイルス遺伝子を含まない発現プラスミドもまた、使用者が任意の目的のインフルエンザウイルスに由来するHAヌクレオチドを取り込ませることができるように、含められる場合がある。VeroおよびMDCK細胞株を含むがこれらに限定されない哺乳動物細胞株もまた、キットとともに含められる場合がある。特定の実施形態においては、診断試薬は、検出できるように標識することができる。

#### 【0163】

特定の実施形態においては、本発明にしたがって使用されるキットには、参照試料、試料の処理、試験の実施についての説明書、結果の解釈のための説明書、試験を実施するために必要な緩衝剤および／または他の試薬が含まれ得る。特定の実施形態においては、キットには抗体のパネルが含まれ得る。

#### 【0164】

本発明のいくつかの実施形態においては、上記で議論されたグリカンアレイが、診断法および／またはキットとして利用され得る。

#### 【0165】

特定の実施形態においては、本発明のグリカンアレイおよび／またはキットは、多用量でアンブレラグリカンに対するHAポリペプチドの結合を評価するための用量応答実験（例えば、上記）を行うために使用される。そのような実験によっては、試験したHAポリペプチドの結合特性についての特に有用な知見が得られ、これらは、特異的な結合を評価するために特に有用である。このタイプの用量応答結合実験については、多くの有用な用途が見出されている。一例ではあるが例を挙げると、これらは、HAポリペプチド変異体の関連するシリーズにおける結合特性の進化の追跡を助けることができる。これは、シリーズが自然な進化、意図的な操作、または2つの組み合わせによって生じたかどうかは問わない。

#### 【0166】

特定の実施形態においては、本発明のグリカンアレイおよび／またはキットは、所望される結合特性を有しているHAポリペプチドおよび／またはHAポリペプチド変異体を誘導する、同定する、そして／あるいは選択するために使用される。例えば、いくつかの実施形態においては、本発明のグリカンアレイおよび／またはキットは、HAポリペプチドの集団に対して進化的（例えば、スクリーニングおよび／または選択）圧力を働くために使用される。

#### 【実施例】

## 【0167】

## (実施例1)

2-3および2-6シアリル化グリカンに対するH1 HA、H3 HA、およびH5 HAの結合特異性についての枠組み

H1 (PDB IDS: 1RD8, 1RU7, 1RUY, 1RV0, 1RVT, 1RVX, 1RVZ)、H3 (PDB IDs: 1MQL, 1MQM, 1MQN)、およびH5 (1JSN, 1JSO, 2FK0) に由来するHA、ならびに、2-3および/または

2-6シアリル化オリゴ糖を含むそれらの複合体の結晶構造により、特異的なHA-グリカン相互作用に関与している残基についての分子的洞察が得られた。さらに最近、トリおよびヒトのH1およびH3サブタイプのグリカン受容体特異性が、様々な2-3および2-6シアリル化グリカンを含むグリカンアレイ上の野生型および変異体をスクリーニングすることによって、詳しく調べられた。

## 【0168】

1918年にヒトで大流行したウイルスのHAの中のAsp190Glu変異は、2-6から2-3シアリル化グリカンへとその特異性を反転させた (Stevensら、J. Mol. Biol., 355: 1143, 2006; Glasserら、J. Virol., 79: 11533, 2005)。一方、トリH1の二重変異Glu190AspとGly225Asp (A/Duck/Alberta/35/1976) は、2-3から2-6シアリル化グリカンへとその特異性を反転させた。H3サブタイプの場合には、1963年のトリH3N8株と1967~68年にヒトで大流行したH3N2株との間での、Gln226からLeu、およびGly228からSerへのアミノ酸の変化が、

2-3から2-6シアリル化グリカンへのそれらの優先性の変化と関係があった (Rogersら、Nature, 304: 76, 1983)。HAグリカンの結合特異性と感染効率との間の関係は、高病原性の毒性のある1918 H1N1ウイルスを使用したフェレットモデルにおいて明らかにされていた (Tumpey, T.M.ら、Science 315: 655, 2007)。

## 【0169】

もとのヒト 2-6シアリル化グリカン (SC18) 受容体に対する優先性から、トリ 2-3シアリル化受容体に対する優先性 (AV18) への受容体結合特異性の切り替えにより、感染できないウイルスが生じた。一方、2-3/2-6シアリル化グリカン特異性が混ざっているウイルス (A/New York/1/18 (NY18)) のうちの1つは感染性を示さず、驚くべきことに、A/Texas/36/91 (Tx91) ウイルス (これもまた、2-3/2-6シアリル化グリカン特異性が混ざっている) は、効率よく感染することができた。さらに、上記のように、高病原性H5N1ウイルスの様々な株についてもまた、2-3/2-6シアリル化グリカン特異性の混合が示されており (Yamada, S.ら、Nature 444: 378, 2006)、まだヒトからヒトに感染することはできなかった。HAのシアリル化グリカン特異性と感染に関する交絡する結果は、以下の疑問を投じた。第1に、ヒトの上気道の中で見られるシアリル化グリカンに多様性が存在し、ウイルスの特異性と組織向性の原因となり得るかどうか。第2に、2-3および/または2-6シアリル化グリカンの両方がHAグリカン結合ポケットに結合する方法において役割を担い得るグリカン立体構造の相違があるかどうか。まとめると、ヒトへの適応のためのインフルエンザAウイルスHAのグリカン結合要件は何であるか。

## 【0170】

2-3シアリル化グリカンに対するH1 HA、H3 HA、およびH5 HAの結合についてのグリカントポロジーおよび置換によって付与される構造的拘束

全てのHA-グリカン共晶構造の分析は、Neu5Ac糖 (SA) の方向がHAグリカン結合部位に対して固定されていることを示す。様々なHAサブタイプにわたってアミノ酸Phe95、Ser/Thr136、Trp153、His183、Leu/Ile194の高度に保存されているセットは、SAの固定に関与している。したがって、2-

3または2-6に対するHAの特異性は、グリコシド酸素原子およびSA以外の糖とのHAグリカン結合部位の相互作用によって支配される。

#### 【0171】

Neu5Ac 2-3Gal結合の立体構造は、2-3の中のGalおよびGal以外の糖の位置が、この結合のグリコシドねじれ角によって支配されるコーン様領域の中に入るようになっている(図6)。最小エネルギーの立体構造の典型的な領域は、およそ-60または60または180の値によって表され、この場合、は、-60から60の見本をとる(図14)。これらの最小エネルギーの領域においては、2-3の中のGal以外の糖は、HAグリカン結合部位の外側に飛び出している。これは、2-3モチーフ( *Neu5Ac 2-3Gal 1-3/4GalcNAc-* )を有しているHAの共晶構造からも明らかであり、ここで、値は、通常はおよそ180である(トランス立体構造と呼ばれる)。このトランス立体構造は、ポケットの外側の突起に対して2-3モチーフを生じる。これは、3つの糖(または3糖)の2-3モチーフ上の中にあるGalおよび/またはGalcNAc(またはGalNAc)糖の位置で分岐している構造上のバリエーション(硫酸化およびフコシル化)が、HA結合に対して最も大きな影響を有しているであろうことを暗に意味している(図7)。この構造の暗示は、データ検索分析によって得られた2-3シアリル化グリカンに対するHAの結合についての3つの異なる分類子と一致する(表3)。これらの3つのクラスの全てにおいて共通している特徴は、Neu5Ac 2-3Galが、GalNAc / 1-4Galと一緒にには存在しないはずであることがある。結晶構造の分析は、Neu5Ac 2-3GalのGalに対して結合したGalNAcが、分類子と一致して、タンパク質と好ましくない立体接触を形成することを示した。

#### 【0172】

シアル酸結合についての保存されている固定点に加えて、2つの重要な残基であるGaln226とGalu190が、Neu5Ac 2-3Galモチーフに対する結合に関与している。結合部位の基部に存在するGaln226は、Neu5Ac 2-3Gal結合のグリコシド酸素原子と相互作用する(図15、パネルC、D)。Galn226の反対側に存在するGalu190は、Neu5AcおよびGal单糖と相互作用する(図15、パネルC、D)。さらに、残基Ala138(Gln226に対して近位にある)とGal28(Glu190に対して近位にある)(これらは、トリHAの中で高度に保存されている)は、2-3シアリル化グリカンとの最適な相互作用のためのGaln226とGalu190の正確な立体構造を促進することに関与することができる(図15)。ヒトH1サブタイプであるAPR34には、4つのアミノ酸Ala138、Galu190、Galn226、およびGal28が全て含まれており、その結晶構造において観察されるように、2-3シアリル化グリカンに結合する(図14、パネルB)。

#### 【0173】

AAI68-H3-23、ADU67-H3-23、およびAPR34-H1-23の結晶構造においてグリカン結合部位が重なり合うことにより、Galu190側鎖の位置と、2-3シアリル化グリカンに対するHAの結合に対するその影響についてのさらなる知見が得られた。H1-HAの中のGalu190の側鎖は、H3-HAの中のGalu190の側鎖と比較して、さらに(およそ1°)結合部位の内側にある。この原因は、Galu190残基の近位に存在する、H3-HAの中のSer186と比べた、H1-HAの中のアミノ酸の相違Pro186である可能性がある。Galu190の側鎖立体構造のこの変化は、グリカンマイクロアレイデータのデータ検索分析によって示されるように、2-6シアリル化グリカンのいくつかに対する適度な親和性でのトリH1(そして、トリH3ではない)の結合と相関関係があり得る(表3)。さらに、Gal228からSerへの置換(トリのH3サブタイプとヒトのH3サブタイプの間での特徴的な変化)は、Galu190の立体構造を変化させて、トランス立体構造のNeu5Ac 2-3Galに対するヒトH3-HAの相互作用を妨害する。これはさらに、ヒトAAI68-H3-23共晶構造において観察されるNeu5Ac 2-3Galモチーフの異なる立体構造(ト

ランスではない)によっても詳しく述べられる。この立体構造のNeu5Ac 2-3Galモチーフは、トリH3 HAを有しているトランス立体構造の中のこのモチーフによってもたらされるものと比較して、ヒトH3 HA結合部位との最適ではない接触を提供する(図14)。この接触が少なくなることの結果として、ヒトH3 HAの中のG1y228Ser変異は、そのグリカン結合部位を、2-3シアリル化グリカンとの相互作用について好ましくないようにする。この構造的観察は、ヒトH3 HAが2-3シアリル化グリカンのいくつかに対しては適度な親和性しか有していないことを示すデータ検索分析による結果(表3)と一致する。

#### 【0174】

Neu5Ac 2-3Galの周囲の構造のバリエーションは、HA-グリカン相互作用に対してどのような影響を与えるのであろうか。Lys193(これは、トリH5において高度に保存されている(図5))は、Neu5Ac 2-3Gal 1-4GalcNAcの中の6-O硫酸化Galおよび/または6-O硫酸化GalcNAcと相互作用するように配置されている。この観察は、データ検索分析によって確認される。ここで、トリH5だけが、GalまたはGalcNAcで硫酸化された2-3シアリル化グリカンに対して高い親和性で結合する(表3)。同様の様式で、222位の塩基性アミノ酸は、Neu5Ac 2-3Gal 1-3GalcNAcモチーフの中の4-O硫酸化GalcNAc、またはNeu5Ac 2-3Gal 1-4GalcNAcモチーフの中の6-O硫酸化GalcNAcと相互作用することができる。一方、かさの大きい側鎖(例えば、H1およびH5の中のLys222、およびH3の中のTrp222)は、Neu5Ac 2-3Gal 1-4(Fuc 1-3)GalcNAcモチーフの中のフコシル化GalcNAcを妨害する可能性がある。この構造的観察は、トリH3およびH5株について観察された分類子規則2-3タイプCを裏づけ(表3)、GalcNAcでのフコシル化が結合にとって有害であることを示す。2-3シアリル化グリカンに対するViet04\_H5 HAの結合は、それらのそれぞれのグリカン結合部位がほとんど同じであるアミノ酸と仮定すると、ADS97\_H5 HAの結合と類似している(表3)。

#### 【0175】

したがって、2-3シアリル化グリカンに対する結合については、Neu5Acを固定する残基とは異なり、全てのトリH1、H3、およびH5サブタイプにおいて高度に保存されているGalu190とGaln226が、Neu5Ac 2-3Galモチーフに対する結合に重要である。GalcNAcまたはGalNAcとの接触、ならびに、2-3モチーフの中での硫酸化およびフコシル化のような置換には、137位、186位、187位、193位、および222位のアミノ酸が含まれる。H1、H3、およびH5由来のHAは、グリカンマイクロアレイの中に存在する多様な2-3シアリル化グリカンに対して差別的な結合特異性を示す。これらの位置にあるアミノ酸残基は、異なるHAの間では保存されておらず、これは、異なる結合特異性の原因となる。

#### 【0176】

2-6シアリル化グリカンへのH1 HAおよびH3 HAの結合についてのグリカントポロジーと置換によって付与される構造的拘束

Neu5Ac a 2-6Gal結合の場合には、さらに別のC6-C5結合の存在によってさらに大きな立体構造上の柔軟性が提供される。2-6の中のGalおよびその後の糖の位置は、2-3の場合のコーン様領域と比較して、はるかに大きなアンブレラ様領域に広がる(図6)。2-6に対する結合には、そのようなアンブレラトポロジーの基部にあるNeu5AcとGal糖、またそれに続く糖との、オリゴ糖の長さに応じた最適な接触が含まれる。短い2-6オリゴ糖(例えば、Neu5Ac 2-6Gal 1-3/4Galは、コーン様トポロジーを採用する可能性がある。一方、2-6モチーフNeu5Ac 2-6Gal 1-4GalcNAc-の中のGalの換わりにGalcNAcが存在することにより、アンブレラトポロジー(これは、GalcNAcとNeu5Acの両方のアセチル炭素の間での最適なファンデルワールス接触によって安定化させられる)を好む可能性がある。しかし、2-6モチーフはまた、コントポロジーをも採用す

ることができ、その結果、分岐およびHAの結合のようなさらなる要素が、アンプレラトポロジーによってもたらされる安定性を補うことができる。N結合グリカンの中の複数の短いオリゴ糖分岐の一部として存在する2-6モチーフのコントポロジーは、糖内相互作用によって安定化させられ得る。一方、アンプレラトポロジーは、長いオリゴ糖分岐（少なくも4糖）の中の2-6モチーフによって好まれる。2-6モチーフ（Neu5Ac 2-6Gal 1-4GlcNAc-モチーフ）を有しているH1 HAおよびH3 HAの共晶構造は、上記の概念をサポートする。ここで、約-60°の（シス立体構造と呼ばれる）によって、Neu5Ac 2-6Gal 1以外の糖のHAタンパク質方向への湾曲が生じて結合部位との最適な接触が形成される（図7）。

#### 【0177】

H1 HAにおいては、ASI30\_H1\_26およびAPR34\_H1\_26に由来するHAのグリカン結合ドメインと、ヒトH1N1 (A/South Carolina/1/1918)サブタイプに由来するHAのグリカン結合ドメインとが重なり合うことにより、2-6シアリル化グリカンに対する特異性を提供することに関与しているアミノ酸についての知見が得られた。Lys222とAsp225は、Neu5Ac 2-6Gal 1モチーフの中のGal 1の酸素原子と相互作用するように配置されている。Asp190とSer/Asn193は、Neu5Ac 2-6Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1モチーフのさらなる単糖であるGlcNAc 1-3Gal 1と相互作用するように配置されている（図15、パネルA、B）。

#### 【0178】

Asp190、Lys222、およびAsp225は、1918年にヒトで大流行した複数の株に由来するH1 HAの間で高度に保存されている。アミノ酸Gln226は、全てのトリおよびヒトのH1サブタイプにおいて高度に保存されているが、2-3シアリル化グリカン（トリH1サブタイプの中の）に対する結合におけるその役割と比較して、2-6シアリル化グリカン（ヒトH1サブタイプの中の）に対する結合に関与していることは明らかになっていない。トリとヒトのH1 HAの野生型および変異体形態についてのグリカンアレイ結果のデータ検索分析は、2-6シアリル化グリカンに対する結合における上記のアミノ酸の役割をさらに実証している（表3）。トリH1 HAのGlu190Asp/Gly225Asp二重変異は、その結合を2-6シアリル化グリカンに対して反転させる（表3）。さらに、ヒトANY18\_H1のLys222Leu変異体は、グリカンの結合におけるLys222の不可欠な役割と一致して、アレイ上の全てのシアリル化グリカンに対するその結合を排除する。

#### 【0179】

2-6シアリル化グリカンに対するH3N2 HA結合の特異性を提供するアミノ酸を同定するために、ヒトH3N2 (AAI68\_H3)、ADU63\_H3\_26、およびASI30\_H1\_26に由来するHAのグリカン結合ドメインを重ね合わせた。これらの重ね合わせた構造の分析は、Leu226が、Neu5 2-6Gal 1モチーフのC6原子との最適なファンデルワールス接触を提供するように配置されており、Ser228は、シアル酸のO9と相互作用するように配置されていることを示した。ヒトH3の中のSer228もまたGlu190と相互作用し (Glu190と相互作用しないトリADU63\_H3の中のGly228とは異なる)、それにより、その側鎖の立体構造に影響を与える。ヒトH3 HAの中のGlu190の側鎖は、トリH3 HAの中のGlu190の側鎖と比較して、約0.7°、わずかに結合部位の内側に移動させられる。これらの相違は、2-3シアリル化グリカンに対して結合するヒトH3 HAの能力を制限し、2-6シアリル化グリカンに対するその優先的な結合と相関関係がある。したがって、Gln226LeuおよびGly228Ser変異は、1967年に大流行したヒトH3サブタイプへの、トリH3のグリカン受容体特異性の反転を引き起こす。

#### 【0180】

1967~68に大流行したH3N2に由来するHAと、より最近のH3サブタイプ（1990年以降）に由来するHAとの比較は、Glu190が、最近のサブタイプにおいて

ては、Aspに変異していることを示している。この変異は、2-6シアリル化グリカンに対するヒトH3の結合をさらに促進する。なぜなら、ヒトH3の中のAsp190は、これらのグリカンと好ましく相互作用するように配置されているからである。この構造の予測は、ヒトH3サブタイプ(A/Moscow/10/1999)についてのグリカンアレイデータのデータ検索分析によってさらに裏付けられる。このHAには、Asp190、Leu226、およびSer228が含まれており(図2)、2-6シアリル化グリカンに対する強い優先性を示す(表3)。

#### 【0181】

上記の観察は、2-6シアリル化グリカンに対するH1 HAの結合とH3 HAの結合との間での類似性、さらには相違の両方を際立たせる。H1 HAおよびH3 HAのいずれにおいても、Asp190およびSer/Asn193は、Neu5Ac 2-6Galモチーフ以外の单糖と好ましい接触を形成するように配置されている(図15、パネルA、B)。アミノ酸の相違と、H1 HAとH3 HAとの間での2-6シアリル化グリカンとのそれらの接触は、これらのグリカンへの結合について、異なる表面およびイオン相補性を提供する。Neu5Ac 2-6Gal結合は、Neu5Ac 2-3Galよりもさらに大きな立体構造上の自由度を有している。したがって、2-6シアリル化グリカンに対するHAの結合は、この立体構造の自由度に順応するための、さらなる開いた結合ポケットを有している。ヒトH3 HAの中のLeu226は、Neu5Ac 2-6Galとの最適なファンデルワールス接触を提供するように配置されているが、このモチーフに対してH1 HAの中のGln226によって提供されるイオン性の接触は最適ではない。一方、H1においては、アミノ酸Lys222とAsp225が、H3の中のTrp222およびGly225と比較して、2-6シアリル化グリカンとのより適しているイオン性の接触を提供する。

#### 【0182】

2-6シアリル化グリカンに対する野生型および変異体H5 HAの結合についての構造的拘束

H1 HAおよびH3 HAの中の様々なアミノ酸によって提供される2-6シアリル化グリカンとの相互作用は、現在のトリH5N1 HAが、そのグリカン受容体特異性を反転させるために、H1様またはH3様のグリカン結合部位を変異させることができることを示唆していた。上記の枠組みに基づいて、H5 HAについて仮定されるH1様およびH3様の変異をさらに精密に作り上げ、以下に議論するように試験した。

#### 【0183】

重ねあわせたASI30\_H1\_26、APR34\_H1\_26、ADS97\_H5\_26、およびVie04\_H5構造の分析から、2-6シアリル化グリカンに対するH5 HAのH1様結合についての知見が得られた。H1 HAおよびH5 HAは、同じ構造のクレードに属するので、それらのグリカン結合部位は、類似するアミノ酸のトポロジーと分布を共有する(Russe11ら、Virology, 325: 287, 2004)。Lys222(これは、トリH5 HAにおいて高度に保存されている)は、H1 HAの中の類似のLysと類似する、Neu5Ac 2-6GalモチーフのGalとの最適な接触を提供するように配置される。Vie04\_H5の中のGlu190およびGly225は、(H1の中のAsp190およびAsp225の代わりに)、H1と類似するNeu5Ac 2-6Gal 1-4GalNAcモチーフとの不可欠な接触は提供しない。したがって、H5 HAの中のGlu190AspおよびGly225Asp変異によって、2-6シアリル化グリカンとの接触を改善できる可能性がある。

#### 【0184】

Neu5Ac 2-6Gal 1-4GalNAc 1-3Gal 1-4GalNAcオリゴ糖の中のGalNAc以外の相互作用と、H1 HAおよびH5 HAのグリカン結合ポケットの分析は、H1 HAの中のSer/Asn193が、最後から2番目のGalとの好ましい接触を提供するが、H5の中の類似のLys193は、GalNAc 1-3Galモチーフと好ましくない立体的重複を有することを示した。したがって、Lys

193Ser変異によっては、2-6シアリル化グリカンとのさらなる好ましい接触(Glu190AspおよびGly225Asp変異を伴う)を提供することができる。

【0185】

H1 HAの中の高度に保存されているGln226はまた、トリH5 HAにおいても保存されている。Gln226が2-6シアリル化グリカンに対するH1 HAの結合においてあまり活発ではない役割を担うと仮定すると(上記で議論したように)、Leuのような疎水性アミノ酸に対するこのアミノ酸の変異により、Neu5Ac 2-6Galモチーフの中のGalのC6原子とのそのファンデルワールス接触を増強させることができると可能性があり得る。

【0186】

ADU63-H3-26、AAI68-H3、ADS97-H5-26、およびVie t04-H5が重なり合うことにより、2-6シアリル化グリカンに対するH5 HAのH3様結合についての知見が得られた。この重なり合わせは、H5 HAおよびH3 HAのグリカン結合部位と構造的に並ぶが、これは、H5とH1との間での構造的アラインメントほど良好ではなかった。H3 HAの中のLeu226とSer228によってそれぞれ提供されるNeu5 2-6Galモチーフとの好ましいファンデルワールス接触とイオン的接触は、(Gln226とGly228を有している)H5 HAの中には存在しなかった。Leu226およびSer228がヒトH3 HAの中の2-6シアリル化グリカンに対する結合にとって重要であると仮定すると、H5 HAの中のGln226LeuおよびGly228Ser変異によって、2-6シアリル化グリカンとの最適な接触を提供できる可能性があり得る。さらに、H3とH5との間での比較においてもなお、Lys193は、好ましい接触を提供するように配置されているヒトH3 HAの中のSer193と比較して、Neu5Ac 2-6Galモチーフ以外の单糖と好ましくない立体的接触を有するように配置される。1967~68年に大流行したH3N2に由来するHAにはGlu190が含まれているが、H5 HAの中のAsp190は、より長いオリゴ糖の中のNeu5Ac 2-6Galモチーフとより良好なイオン的接触を提供するように配置されている。

【0187】

上記の残基の役割は、Vie t04-H5の野生型および変異体形態についてのグリカンアレイデータのデータ検索分析によって、さらに裏付けられた(表3)。二重変異体Glu190Asp/Gly225Aspは、いずれのグリカン構造にも結合しない。なぜなら、これは、2-3シアリル化グリカンに対する結合についてはアミノ酸Glu190を失っており、2-6シアリル化グリカンに対する結合についてはLys193による立体障害を有しているからである。同様に、二重変異体Gln226Leu/Gly228Serは、2-3シアリル化グリカン(2-3タイプB分類子)のうちのいくつかに結合するが、1つの二分岐を有している2-6シアリル化グリカン(2-6タイプA分類子)だけにしか結合しない。

【0188】

二分岐の2-6シアリル化グリカンに対するこの結合の分析は、このグリカンの中のNeu5Ac 2-6Gal結合が、より接触は少ないが、二重変異に対して伸張配座の中で潜在的に結合できることを示した(図16)。さらに、Mal 1-3Man分岐上のNeu5Ac 2-6Galは、H5 HAのグリカン結合部位と好ましくない立体的接触を有している、Man 1-6Man分岐上の同じモチーフと比較して、さらに好ましく結合する(図16)。2-6シアリル化グリカンに対するGln226Leu/Gly228Ser二重変異体の狭い特異性は、結合を妨害するLys193と一致する。

【0189】

いずれの特定の理論にも束縛されることは望まないが、本発明者らは、インフルエンザAウイルスHAのヒトへの適応のための必要条件は、高い親和性で長い2-6(主に、ヒトの上気道で発現される)に結合する能力を獲得することであると提起する。例えば、グリカンの多様性の1つの特徴は、シアル酸で捕捉されるラクトサミンの分岐の長さであ

る。これは、データ検索分析によって導かれた 2 - 6 シアリル化グリカンの 2 つの異なる特徴によって捕捉される(表 3)。1 つの特徴は、N 結合したコアの Man に連結させられた Neu5Ac 2 - 6 Gal 1 - 4 GlcNAc を特徴とし、他方は、より長い分岐(これは、通常はアンブレラトポロジーを採用する)を形成している別のラクトースアミン単位に連結させられたこのモチーフを特徴とする。したがって、上気道に対する変異体 H5 HA の広域結合は、これらの変異体がアンブレラトポロジーを採用している長い 2 - 6 を有しているグリカンに対して高い親和性で結合する場合に限り、可能であり得る。例えば、本発明に従うと、所望される結合パターンとしては、図 9 に示されるアンブレラグリカンに対する結合が挙げられる。

#### 【0190】

対照的に、本発明者らは、グリカンアレイ上の 1 つの二分岐の a 2 - 6 シアリル(sialyl) - ラクトサミングリカン構造だけに対して結合を示した修飾された H5 HA タンパク質(Gly228Ser と Gly226Leu / Gly228Ser 置換を含む)についての最近の報告に注目した(Stevens ら、Science 312: 404, 2006)。したがって、そのような修飾された H5 HA タンパク質は、本明細書中に記載される BSHB H5 HA ではない。

#### 【0191】

##### (実施例 2)

HA のクローニング、バキュロウイルスによる合成、発現、および精製 ウィルスの中のヘマグルチニンは 3 量体として存在し、膜に固定される。HA の全長の構築物は、N 末端シグナルペプチドと C 末端の膜貫通配列を有する。HA の組み換えによる発現のためには、多くの場合は、タンパク質の分泌が可能である HA の短縮型の構築物が使用される。この短縮型の可溶性構築物は、HA の N 末端シグナルペプチドを Gp67 シグナルペプチド配列で置き換えることによって作成され、C 末端の膜貫通領域は、「foldon」配列、続いてトリプシン切断部位、および 6x-His タグによって置き換えられる(Stevens ら、J. Mol. Biol., 355: 1143, 2006)。HA の全長および可溶性形態の両方を昆虫細胞の中で発現させた。Sf900 II SfM 培地(Invitrogen)の中の Sf - 9 細胞の懸濁培養物を、全長の HA または可溶性形態の HA のいずれかが含まれているバキュロウイルスに感染させた。細胞を、感染の 72 ~ 96 時間後に回収した。

#### 【0192】

A / Vietnam / 1203 / 2004 由来のヘマグルチニン(HA)は、Adolfo Garcia-Sastre から懇意により譲り受けた。この「野生型」(WT) HA を鋳型として使用して、2 つの異なる変異体構築物、DSLs と DSDL を、QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) と QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を使用して作成した。突然変異誘発のために使用したプライマーは、ウェブに基づくプログラム PrimerX (<http://bioinformatics.org/primerx/>) を使用して設計し、Invitrogen によって合成された。WT 遺伝子と変異体 HA 遺伝子を、エントリーベクター pENTR-D-TOPO (Invitrogen) の中に、TOPO 連結を使用してサブクローニングした。WT 遺伝子を含むエントリーベクターと、変異体遺伝子を含むエントリーベクターを、Baculodirect linear DNA (Invitrogen) と、Gateway クローニング技術を使用して組換えた。DNA 配列決定をそれぞれのサブクローニング工程で行って、配列の精度を確認した。生産された組み換え体バキュロウイルス DNA を使用して Spodoptera frugiperda Sf - 9 細胞(Invitrogen) をトランスフェクトして、ウイルスの一次ストックを得た。

#### 【0193】

全長の HA を、Wang ら、(2006) Vaccine, 24: 2176 によって改

良された方法により、感染させた細胞の膜画分から精製した。簡単に説明すると、150 mlの培養物から細胞を遠心分離によって回収し、細胞ペレットを、30 mlの緩衝液A (20 mMのリン酸ナトリウム、1.0 mMのEDTA、0.01%のTergitol-NP-9、5%のグリセロール、pH 5.93) 中の1%のTergitol-NP-9で、4で30分間抽出した。その後、抽出物を6,000 gで15分間遠心分離した。上清を0.45ミクロンのフィルターを使用して濾過し、緩衝液Aで先に平衡化させておいたQ/SPカラム (GE healthcare, Piscataway, NJ) 上にロードした。ロードした後、カラムを20 mlの緩衝液Aで洗浄した。その後、陰イオン交換カラムQを外し、SPカラムを、タンパク質の溶出のために、緩衝液B (20 mMのリン酸ナトリウム、0.03%のTergitol、5%のグリセロール、pH 8.2) の5つ5 mlの画分と、緩衝液C (20 mMのリン酸ナトリウム、150 mMのNaCl、0.03%のTergitol、5%のグリセロール、pH 8.2) の2つの5 mlの画分を用いて使用した。目的のタンパク質が含まれている画分をまとめてプールし、Amicon Ultra 100 K NMWL膜フィルター (Millipore) を使用して限外濾過を行った。タンパク質を濃縮し、PBSの中に再構成させた。

#### 【0194】

可溶性形態のHAを、Stevensら、(2004)に記載されているプロトコルを使用して、感染させた細胞の上清から精製した。簡単に説明すると、上清を濃縮し、可溶性のHAを、Ni-NTAビーズ (Qiagen) を使用してアフィニティクロマトグラフィーを行うことによって、濃縮した細胞上清から回収した。HAが含まれている溶離画分をプールし、10 mMのTris-HCl、50 mMのNaCl (pH 8.0) に対して透析した。イオン交換クロマトグラフィーを、Mono-Q HR10/10カラム (Pharmacia) を使用して透析した試料について行った。HAが含まれている画分をまとめてプールし、Amicon Ultra 100 K NMWL膜フィルター (Millipore) を使用して限外濾過を行った。タンパク質を濃縮して、PBSの中に再構成した。

#### 【0195】

試料中のタンパク質の存在は、抗トリH5N1 HA抗体を用いたウェスタンプロット分析を行うことによって確認した。ドットプロット免疫アッセイ (Protein Sciences Inc) から入手した野生型H5 HAを対照として使用した) により、WTと変異体のタンパク質濃度を決定した。行った様々な実験において、H5 HA (WTおよび変異体) のタンパク質濃度は、通常は、20~50 µグラム/mlの範囲にあることが明らかになった。所定のロットについてのタンパク質濃度に基づいて、1:10~1:100の範囲の適切な段階希釈を使用した (図17を参照のこと)。

#### 【0196】

##### (実施例3)

HAのグリカン結合特異性を調べるためのデータ検索プラットフォームの適用

2-3/6シアリル化グリカンに対するH5N1サブタイプの結合についての枠組みを開発した (図7)。この枠組みには、2つの相補性分析を含めた。第1の分析には、HAグリカン結合部位、ならびに、H1 HA、H3 HA、およびH5 HA-グリカン共晶構造を使用した、2-3シアリル化グリカンと2-6シアリル化グリカンとの相互作用の体系的分析を含めた (表2)。

#### 【0197】

この分析により、アンブレラトポロジーまたはコーントポロジーのいずれかのグリカンを含む様々な2-3/6シアリル化グリカンとのHAグリカン結合部位の相互作用についての重要な知見が得られた。第2の分析には、様々なH1 HA、H3 HA、およびH5 HAについてのグリカンアレイデータを分析するためのデータ検索アプローチを含めた。このデータ検索分析は、マイクロアレイ中のグリカンの構造的特徴に対する、様々な野生型および変異体HAの強いバインダー、弱いバインダー、そして非バインダーと相関関係がある (表3)。

## 【0198】

重要なことは、これらの相関関係（分類子）が、様々な H Aへの結合に対する、2-3 / 6 シアリル化結合および / または様々なトポロジーの微妙な構造的バリエーションの影響を捉えることである。データ検索分析によって得られたグリカンの特徴の相関関係を、H Aグリカン結合部位上にマップし、これにより、以下に議論するような、2-3 および 2-6 シアリル化グリカン（様々なトポロジーのグリカンを含む）に対する H 1 H A、H 3 H A、および H 5 H A の結合を体系的に研究するための枠組みを得た。

## 【0199】

一例ではあるが例を挙げると、本発明の H 5 H A に対するこの枠組みの適用により、2-6 オリゴ糖鎖の長さが、特に、分岐の程度の状況において、グリカンについての構造的バリエーションのニュアンスよりも重要となる理由が説明される。例えば、より長い 2-6 モチーフを有している二分岐構造に対して 1 つの 2-6 モチーフを有している三分岐構造は、個々の 2-6 モチーフについての構造的バリエーションと比較して、H A - グリカン結合に影響を与えるであろう。これは、データ検索によって本明細書中で得られた 2-6 モチーフについての、長さに依存する異なる分類子によって確認される（表 3）。

## 【0200】

## （実施例 4）

## 広域ヒト結合 H 5 H A ポリペプチド

本発明のいくつかの特定の実施形態においては、H A ポリペプチドは H 5 ポリペプチドである。いくつかのそのような実施形態においては、本発明の H 5 ポリペプチドは、アンブレラグリカンに対する結合（例えば、高親和性の結合および / または高特異性の結合）を示す。いくつかの実施形態においては、本発明の H 5 ポリペプチドは、「広域ヒト結合」（B S H B）H 5 ポリペプチドと呼ばれる。

## 【0201】

表現「広域ヒト結合」（B S H B）は、最初は、ヒトの上皮組織の中に見られる H A 受容体、特に 2-6 シアリル化グリカンを特徴とするヒト H A 受容体に対して結合する H 5 ポリペプチドをいうように作られた。上記で議論したように、一般的には、H A ポリペプチドに関して、いくつかの実施形態においては、本発明の B S H B H 5 H A ポリペプチドは、ヒトの上気道上皮細胞上に見られる受容体に結合する。さらに、本発明の B S H B H 5 H A ポリペプチドは、複数の様々な 2-6 シアリル化グリカンに結合する。特定の実施形態においては、B S H B H 5 H A ポリペプチドはアンブレラグリカンに結合する。

## 【0202】

特定の実施形態においては、本発明の B S H B H 5 H A ポリペプチドは、気管支および / または気管の中の H A 受容体に結合する。いくつかの実施形態においては、B S H B H 5 H A ポリペプチドは、深部肺の受容体には結合できず、他の実施形態においては、B S H B H 5 H A ポリペプチドは、深部肺の中の受容体に結合できる。さらなる実施形態においては、B S H B H 5 H A ポリペプチドは、2-3 シアリル化グリカンには結合できず、他の実施形態においては、B S H B H 5 H A ポリペプチドは、2-3 シアリル化グリカンに結合できる。

## 【0203】

特定の実施形態においては、本発明の B S H B H 5 H A ポリペプチドは、もとの H 5 H A（例えば、自然界に存在しているインフルエンザ単離物の中で見られる H 5 H A）の変異体である。例えば、いくつかの実施形態においては、本発明の B S H B H 5 H A ポリペプチドは、野生型 H 5 H A と比較して、グリカン結合部位の中に、またはグリカン結合部位に影響を与える、少なくとも 1 つのアミノ酸置換を有する。いくつかの実施形態においては、そのような置換は、結合したグリカンと直接相互作用するアミノ酸の置換である；他の実施形態においては、そのような置換は、結合したグリカンと相互作用するものから 1 分離度で取り出されたアミノ酸の置換である。ここで、1 分離度で取り

出されたアミノ酸は：（1）直接結合するアミノ酸と相互作用する；（2）あるいは直接結合するアミノ酸のグリカンと相互作用する能力に影響を与えるが、グリカン自体とは直接は相互作用しない；または、（3）あるいは直接結合するアミノ酸のグリカンと相互作用する能力に影響を与え、また、グリカン自体とも直接相互作用するかのいずれかである。本発明の BSHB-H5-HA ポリペプチドには、1つ以上の直接結合するアミノ酸の置換、1つ以上の1分離度のアミノ酸の置換、1つ以上の2分離度のアミノ酸の置換、あるいは、これらの任意の組み合わせが含まれる。いくつかの実施形態においては、本発明の BSHB-H5-HA ポリペプチドには、なおさらには高い分離度を有している1つ以上のアミノ酸の置換が含まれる場合がある。

#### 【0204】

特定の実施形態においては、本発明の BSHB-H5-HA ポリペプチドは、野生型の H5-HA と比較して、少なくとも2個、3個、4個、5個、またはそれ以上のアミノ酸の置換を有する；いくつかの実施形態においては、本発明の BSHB-H5-HA ポリペプチドは、2個、3個、または4個のアミノ酸置換を有する。いくつかの実施形態においては、全てのそのようなアミノ酸置換は、グリカン結合部位の中に配置されている。

#### 【0205】

特定の実施形態においては、 BSHB-H5-HA ポリペプチドは、野生型 H5-HA と比較して、98位、136位、138位、153位、155位、159位、183位、186位、187位、190位、193位、194位、195位、222位、225位、226位、227位、および228位の残基からなる群より選択される残基に、1つ以上のアミノ酸置換を有する。他の実施形態においては、 BSHB-H5-HA ポリペプチドは、野生型の H5-HA と比較して、グリカンに直接結合する受容体の領域に配置されているアミノ酸から選択される残基（98位、136位、153位、155位、183位、190位、193位、194位、222位、225位、226位、227位、および228位の残基が含まれるがこれらに限定されない）に1つ以上のアミノ酸置換を有する。さらなる実施形態においては、 BSHB-H5-HA ポリペプチドは、野生型の H5-HA と比較して、グリカンに直接結合する受容体の領域に隣接して配置されているアミノ酸から選択される残基（98位、138位、186位、187位、195位、および228位の残基が含まれるがこれらに限定されない）に1つ以上のアミノ酸置換を有する。

#### 【0206】

さらなる実施形態においては、 BSHB-H5-HA ポリペプチドは、野生型の H5-HA と比較して、138位、186位、187位、190位、193位、222位、225位、226位、227位、および228位の残基からなる群より選択される残基に1つ以上のアミノ酸置換を有する。他の実施形態においては、 BSHB-H5-HA ポリペプチドは、野生型の H5-HA と比較して、グリカンに直接結合する受容体の領域に配置されているアミノ酸から選択される残基（190位、193位、222位、225位、226位、227位、および228位の残基が含まれるがこれらに限定されない）に1つ以上のアミノ酸置換を有する。さらなる実施形態においては、 BSHB-H5-HA ポリペプチドは、野生型の H5-HA と比較して、グリカンに直接結合する受容体の領域に隣接して配置されているアミノ酸から選択される残基（138位、186位、187位、および228位の残基が含まれるがこれらに限定されない）に1つ以上のアミノ酸置換を有する。

#### 【0207】

さらなる実施形態においては、 BSHB-H5-HA ポリペプチドは、野生型の H5-HA と比較して、98位、136位、153位、155位、183位、194位、および195位の残基からなる群より選択される残基に1つ以上のアミノ酸置換を有する。他の実施形態においては、 BSHB-H5-HA ポリペプチドは、野生型の H5-HA と比較して、グリカンに直接結合する受容体の領域に配置されているアミノ酸から選択される残基（98位、136位、153位、155位、183位、および194位の残基が含まれるがこれらに限定されない）に1つ以上のアミノ酸置換を有する。さらなる実施形態にお

いては、B S H B H 5 H A ポリペプチドは、野生型のH 5 H A と比較して、グリカンに直接結合する受容体の領域に隣接して配置されているアミノ酸から選択される残基(98位および195位の残基が含まれるがこれらに限定されない)に1つ以上のアミノ酸置換を有する。

【0208】

特定の実施形態においては、B S H B H 5 H A ポリペプチドは、野生型のH 5 H A と比較して、結合したグリカンと相互作用するものから1分離度で取り出されたアミノ酸から選択される残基(98位、138位、186位、187位、195位、および228位の残基が含まれるがこれらに限定されない)に1つ以上のアミノ酸置換を有する。ここで、1分離度で取り出されたアミノ酸は、(1)直接結合するアミノ酸と相互作用する；(2)あるいは直接結合するアミノ酸のグリカンと相互作用する能力に影響を与えるが、グリカン自体とは直接は相互作用しない；または、(3)あるいは直接結合するアミノ酸のグリカンと相互作用する能力に影響を与える、また、グリカン自体とも直接相互作用するかのいずれかである。

【0209】

さらなる実施形態においては、B S H B H 5 H A ポリペプチドは、野生型のH 5 H A と比較して、結合したグリカンと相互作用するものから1分離度で取り出されたアミノ酸から選択される残基(138位、186位、187位、および228位の残基が含まれるがこれらに限定されない)に1つ以上のアミノ酸置換を有する。ここで、1分離度で取り出されたアミノ酸は、(1)直接結合するアミノ酸と相互作用する；(2)あるいは直接結合するアミノ酸のグリカンと相互作用する能力に影響を与えるが、グリカン自体とは直接は相互作用しない；または、(3)あるいは直接結合するアミノ酸のグリカンと相互作用する能力に影響を与える、また、グリカン自体とも直接相互作用するかのいずれかである。

【0210】

さらなる実施形態においては、B S H B H 5 H A ポリペプチドは、野生型のH 5 H A と比較して、結合したグリカンと相互作用するものから1分離度で取り出されたアミノ酸から選択される残基(98位および195位の残基が含まれるがこれらに限定されない)に1つ以上のアミノ酸置換を有する。ここで、1分離度で取り出されたアミノ酸は、(1)直接結合するアミノ酸と相互作用する；(2)あるいは直接結合するアミノ酸のグリカンと相互作用する能力に影響を与えるが、グリカン自体とは直接は相互作用しない；または、(3)あるいは直接結合するアミノ酸のグリカンと相互作用する能力に影響を与える、また、グリカン自体とも直接相互作用するかのいずれかである。

【0211】

特定の実施形態においては、B S H B H 5 H A ポリペプチドは、野生型のH 5 H A と比較して、159位の残基にアミノ酸置換を有する。

【0212】

他の実施形態においては、B S H B H 5 H A ポリペプチドは、野生型のH 5 H A と比較して、190位、193位、225位、および226位から選択される残基に1つ以上のアミノ酸置換を有する。いくつかの実施形態においては、B S H B H 5 H A ポリペプチドは、野生型のH 5 H A と比較して、190位、193位、226位、および228位から選択される残基に1つ以上のアミノ酸置換を有する。いくつかの実施形態においては、本発明のH A ポリペプチド変異体、特にH 5 变異体は、以下のアミノ酸置換のうちの1つ以上を有する：Ser 137 Ala、Lys 156 Glu、Asn 186 Pro、Asp 187 Ser、Asp 187 Thr、Ala 189 Glu、Ala 189 Lys、Ala 189 Thr、Glu 190 Asp、Glu 190 Thr、Lys 193 Arg、Lys 193 Asn、Lys 193 His、Lys 193 Ser、Gly 225 Asp、Gln 226 Ile、Gln 226 Leu、Gln 226 Val、Ser 227 Ala、Gly 228 Ser。

【0213】

いくつかの実施形態においては、本発明の HA ポリペプチド変異体、特に H 5 変異体は、以下のアミノ酸置換のセットのうちの 1 つ以上を有する：

Glu 190 Asp、Lys 193 Ser、Gly 225 Asp、および Gln 226 Leu；  
 Glu 190 Asp、Lys 193 Ser、Gln 226 Leu、および Gly 228 Ser；  
 Ala 189 Gln、Lys 193 Ser、Gln 226 Leu、Gly 228 Ser；  
 ;  
 Ala 189 Gln、Lys 193 Ser、Gln 226 Leu、Gly 228 Ser；  
 ;  
 Asp 187 Ser / Thr、Ala 189 Gln、Lys 193 Ser、Gln 226 Leu、Gly 228 Ser；  
 Ala 189 Lys、Lys 193 Asn、Gln 226 Leu、Gly 228 Ser；  
 ;  
 Asp 187 Ser / Thr、Ala 189 Lys、Lys 193 Asn、Gln 226 Leu、Gly 228 Ser；  
 Lys 156 Glu、Ala 189 Lys、Lys 193 Asn、Gln 226 Leu、Gly 228 Ser；  
 Lys 193 His、Gln 226 Leu / Ile / Val、Gly 228 Ser；  
 Lys 193 Arg、Gln 226 Leu / Ile / Val、Gly 228 Ser；  
 Ala 189 Lys、Lys 193 Asn、Gly 225 Asp；  
 Lys 156 Glu、Ala 189 Lys、Lys 193 Asn、Gly 225 Asp；  
 ;  
 Ser 137 Ala、Lys 156 Glu、Ala 189 Lys、Lys 193 Asn、Gly 225 Asp；  
 Glu 190 Thr、Lys 193 Ser、Gly 225 Asp；  
 Asp 187 Thr、Ala 189 Thr、Glu 190 Asp、Lys 193 Ser、Gly 225 Asp；  
 Asn 186 Pro、Asp 187 Thr、Ala 189 Thr、Glu 190 Asp、Lys 193 Ser、Gly 225 Asp；  
 Asn 186 Pro、Asp 187 Thr、Ala 189 Thr、Glu 190 Asp、Lys 193 Ser、Gly 225 Asp、Ser 227 Ala。

#### 【0214】

いくつかのそのような実施形態においては、HA ポリペプチドは、野生型 HA と比較して、少なくとも 1 つのさらなる置換を有しており、その結果、アンブレラグリカンに対する変異体の親和性および / または特異性が増大する。

#### 【0215】

特定の実施形態においては、本発明の BSHB H5 HA ポリペプチドは、H1 HA に特徴的なアミノ酸配列を有する。例えば、いくつかの実施形態においては、そのような H1 様の BSHB H5 HA ポリペプチドは、置換 Glu 190 Asp、Lys 193 Ser、Gly 225 Asp、および Gln 226 Leu を有する。

#### 【0216】

特定の実施形態においては、本発明の BSHB H5 HA ポリペプチドは、H1 HA に特徴的なアミノ酸配列を有する。例えば、いくつかの実施形態においては、そのような H3 様の BSHB H5 HA は、置換 Glu 190 Asp、Lys 193 Ser、Gln 226 Leu、および Gly 228 Ser を含む。

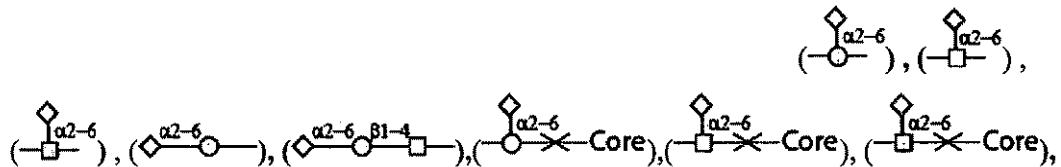
#### 【0217】

いくつかの実施形態においては、本発明の BSHB H5 HA ポリペプチドは、野生型 H5 HA と比較して、1 つの開いた結合部位を有する。いくつかの実施形態においては、本発明の BSHB H5 HA ポリペプチドは、以下の 2 - 6 シアリル化グリカン

に結合する：

【0 2 1 8】

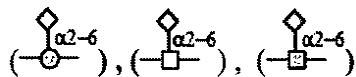
【化2】



およびそれらの組み合わせ。いくつかの実施形態においては、本発明の B S H B H 5 H A ポリペプチドは、構造：

【0 2 1 9】

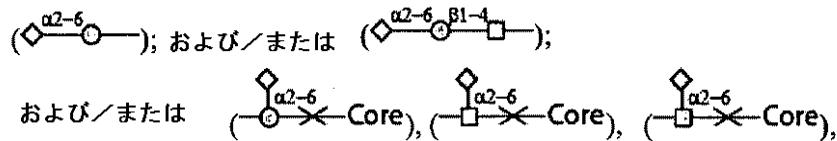
【化3】



およびそれらの組み合わせ；ならびに／あるいは、

【0 2 2 0】

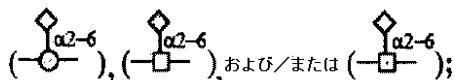
【化4】



およびそれらの組み合わせのグリカンに結合する。いくつかの実施形態においては、本発明の B S H B H 5 H A ポリペプチドは、

【0 2 2 1】

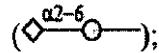
【化5】



に結合する；いくつかの実施形態においては、

【0 2 2 2】

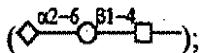
【化6】



に結合する；いくつかの実施形態においては、

【0 2 2 3】

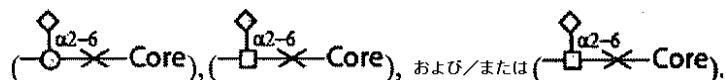
【化7】



に結合する；そしていくつかの実施形態においては

【0 2 2 4】

【化8】



に結合する。

【0 2 2 5】

いくつかの実施形態においては、本発明の B S H B H 5 H A ポリペプチドは、アンブレラトポロジーグリカンに結合する。いくつかの実施形態においては、本発明の B S H

B H 5 H A ポリペプチドは、図 9 に示されるグリカン（例えば、2 - 6 シアリル化グリカン）のうちの少なくともいくつかに結合する。いくつかの実施形態においては、本発明の B S H B H 5 H A ポリペプチドは図 9 に示される複数のグリカンに結合する。

#### 【 0 2 2 6 】

いくつかの実施形態においては、本発明の B S H B H 5 H A ポリペプチドは、ヒトの上気道組織（例えば、上皮細胞）の中の H A 受容体上に見られるグリカンのうちの少なくとも約 10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、またはそれ以上に結合する。

#### 【 0 2 2 7 】

##### （実施例 5 ）

###### ヒトの上気道組織の中でのグリカンの多様性

レクチン結合実験は、上気道組織の中の 2 - 3 と 2 - 6 の分布において多様性を示した。染色実験は、気道上皮の先端面上の N 結合グリカン（纖毛細胞）と O 結合グリカン（杯細胞の中）の両方の一部として、2 - 6 シアリル化グリカンの優勢な分布を示した（図 18）。一方、気道組織の内部領域には、主に、N 結合グリカン上に分配された 2 - 3 が含まれていた。長年にわたる疑問は、どの 2 - 6 シアリル化グリカン受容体がヒトの肺に存在するかどうかである。

#### 【 0 2 2 8 】

M A L D I - M S グリカンプロファイリング分析は、実質的な多様性（図 10）を示し、さらに、ヒトの上気道上での 2 - 6 シアリル化グリカンの優勢な発現を示した。有意なことは、M A L D I - T O F - T O F を使用した代表的な質量ピークのフラグメンテーションが、複数のラクトサミン反復を有しているより長いオリゴ糖分岐が、短いオリゴ糖分岐と比較して広範囲に分布しているグリカントポロジーをサポートすることである（図 10）。上気道の中でのグリカンの分布とトポロジーにおける多様性についての参照を提供するために、M A L D I - M S 分析を、ヒトの結腸上皮細胞（H T 2 9）に由来する N 結合グリカンについて行った。現在の H 5 N 1 ウイルスは主に腸に感染することが公知であり、したがってこれらの細胞を代表的な腸細胞として選択した。H T 2 9 細胞のグリカンプロフィールは H B E のグリカンプロフィールとは有意に異なり、ここで、2 - 3 の優勢な分布が存在し、そして長いオリゴ糖分岐のグリカントポロジーは観察されたとおりではなかった（図 10）。

#### 【 0 2 2 9 】

図 18 のデータは、以下の方法にしたがって作成した。ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋したヒトの気管組織切片は、U S B i o l o g i c a l から購入した。組織切片についてパラフィン除去を行い、再水和させ、内因性のビオチンをストレプトアビジン / ビオチンプロッキングキット（Vector L a b s）を使用してプロックした。その後、切片を、F I T C で標識した J a c a l i n（O 結合グリカンに特異的）、ビオチニル化コンカナバリン A（C o n A、N 結合グリカンを構成するコアオリゴ糖構造の一部である 結合マンノース残基に特異的）、ビオチニル化されたイヌエンジエ（M a a c k i a a m u r e n s i s）のレクチン（M A L、S A 2, 3 - g a l に特異的）、およびビオチニル化されたセイヨウニワトコ（S a m b u c c u s n i g r a）のアグルチニン（S N A、S A 2, 6 - g a l に特異的）（Vector l a b s；0.5 % の T w e e n - 2 0 を含む P B S 中に 10 μ g / m l）とともに 3 時間インキュベートした。T B S T（1 % の T w e e n - 2 0 を含む T r i s 緩衝化生理食塩水）での洗浄の後、切片を、A l e x a f l u o r 5 4 6 ストレプトアビジン（0.5 % の T w e e n - 2 0 を含む P B S 中に 2 μ g / m l）とともに 1 時間インキュベートした。スライドを T B S T で洗浄し、共焦点顕微鏡（Z e i s s L S M 5 1 0 レーザースキャン共焦点顕微鏡）下で観察した。全てのインキュベーションは室温（R T）で行った。

#### 【 0 2 3 0 】

図 10 のデータは、以下の方法を使用して作成した。細胞（約 7 0 × 1 0<sup>6</sup>）を、それ

らが 100 mM のクエン酸塩生理食塩を用いて > 90 % のコンフルエントになった時点で回収し、細胞膜をプロテアーゼ阻害剤 (Calbiochem) での処理とホモジナイザーションの後に単離した。細胞膜画分を PNGase F (New England Biolabs) で処理し、反応混合物を 37 °C で一晩インキュベートした。反応混合物を 10 分間沸騰させて酵素を失活させ、脱グリコシル化されたペプチドとタンパク質を Sep-Pak C18 SPE カートリッジ (Waters) を使用して取り出した。グリカンをさらに脱塩し、黒鉛化炭素固相抽出カラム (Supelco) を使用して、中性の画分 (25 % アセトニトリルの画分) と酸性画分 (0.05 % のトリフルオロ酢酸を含む 50 % アセトニトリルの画分) に精製した。酸性画分を、ソフトイオン化条件 (加速電圧 22 kV、格子電圧 93 %、ガイドワイヤ 0.3 %、および 150 ns の抽出遅延時間) を用いて、それぞれポジティブモードとネガティブモードで MALDI-TOF MS によって分析した。ピークを固化していない種として較正した。2-6 シアリル化グリカンの優勢な発現が、シアリダーゼ A および S を使用した試料の事前の処理によって確認された。単離されたグリカンを、その後、最終容量 100 mL の 50 mM のリン酸ナトリウム (pH 6.0) の中の 0.1 U の *Arthrobacter ureafaciens* のシアリダーゼ (シアリダーゼ A、非特異的) または肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) のシアリダーゼ (シアリダーゼ S、2-3 シアリル化グリカンに特異的) とともに、37 °C で 24 時間インキュベートした。中性画分と酸性画分を、それぞれ、ポジティブモードとネガティブモードで MALDI-TOF MS によって分析した。

### 【0231】

#### (実施例 6)

ヒトの肺組織に対する H1 HA および H3 HA の用量応答結合

気管組織の アピカル側 は、長い分岐トポロジーを有している 2-6 グリカンを主に発現する。一方、肺胞組織は 2-3 グリカンを主に発現する。H1 HA は、気管の アピカル面 に対して有意に結合し、その結合は、40 から 10 µg / mL までの稀釀にともなって徐々

に減少する (図 19)。H1 HA はまた、最も高い濃度でのみ、肺胞組織に対していくらかの弱い結合を示す。H3 HA の結合パターンは、H3 HA が、40 および 20 µg / mL で気管と肺胞の組織切片の両方に対して有意な結合を示すという点で、H1 HA とは異なる (図 19)。しかし、10 µg / mL の濃度では、H3 HA は、主に気管組織の アピカル側 に対する結合を示し、肺胞組織に対しては結合をほとんどから全く示さない。まとめると、組織結合データは、1) 気管組織の アピカル側 に対する H1 HA および H3 HA の高親和性での結合、ならびに、2) H3 HA は 2-3 に対する親和性 (2-6 よりも相対的に低い) を示すが、H1 HA は 2-6 に対して特異性が高いことを指摘している。

### 【0232】

図 19 のデータは、以下の方法を使用して作成した。ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋したヒトの組織肺と気管の切片は、それぞれ、U.S. Biomax, Inc から、そして U.S. Biologics から購入した。組織切片についてパラフィン除去を行い、再水和させ、非特異的結合を防ぐために、PBS 中の 1 % の BSA とともに 30 分間インキュベートした。H1N1 HA および H3N2 HA を一次抗体 (マウス抗 6 × His タグ、Abcam)、および二次抗体 (Alexa fluor 488 ヤギ抗マウス、Invitrogen) と、それぞれ 4 : 2 : 1 の割合で、氷上で 20 分間かけて予め複合体化させた。形成した複合体を 40、20、または 10 µg / mL の最終 HA 濃度になるように、1 % の BSA - PBS の中に希釀した。その後、組織切片を、HA 抗体複合体とともに、RT で 3 時間インキュベートした。切片をヨウ化プロピジウム (Invitrogen; TBS-T 中の 1 : 100) で対比染色し、十分に洗浄し、その後、共焦点顕微鏡 (Zeiss LSM 510 レーザースキャン共焦点顕微鏡) 下で観察した。

### 【0233】

## (実施例 7 )

## 様々なトポロジーのグリカンに対する野生型 H A ポリペプチドの用量応答直接結合

本明細書中に記載したように、本発明には、本明細書中で「アンブレラ」トポロジーと呼ばれる特定のトポロジーを有しているグリカンに対する H A ポリペプチドによる結合が、ヒト宿主の感染を媒介する H A ポリペプチドの能力と相関関係があることの認識が含まれる。本実施例には、様々な宿主の感染を媒介する様々な H A ポリペプチドを用いた直接結合実験の結果を記載し、ヒトの感染とアンブレラグリカンへの結合との間の相関関係を説明する。

## 【 0 2 3 4 】

直接結合アッセイでは、通常は、定義されたグリカン構造（例えば、1価または多価）が、多くの場合にはポリマー骨格を使用して支持体（例えば、硝子スライドまたはウェルプレート）上に提示されるグリカンアレイを利用する。いわゆる「連続」アッセイにおいては、三量体 H A ポリペプチドがアレイに結合させられ、その後、例えば、標識された（例えば、FITC または西洋ワサビペルオキシダーゼで標識された）一次および二次抗体を使用して検出される。「多価」アッセイにおいては、三量体 H A が、最初に、一次抗体および二次抗体（通常は、4 : 2 : 1 の H A : 一次抗体 : 二次抗体の割合で）と複合体を形成させられ、その結果、1つの予め複合体化させられた H A あたり 12 のグリカン結合部位が存在し、その後、これがアレイと接触させられる。結合アッセイは、通常は、 H A 濃度の範囲全体にわたって行われ、その結果、アレイの中の様々なグリカンについての相対的な親和性に関する情報が得られる。

## 【 0 2 3 5 】

例えば、直接結合実験を、3'SLN、6'SLN、3'SLN-LN、6'SLN-LN、および3'SLN-LN-LN のような様々なグリカンを有しているアレイを用いて行った。ここで、LN は Gal 1-4 GlcNAc を示し、3' は Neu5Ac 2-3 を示し、そして 6' は Neu5Ac 2-6 を示す。具体的には、ビオチニル化されたグリカン (50 μl の 120 pmol / ml) を、事前に PBS で 3 回リinzした、ストレプトアビシンでコーティングした High Binding Capacity 384-ウェルプレートとともに一晩 (PBS 中、4) インキュベートした。その後、プレートを PBS で 3 回洗浄して過剰なグリカンを除去し、さらに処理することなく使用した。

## 【 0 2 3 6 】

適切な量の His タグ化 H A タンパク質、一次抗体（マウス抗 6 × His タグ）、および二次抗体（HRP 結合ヤギ抗マウス IgG）を、4 : 2 : 1 の H A : 一次抗体 : 二次抗体の割合で、氷上で 15 分間インキュベートした。その後、混合物（すなわち、事前に複合体を形成させた H A ）を、PBS 中の 1 % の BSA で 250 μl の最終容量とした。50 μl の事前に複合体を形成させた H A を、次いで、384 ウェルプレートの中のグリカンでコーティングしたウェルに添加し、これを室温で 2 時間インキュベートした。続いて、ウェルを、0.05 % の Tween-20 を含む PBS で 3 回洗浄し、その後、PBS で 3 回洗浄した。HRP 活性を、製造業者の説明書にしたがって Amplex Red Peroxidase Kit (Invitrogen, CA) を使用して評価した。 H A プレ複合体の段階稀釀物について実験を行った。適切なネガティブ（非シアリル化グリカン）対照とバックグラウンド（グリカンを含まない、または H A を含まない）対照を含め、全てのアッセイを 3 連で行った。結果を図 20 に示す。

## 【 0 2 3 7 】

既知のヒトに適応した H1 H A および H3 H A の結合パターンの 1 つの特徴は、40 μg / ml から 5 μg / ml まで減少する稀釀範囲全体にわたる、長い 2-6 (6'SLN-LN) に対する飽和レベルでのそれらの結合である（図 20）。H1 H A は、長い 2-6 に対する結合について特異性が高いが、H3 H A はまた、短い 2-6 (6'SLN) に対しても高い親和性で、そして長い 2-3 に対しては、2-6 と比較してより低い親和性で結合する（図 20）。H1 H A および H3 H A の直接的な結合

の用量応答は、組織結合パターンと一致する。さらに、長い 2 - 6 に対する H 1 H A および H 3 H A の高親和性の結合は、長い分岐トポロジーを有している 2 - 6 グリカンを発現する気管組織の先端面に対するそれらの広範囲の結合と相関関係がある。この相関関係により、ヒトに適応した H 1 H A および H 3 H A の上気道組織向性についての有用な知見が得られた。一方、試験した H 5 H A は、これが、2 - 6 に対するその比較的低い親和性（有意なシグナルは、20 ~ 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  でしか見られない）と比較して、2 - 3 に対して高い親和性（40 から 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に低下するまでの飽和シグナル）で結合するという、反対のグリカン結合傾向を示した（図 20）。

【 0 2 3 8 】

## 等価物

当業者は、本明細書中に記載された本発明の特異的な実施形態についての多くの等価物を、日常的に行われる実験以上の実験を使用することなく、理解するか、または確認できるであろう。本発明の範囲は、上記の記載に限定されるようには意図されるのではなく、以下の特許請求の範囲に示されるとおりである。

## 【誤訳訂正2】

## 【訂正対象書類名】特許請求の範囲

### 【訂正対象項目名】全文

## 【訂正方法】変更

### 【訂正の内容】

## 【特許請求の範囲】

### 【請求項1】

アンプレラトポロジーグリカンと HA ポリペプチドとの間でのグリカン - HA ポリペプチド相互作用と競合する薬剤を含む、薬学的組成物。

## 【請求項2】

前記 H A ポリペプチドがウイルス粒子の表面にある、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

### 【請求項3】

前記 H A ポリペプチドのうちの前記相互作用に関する残基が、残基 1 3 7、1 4 5、1 5 6、1 5 9、1 8 6、1 8 7、1 8 9、1 9 0、1 9 2、1 9 3、1 9 6、2 2 2、2 2 5、2 2 6、2 2 8 およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるものを含む、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

#### 【請求項4】

前記アンブレラトポロジーグリカンが、長い 2 - 6 シアリル化グリカンを含む、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

## 【請求項 5】

、Neu5Ac 2-6Gal 1-3GalNAc 1-4Gal 1-3Gal 1  
 -4Galc、Neu5Ac 2-6Gal 1-3GalNAc 1-3Gal 1-4  
 Gal 1-4Galc、Neu5Ac 2-6Gal 1-3GalcNAc 1-3Ga  
 1 1-4Galc およびNeu5Ac 2-6Gal 1-4GalcNAc 1-3Ga  
 1 1-4Galc からなる群より選択される、請求項4に記載の薬学的組成物。

## 【請求項6】

前記薬剤がグリカン、低分子および糖模倣物からなる群より選択される、請求項1に記載の薬学的組成物。

## 【請求項7】

前記薬剤がポリペプチドである、請求項1に記載の薬学的組成物。

## 【請求項8】

前記薬剤がHAポリペプチドである、請求項7に記載の薬学的組成物。

## 【請求項9】

前記薬剤が、HAポリペプチド変異体である、請求項7に記載の薬学的組成物。

## 【請求項10】

前記薬剤が、アンブレラトポロジーグリカンに対して、ヒトの感染を媒介する野生型HAについて匹敵する条件下で観察される親和性の少なくとも25%、少なくとも50%、または少なくとも75%の親和性で結合する、請求項1に記載の薬学的組成物。

## 【請求項11】

前記薬剤が、アンブレラトポロジーグリカンに対して、それらがコートポロジーグリカンに対して結合するよりも強く結合する、請求項1に記載の薬学的組成物。

## 【請求項12】

前記薬剤が、アンブレラトポロジーグリカン対コートポロジーグリカンについて少なくとも10、少なくとも9、少なくとも8、少なくとも7、少なくとも6、少なくとも5、少なくとも4、少なくとも3または少なくとも2の相対的親和性を示す、請求項11に記載の薬学的組成物。

## 【請求項13】

前記相互作用が、前記HAポリペプチドとヒトの上気道上皮細胞、気管支および/または気管、および/または肺深部上に見られる受容体との間で起こる、請求項1に記載の薬学的組成物。

## 【請求項14】

グリカン-HAポリペプチド相互作用と競合する薬剤を同定する方法であって、該方法は：

試験薬剤のコレクションを提供する工程；

該試験薬剤を少なくとも1つのアンブレラトポロジーグリカンおよび該アンブレラトポロジーグリカンに結合する少なくとも1つのHAポリペプチドと接触させる工程；ならびに

該薬剤が存在しない場合と比較して、該薬剤が存在する場合に、該少なくとも1つのアンブレラトポロジーグリカンと該少なくとも1つのHAポリペプチドとの間で観察された結合が減少することを決定する工程

による、方法。

## 【請求項15】

アンブレラトポロジーグリカンについて高親和性を有する薬剤を同定する方法であって：

試験薬剤のコレクションを提供する工程；

該試験薬剤を少なくとも1つのアンブレラトポロジーグリカンと接触させる工程；および

該少なくとも1つのアンブレラトポロジーグリカンと該試験薬物との間の観察される結合が高親和性で起こることを決定する工程による、方法。

### 【請求項 1 6】

前記 H A ポリペプチドのうちの前記相互作用に関する残基が、残基 1 3 7、1 4 5、1 5 6、1 5 9、1 8 6、1 8 7、1 8 9、1 9 0、1 9 2、1 9 3、1 9 6、2 2 2、2 2 5、2 2 6 および 2 2 8、ならびにそれらの組み合わせからなる群より選択される残基を含む、請求項 1 4 に記載の方法。

## 【請求項17】

前記アンブレラトポロジーグリカンが、長い 2 - 6 シアリル化グリカンを含む、請求項 14 または 15 に記載の方法。

## 【請求項18】

前記長い 2 - 6 シアリル化グリカンが、Neu5Ac 2 - 6 Gal 1 - 4 Glc  
 NAc 1 - 3 Gal 1 - 4 GlcNAc、Neu5Ac 2 - 6 GalNAc 1 -  
 4 GlcNAc 1 - 3 GalNAc 1 - 4 GlcNAc、Neu5Ac 2 - 6 Ga  
 l 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 GalNAc、Neu5Ac 2 - 6 G  
 al 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 3  
 GalNAc、Neu5Ac 2 - 6 GalNAc 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 Gal  
 1 - 4 GalNAc、Neu5Ac 2 - 6 GalNAc 1 - 4 GlcNAc 1 -  
 3 GalNAc 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 3 GalNAc、NeuAc  
 2 - 3 Gal 1 - 3 GalNAc 2 - 6 Neu5Ac、Neu5Ac 2 - 6 Ga  
 l 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 / 6 GalNAc、Neu5Ac 2 - 6 Gal 1 -  
 4 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 / 6 GalNAc、Neu  
 5Ac 2 - 6 GalNAc 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 / 6 GalNAc、Neu5  
 Ac 2 - 6 GalNAc 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 GalNAc 1 - 4 Glc  
 NAc 1 - 3 / 6 GalNAc、NeuAc 2 - 6 Gal 1 - 4 GalNAc 1 -  
 6 GlcNAc 1 - 3 Gal 2 - 3 Neu5Ac、NeuAc 2 - 6 Gal 1 -  
 4 GalNAc 1 - 3 / 6 GlcNAc 1 - 3 / 6 Gal 2 - 3 / 6 Neu5Ac  
 、Neu5Ac 2 - 6 Gal 1 - 3 GalNAc 1 - 4 Gal 1 - 3 Gal 1 -  
 4 Glc、Neu5Ac 2 - 6 Gal 1 - 3 GalNAc 1 - 3 Gal 1 - 4  
 Gal 1 - 4 Glc、Neu5Ac 2 - 6 Gal 1 - 3 GlcNAc 1 - 3 Ga  
 l 1 - 4 Glc および Neu5Ac 2 - 6 Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 Ga  
 l 1 - 4 Glc からなる群より選択される。請求項 17 に記載の方法。

## 【請求項 19】

前記試験薬剤が、グリカン、低分子および糖模倣物からなる群より選択される、請求項  
14 または 15 に記載の方法。

## 【請求項 20】

前記試験薬剤がポリペプチドである、請求項14または15に記載の方法。

## 【請求項 21】

前記試験薬剤が H A ポリペプチドである、請求項 1 4 または 1 5 に記載の方法。

## 【請求項 22】

前記試験薬剤が H A ポリペプチド変異体である、請求項 1 4 または 1 5 に記載の方法。

### 【請求項 2 3】

前記試験薬剤がアンブレラトポロジーグリカンに対して、ヒトの感染を媒介する野生型 H A について匹敵する条件下で観察される親和性の少なくとも 25%、少なくとも 50%、または少なくとも 75% の親和性で結合する、請求項 14 または 15 に記載の方法。

## 【請求項24】

前記試験薬剤が、アンブレラトポロジーグリカンに対して、それらがコートトポロジーグリカンに対して結合するよりも強く結合する、請求項 14 または 15 に記載の方法。

## 【請求項 25】

前記試験薬剤が、アンブレラトポロジーグリカン対コートポロジーグリカンについて少なくとも 10、少なくとも 9、少なくとも 8、少なくとも 7、少なくとも 6、少なくとも 5、少なくとも 4、少なくとも 3 または少なくとも 2 の相対的親和性を示す 請求項 1

4 または 15 に記載の方法。

【請求項 26】

試料中の HA ポリペプチドを検出する方法であって、ここで該 HA ポリペプチドは、アンブレラトポロジーグリカンに結合する、方法。

【請求項 27】

前記試料は、病理学的試料である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記病理学的試料は、血液、血清／血漿、末梢血単核細胞／末梢血リンパ球 (PBM C / PBL) 、痰、尿、糞便、咽頭スワブ、皮膚病変のスワブ、脳脊髄液、頸管スミア、臓試料、フードマトリックス、ならびに、脳、脾臓、および肝臓に由来する組織、ならびにそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記試料は環境試料である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 30】

前記環境試料は、土壤、水、および微生物叢からなる群より選択される、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記試料は、研究室試料である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 32】

前記研究室試料は、研究者によって設計および／または調製された、操作された HA ポリペプチドを含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記アンブレラトポロジーグリカンが長い 2 - 6 シアリル化グリカンを含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 34】

アンブレラトポロジーグリカンに対して高親和性を有する試験薬剤を評価する方法であって、

アンブレラトポロジーグリカンを有する HA に対する該薬剤の結合能力を決定し、それによって該薬剤を評価する工程を包含する、方法。

【請求項 35】

アンブレラトポロジーグリカンに対して高親和性を有する薬剤を含むデバイスであって、薬剤の用量を被験体の気道に投与するように構成されている、デバイス。

【請求項 36】

ヒト上気道組織における HA 受容体に見られるグリカンのうちの少なくとも約 10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 % またはそれより高いグリカン構造を含むグリカンアレイ。

【請求項 37】

アンブレラトポロジーグリカンに結合する抗体。