(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2020-513418
(P2020-513418A)
(43)公表日　令和2年5月14日(2020.5.14)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 38/10	(2006.01)	A61K	38/10		4C037
C12N 15/63	(2006.01)	C12N	15/63	Z	4C056
C12N 15/11	(2006.01)	C12N	15/11	Z	4C057
A61K 38/16	(2006.01)	A61K	38/16		4C062
A61K 9/48	(2006.01)	A61K	9/48		4C063

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 59 頁）　最終頁に続く

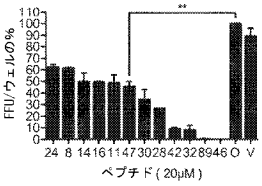
(21)出願番号　特願2019-551494 (P2019-551494)
(86)(22)出願日　平成29年12月1日 (2017.12.1)
(85)翻訳文提出日　令和1年8月6日 (2019.8.6)
(86)国際出願番号　PCT/US2017/064330
(87)国際公開番号　WO2018/111580
(87)国際公開日　平成30年6月21日 (2018.6.21)
(31)優先権主張番号　62/433,490
(32)優先日　平成28年12月13日 (2016.12.13)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)
(31)優先権主張番号　62/466,066
(32)優先日　平成29年3月2日 (2017.3.2)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(71)出願人　503124447
エモリー　ユニバーシティ
アメリカ合衆国　ジョージア州　アトランタ　ノース　イースト　クリフトン　ロード　１５９９　４階
(71)出願人　319015289
ラジーヴ　ガンディー　センター　フォー　バイオテクノロジー
インド　ピーアイエヌ　６９５０１４　ケーララ　ティルバナンタプーラム　シーコード　ピー．オー．
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100102118
弁理士　春名　雅夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ウイルス感染を管理するためのポリペプチド

(57)【要約】
抗ウイルスポリペプチドおよび使用方法を本明細書において提供する。特に、これらのポリペプチドは、Yodhaアミノ酸配列、その変異体、誘導体、または切断型を含みうる。一定の態様において、本開示は、ウイルス感染を処置または予防するための、本明細書に開示するペプチドおよび組成物の使用に関する。



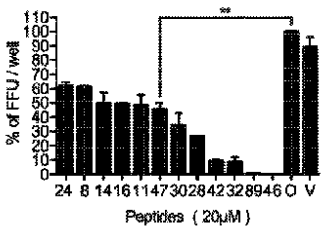


FIG. 1A

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ポリペプチドと薬学的に許容される担体とを含む組成物であって、
該ポリペプチドはアミノ酸配列
LFFX^{1}GTIX^{2}LX^{3}LC (SEQ ID NO: 78)
またはその変異体を含み、ここで、X^{1}は任意のアミノ酸であり、X^{2}は任意のアミノ酸であり、X^{3}は任意のアミノ酸である、
前記組成物。
【請求項２】
ポリペプチドがアミノ酸配列
SMLLLFFLGTISLSLCQDDQERC (SEQ ID NO: 1)
からなる、請求項0に記載の組成物。
【請求項３】
ポリペプチドがアミノ酸配列
SMLLLFFLGTISLSLCQ (SEQ ID NO:56),またはPMLLLFFLGTISLSLCQ (SEQ ID NO:57)
からなる、請求項0に記載の組成物。
【請求項４】
ポリペプチドがアミノ酸配列
LLFFLGTISLSLCQDDQERC (SEQ ID NO: 65)
からなる、請求項0に記載の組成物。
【請求項５】
ポリペプチドが1つまたは2つのアミノ酸置換を有する、請求項1に記載の組成物。
【請求項６】
別の抗ウイルス化合物をさらに含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項７】
カプセル剤、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、またはゲル剤の形態にある、請求項1～5のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８】
滅菌pH緩衝塩水溶液の形態にある、請求項1～5のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９】
ポリペプチドが、アミド化およびアセチル化からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸修飾を有する、請求項1～5のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１０】
その必要がある対象におけるウイルス感染を予防または処置するための方法であって、
LFFX^{1}GTIX^{2}LX^{3}LC (SEQ ID NO: 78)
を含むアミノ酸配列を含むポリペプチドの有効量を対象に投与する工程を含み、ここで、X^{1}は任意のアミノ酸であり、X^{2}は任意のアミノ酸であり、X^{3}は任意のアミノ酸である、
前記方法。
【請求項１１】
ウイルス感染がジカウイルスである、請求項10に記載の方法。
【請求項１２】
ウイルス感染がデングウイルスである、請求項10に記載の方法。
【請求項１３】
ウイルス感染がインフルエンザウイルスである、請求項10に記載の方法。
【請求項１４】
ウイルス感染がHIVウイルスである、請求項10に記載の方法。
【請求項１５】
LFFX^{1}GTIX^{2}LX^{3}LC (SEQ ID NO: 78)
を含むアミノ酸配列を含み、ここで、X^{1}は任意のアミノ酸であり、X^{2}は任意のアミノ酸であり、X^{3}は任意のアミノ酸である、ポリペプチド。

【請求項１６】
X^1がAである、請求項15に記載のポリペプチド。
【請求項１７】
X^3がAである、請求項15に記載のポリペプチド。
【請求項１８】
異種プロモーターと機能的に組み合わされた、請求項15に記載のポリペプチドをコードする核酸。
【請求項１９】
請求項18に記載の核酸を含むベクター。
【請求項２０】
請求項19に記載のベクターを含む発現システム。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本願は、2016年12月13日に出願された米国仮出願第62/433,490号および2017年3月2日に出願された米国仮出願第62/466,066号の恩典を主張する。これらの出願のそれぞれは、その全体が、あらゆる目的で、参照により本明細書に組み入れられる。
【０００２】
連邦政府の資金による研究に関する陳述
本発明は、米国国立衛生研究所によって交付されたR01AI100110、U19AI083019、およびR56AI110516の下に、米国政府の支援を受けてなされた。米国政府は本発明に一定の権利を有する。
【０００３】
米国特許商標庁電子出願制度（EFS-WEB）によってテキストファイルとして提出された資料の参照による組み入れ
本願に関連する配列表はハードコピーの代わりにテキスト形式で提供され、これによって、参照により本明細書に組み入れられる。配列表を含むテキストファイルの名称は17057PCT_ST25.txtである。このテキストファイルは23KBであり、2017年12月1日に作成され、EFS-Webにより電子的に提出されている。
【背景技術】
【０００４】
背景
ジカウイルス（ZIKV）はフラビウイルス科（Flaviviridae）に属する蚊媒介ウイルスであり、ウエストナイルウイルス（WNV）、デングウイルス（DENV）、および日本脳炎ウイルス（JEV）とは近縁である（Gould et al., Lancet 371, 500-509,（2008）（非特許文献1））。DENVと同様にZIKVは、感染したヤブカ属（Aedes sp.）の蚊の咬傷を介して伝播する（Dick et al. Trans R Soc Trop Med Hyg 46, 509-520（1952）（非特許文献2）、Shan et al. Cell Host&Microbe 19, 891-900,（2016）（非特許文献3））。しかし他のフラビウイルスとは異なり、ZIKVは、感染した母親から発生中の子宮内胎児へと垂直感染して、先天性ジカ症候群をもたらしうる。先天性ジカ症候群は、自然流産、胎児脳異常、および小頭症を特徴とする（Adams Waldorf et al. Nat Med 22, 1256-1259,（2016）（非特許文献4）、Tabata et al. Cell Host Microbe 20, 155-166,（2016）（非特許文献5）、Besnard et al. French Polynesia, Euro Surveill 19（2014）（非特許文献6）、Mysorekar et al. N Engl J Med 375, 481-484,（2016）（非特許文献7）、Schuler-Faccini et al. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 65, 59-62,（2016）（非特許文献8））。成人の場合、ZIKVは、免疫系が神経系を攻撃する障害であるギラン・バレー症候群にも関連づけられている。最近になって、ZIKVのブラジル株は実験的マウスモデルにおいて出生時欠損を引き起こすことが示された（Lazear et al. Cell Host Microbe 19, 720-730,（2016）（非特許文献9））。このマウスモデルを使用して、感受性マウスにおいてZIKVチャレンジ

に対する完全な防御を与えるワクチンが開発された（Stettler et al. Science 353, 823-826,（2016）（非特許文献10））。しかしこのワクチンは、DENV感染で観察されるものと同様に感染感受性を増加させる抗体依存的強化を促進するかもしれないという懸念がある（Dejnirattisai et al. Nat Immunol 17, 1102-1108,（2016）（非特許文献11））。ZIKV感染と戦うための戦略としては、感染を処置または予防するための抗ウイルス治療薬を開発することが考えられるだろう。

【０００５】

デングウイルス（DENV）は、ヒトに感染する最も一般的な節足動物媒介ウイルス病原体である。これらの蚊伝染性ウイルスは大半の熱帯国および亜熱帯国に特有であって、世界人口の半分近くがDENV感染の危険にさらされて暮らしており、推定で年間100万例を上回る感染をもたらしている（Mackenzie et al. Nat Med 10, S98-109,（2004）（非特許文献12））。DENVによる感染は、不顕性ないし自然治癒性のインフルエンザ様疾患であるデング熱（DF）から、血漿漏出をもたらす血管透過性の増加、重篤な血小板減少症、および循環虚脱につながる低血圧を特徴とする、より重篤な命に関わるデング出血熱およびデングショック症候群（DHF/DSS）まで、幅広い症状を引き起こしうる（Gubler, Novartis Found Symp 277, 3-16,（2006）（非特許文献13））。DENVの有病率、感染率、および疾患重症度は、前世紀半ば以降、指数関数的に増加している（Guzman et al. Nat Rev Microbiol 8, S7-S16,（2010）（非特許文献14））。数十年にわたる関心、必要性、および努力にもかかわらず、今も利用可能なデングワクチンはなく、ワクチン候補は、前臨床開発でも臨床治験でも、進路を妨げる障害および安全性への懸念にぶつかり続けている。

【０００６】

インフルエンザは、経済的負担、罹病、そしてさらには死亡をもたらすので、公衆衛生上の関心事である。インフルエンザ感染は、不顕性感染から、軽度の上気道炎および気管気管支炎、さらには重度の、時には致死的な、ウイルス性肺炎まで、さまざまな疾患状態をもたらしうる。この重症度の幅広さの理由は、感染の部位および宿主の免疫状態によって説明される。インフルエンザの最も重要な特徴は、免疫学的観点からは、抗原シフトおよび抗原ドリフトと呼ばれる表面糖タンパク質ヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼの迅速で予測不可能な変化である。これらの変化は、最終的には新しいインフルエンザ株の出現につながって、ウイルスが免疫系を回避することを可能にし、ほぼ毎年流行する原因となる（Laver et al., Nature 283, 454-457（1980）（非特許文献15）、Laver et al., Philosophical Trans. Royal Soc. B, 288（1029）, 313-326,（1980）（非特許文献16））。インフルエンザウイルスに対する免疫処置は、ウイルスのこの顕著な抗原変異と、呼吸粘膜への感染の限定とによる制限を受ける。現在利用可能な認可済みのインフルエンザワクチンは、不活化全粒子ウイルスに基づくか、ウイルス表面糖タンパク質に基づいている。これらのインフルエンザワクチンは、株をまたいだ（cross-strain）完全な長期免疫を誘導することはできない。

【０００７】

このように、ウイルス病原体を防御するための改善された組成物および方法が必要とされている。本明細書に記載する組成物および方法は、これらの必要性および他の必要性に対処する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００８】

【非特許文献１】Gould et al., Lancet 371, 500-509,（2008）
【非特許文献２】Dick et al. Trans R Soc Trop Med Hyg 46, 509-520（1952）
【非特許文献３】Shan et al. Cell Host＆Microbe 19, 891-900,（2016）
【非特許文献４】Adams Waldorf et al. Nat Med 22, 1256-1259,（2016）
【非特許文献５】Tabata et al. Cell Host Microbe 20, 155-166,（2016）
【非特許文献６】Besnard et al. French Polynesia, Euro Surveill 19（2014）
【非特許文献７】Mysorekar et al. N Engl J Med 375, 481-484,（2016）

【非特許文献８】Schuler-Faccini et al. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 65, 59-62, (2016)
【非特許文献９】Lazear et al. Cell Host Microbe 19, 720-730, (2016)
【非特許文献１０】Stettler et al. Science 353, 823-826, (2016)
【非特許文献１１】Dejnirattisai et al. Nat Immunol 17, 1102-1108, (2016)
【非特許文献１２】Mackenzie et al. Nat Med 10, S98-109, (2004)
【非特許文献１３】Gubler, Novartis Found Symp 277, 3-16, (2006)
【非特許文献１４】Guzman et al. Nat Rev Microbiol 8, S7-S16, (2010)
【非特許文献１５】Laver et al., Nature 283, 454-457 (1980)
【非特許文献１６】Laver et al., Philosophical Trans. Royal Soc. B, 288 (1029), 313-326, (1980)

【発明の概要】

【０００９】

概要

本明細書において態様として広範に説明する本開示の材料、化合物、組成物、キット、および方法の目的によれば、本開示の主題は、化合物、組成物、これら化合物および/または組成物の作製方法、ならびにこれら化合物および/または組成物の使用方法に関する。

【００１０】

より具体的に述べると、本明細書には、抗ウイルス活性を有するポリペプチド、その変異体、誘導体を含む単離されたペプチドおよび組成物が開示される。いくつかの態様において、ポリペプチドは、本明細書に開示するアミノ酸配列、例えばSEQ ID NO:1～58およびSEQ ID NO:59～77から選択されるもの、例えばSEQ ID NO:1、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、およびSEQ ID NO:65からなる群より選択されるペプチドに対して、少なくとも60％の同一性を含むかまたはそれからなるアミノ酸配列を含む。例えば組成物は、アミノ酸配列SEQ ID NO:1を有するポリペプチド、またはSEQ ID NO:1に対して少なくとも60％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそれからなることができる。別の実施例において、組成物は、アミノ酸配列SEQ ID NO:36を有するポリペプチド、またはSEQ ID NO:36に対して少なくとも60％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそれからなることができる。さらに別の実施例において、組成物は、アミノ酸配列SEQ ID NO:56を有するポリペプチド、またはSEQ ID NO:56に対して少なくとも80％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそれからなることができる。さらなる実施例において、組成物は、アミノ酸配列SEQ ID NO:57を有するポリペプチド、またはSEQ ID NO:57に対して少なくとも80％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそれからなることができる。さらなる実施例において、組成物は、アミノ酸配列SEQ ID NO:58を有するポリペプチド、またはSEQ ID NO:58に対して少なくとも60％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそれからなることができる。さらなる実施例において、組成物は、アミノ酸配列SEQ ID NO:65を有するポリペプチド、またはSEQ ID NO:65に対して少なくとも60％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそれからなることができる。いくつかの態様において、組成物中のポリペプチドは、アミド化またはアセチル化などの修飾を少なくとも1つ含むことができる。

【００１１】

いくつかの態様において、ポリペプチドは、本明細書に開示するアミノ酸配列、例えばSEQ ID NO:1～58または59～77からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも60％の同一性を含むかまたはそれからなるアミノ酸配列、あるいは

$LFFX^1GTIX^2LX^3LC$ (SEQ ID NO: 78)

を有するアミノ酸配列を含み、ここで、X^1は任意のアミノ酸であり、X^2は任意のアミノ酸であるか、SまたはNであり、X^3は任意のアミノ酸であり、一定の態様では、X^1はL、A、任

意のアミノ酸、またはL以外の任意のアミノ酸であり、X^3はS、A、任意のアミノ酸、またはS以外の任意のアミノ酸である。一定の態様において、ポリペプチドは、18、20、22、25、27、30、35、または40アミノ酸以下である。

【００１２】

いくつかの態様において、ポリペプチドは、本明細書に開示するアミノ酸配列、例えばSEQ ID NO:1～58または59～77からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも60％の同一性を含むかまたはそれからなるアミノ酸配列、あるいは

$LFFX^1GTIX^2LX^3LCX^4DD$ (SEQ ID NO: 79)

を有するアミノ酸配列を含み、ここで、X^1は任意のアミノ酸であり、X^2は任意のアミノ酸であり、X^3は任意のアミノ酸であり、X^4は任意のアミノ酸である。一定の態様において、X^1はL、A、任意のアミノ酸、またはL以外の任意のアミノ酸であり、X^2はSまたはNであり、X^3はS、A、任意のアミノ酸、またはS以外の任意のアミノ酸であり、X^4はQ、E、A、または任意のアミノ酸である。一定の態様において、ポリペプチドは、18、20、22、25、27、30、35、または40アミノ酸以下である。

【００１３】

いくつかの態様において、ポリペプチドは、本明細書に開示するアミノ酸配列、例えばSEQ ID NO:1～58または59～77からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも60％の同一性を含むかまたはそれからなるアミノ酸配列、あるいは

$LFFX^1GTIX^2LX^3LCX^4DDQERC$ (SEQ ID NO: 80)

を有するアミノ酸配列を含み、ここで、X^1は任意のアミノ酸であり、X^2は任意のアミノ酸であり、X^3は任意のアミノ酸であり、X^4は任意のアミノ酸である。一定の態様において、X^1はL、A、任意のアミノ酸、またはL以外の任意のアミノ酸であり、X^2はSまたはNであり、X^3はS、A、任意のアミノ酸、またはS以外の任意のアミノ酸であり、X^4はQ、E、A、または任意のアミノ酸である。一定の態様において、ポリペプチドは、18、20、22、25、27、30、35、または40アミノ酸以下である。

【００１４】

いくつかの態様において、本開示は、本明細書に開示するアミノ酸配列に対して少なくとも60％の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、またはその誘導体もしくはプロドラッグと、薬学的に許容される担体とを含む組成物に関する。

【００１５】

一定の態様において、本開示は、本明細書に開示するペプチドをコードする核酸を含む組換えベクターに関する。一定の態様において、本開示は、本明細書に開示するペプチドをコードする核酸を含む組換えベクターを含む発現システムに関する。一定の態様において、本開示は、本明細書に開示するペプチドをコードする核酸を含む組換えベクターを含む細胞に関する。一定の態様において、本開示は、本明細書に開示するペプチドをコードする核酸と異種核酸配列とを含むベクターに関する。一定の態様において、本開示は、異種プロモーター配列と機能的に組み合わされた本明細書に開示するペプチドをコードする核酸を含むベクターに関する。

【００１６】

一定の態様において、本開示は、本明細書に開示するポリペプチドをコードする核酸であって、天然の配列と比較して非天然の置換および/または修飾を少なくとも1つ含有するようにヌクレオチド配列が改変されている核酸、例えば1つまたは複数のヌクレオチドが天然配列と比較して改変されている核酸に関する。一定の態様において、本開示は、標識をさらに含む、本明細書に開示するポリペプチドをコードする核酸に関する。一定の態様において、核酸は、異種プロモーターと機能的に組み合わされた本明細書に開示するペプチドをコードする配列を含む。

【００１７】

一定の態様において、本開示は、本明細書に開示するペプチドと薬学的に許容される賦形剤とを含む薬学的組成物に関する。一定の態様において、薬学的組成物は、カプセル剤、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、またはゲル剤の形態にある。一定の態様において、薬学的

組成物は、滅菌pH緩衝塩類水溶液の形態にあるか、液状物を噴霧するように構成された容器の形態にあるか、噴射剤を含むシール容器の形態にある。一定の態様において、本開示では、ウイルス感染を処置または予防するのに有用な本明細書に開示する医薬の調製が考えられる。一定の態様において、薬学的組成物は、腸溶コーティングで取り囲まれた固形物の形態にある。一定の態様において、薬学的組成物は、可溶化剤である薬学的に許容される賦形剤を含有する。

【００１８】

組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含むことができる。いくつかの態様において、組成物はワクチンの形態にあることができる。ワクチンは、薬学的に許容されるアジュバントをさらに含むことができる。

【００１９】

組成物を使用する方法も本明細書に開示される。組成物は、インフルエンザ感染、HIV感染、ジカ感染、またはデング感染などのウイルス感染を予防または処置するために使用することができる。本明細書に開示する方法は、本明細書に記載するポリペプチドを含む組成物を対象に投与する工程を含みうる。いくつかの態様において、本方法は、少なくとも1つのさらなる抗ウイルス化合物を対象に投与する工程をさらに含みうる。

【００２０】

一定の態様において、この開示は、ウイルス感染の予防または処置を必要とする対象においてウイルス感染を予防または処置するための方法であって、有効量の本明細書に開示するポリペプチド、その誘導体またはプロドラッグを対象に投与する工程を含む方法に関する。一定の態様において、ウイルス感染はジカウイルスである。一定の態様において、ウイルス感染はデングウイルスである。一定の態様において、ウイルス感染はインフルエンザウイルスである。一定の態様において、ウイルス感染はヒト免疫不全ウイルス（HIV）、レンチウイルス、またはレトロウイルスである。

【００２１】

一定の態様において、ポリペプチドは、ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、融合または細胞侵入阻害剤、インテグラーゼ阻害剤、CYP3A阻害剤、またはそれらの組合せと組み合わせて投与される。

【００２２】

一定の態様において、組合せは、以下の組合せから選択される:アバカビルおよびラミブジン;アバカビル、ドルテグラビルおよびラミブジン;アバカビル、ラミブジンおよびジドブジン;アタザナビルおよびコビシスタット;ダルナビルおよびコビシスタット;ドルテグラビルおよびリルピビリン;エファビレンツ、エムトリシタビンおよびテノホビルジソプロキシルフマル酸塩;エルビテグラビル、コビシスタット、エムトリシタビンおよびテノホビルアラフェナミドフマル酸塩;エルビテグラビル、コビシスタット、エムトリシタビンおよびテノホビルジソプロキシルフマル酸塩;エムトリシタビン、リルピビリンおよびテノホビルアラフェナミド;エムトリシタビン、リルピビリンおよびテノホビルジソプロキシルフマル酸塩;エムトリシタビンおよびテノホビルアラフェナミド;エムトリシタビンおよびテノホビルジソプロキシルフマル酸塩;ラミブジンおよびジドブジン;ならびにロピナビルおよびリトナビル。

【００２３】

一定の態様において、この開示は、ウイルス感染の処置または予防に使用するための、本明細書に開示するペプチド、変異体、および誘導体を含む医薬ならびにそれを含む組成物の生産に関する。

【００２４】

さらなる利点は、一部は以下の説明に示され、一部は説明から自明であるか、後述する局面の実施によって理解されうる。後述する利点は、特に添付の特許請求の範囲に示した要素および組合せを使って、実現され、達成されるであろう。上記の一般的説明および以下の詳細な説明は、単なる例示および解説であって、限定ではないことを理解すべきである。

【図面の簡単な説明】

【００２５】

【図１】（図1A）ジカウイルスに対するカエルペプチドのスクリーニングおよび同定におけるデータ。宿主防御ペプチドをZIKVと共に2時間インキュベートし、感染72時間後にZIKVのフォーカス形成アッセイ（FFA）を使ってウイルス生存能を試験した。OVAペプチドを陰性対照として使用した（100％のFFU/ウェルとして設定）。T検定、両側p値＝0.0077（＊＊）。（図1B）溶血を使って各ペプチドの細胞毒性を試験した。簡単に述べると、2×10^7個のヒト赤血球を、一連の濃度の各ペプチドで処理し、RBC溶解を決定した。（図1C）Hopp-Woodsアミノ酸親水性尺度によって表されたYodhaペプチド（ブレベニン（Brevenin）スーパーファミリー）のアミノ酸配列を表す。（図1D）FFAによるZIKV感染におけるYodhaペプチドのIC_{50}測定を表す。データは少なくとも3回の独立した実験からの平均±SEMである。（図1E）ヒトRBCに対して最大200μMというさらに高い濃度を使って、YodhaペプチドおよびOVAペプチドの細胞毒性を試験した。ヒト赤血球を一連の濃度の各ペプチドで処理し、RBC溶解を決定した。（図1F）Yodhaペプチドが誘導するZIKV阻害の動態を、経時的に（5分から2時間まで）調べた（ペプチド濃度20μM）。OVAペプチドを陽性対照として使用した（100％のFFU/ウェルとして設定）。値は平均±S.E.M.を表す。＊P＜0.05および＊＊P＜0.01;二元配置ANOVAによる。

【図２】（図2A）Yodhaペプチドが4つのZIKV株のすべてを阻害することを示すデータを表す。ジカウイルス株PRVABC59、MR-766、DakAr41524、およびP6-740を、50μMのYodhaペプチドまたは対照OVAペプチドに曝露した。値は平均±S.E.M.を表す。＊＊＊＊p＜0.0001;二元配置ANOVAによる。（図2B）100μMでのデータを表す。

【図３】（図3A）実験計画の略図のようにYodhaペプチドによる処理がインビトロでZIKV複製を減少させることを表す。ベロ（Vero）細胞単層をまずZIKVに感染させ、次に、感染の1時間後、24時間後、48時間後、および72時間後に、Yodhaペプチドまたは対照OVAペプチド（40μM）で処理した。感染の3時間後、24時間後、48時間後、および72時間後に培養上清を収集し、ZIKVについてアッセイした。（図3B）Yodhaペプチドによる処理が上清におけるZIKV価の有意な低減につながったことを表す。エラーバーは4つの技術的反復実験（technical replicate）のSEMを示す。統計的有意性は二元ANOVAによって評価した。

【図４】（図4A）Yodhaペプチドが細胞へのZIKV侵入を阻害することを示すための実験設定の概略図を表す。（図4B）ZIKVを200μMのYodhaペプチドまたは対照OVAペプチドで30分処理してから、0.5のMOIでベロ細胞の感染に使用し、ZIKV RNAの発現を定量RT-PCR（qRT-PCR）によって決定したものを表す。細胞グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）を内部対照とした。T検定両側（＊＊）p＝0.0028。（図4C）モック感染ベロ細胞およびZIKV感染ベロ細胞を、ZIKVエンベロープ（緑色）、α-チューブリン（赤色）、およびDAPI（青色）について蛍光染色したものを表す。（図4D）対照ovaペプチドまたはYodhaペプチドに曝露したZIKVを表す。（図4E）図4Dからの試料を、次にベロ単層の感染に使用したものを表す。対照ペプチドで処理したベロ細胞では、ZIKVエンベロープが細胞質内部に見えたが、Yodhaペプチドで処理したベロ細胞ではそうではなかった。

【図５】（図5A）YodhaペプチドがZIKVを破壊することを表す透過型電子顕微鏡像。OVAペプチド（対照）またはYodhaペプチドで処理したZIKVのTEM顕微鏡像。ZIKVを200μMのペプチドと共に10分だけインキュベートし、パラホルムアルデヒドで固定した後、電子顕微鏡検査用に加工した。Yodhaペプチド処理はウイルス粒子の形態の喪失および凝集につながった。（図5B）対照ペプチドまたはYodhaペプチドで処理したZIKVの（5A）からの拡大図。データは行った3回の実験を代表している。

【図６】（図6A）Yodhaペプチドのアラニンスキャニング変異型のリスト（SEQ ID NO:1～24）。（図6B）Yodhaペプチド（ゼロに設定）と比較したアラニンスキャニング変異型ペプチドの殺ウイルス活性の変化を表す。T検定両側p値（＊）p＝0.021、（ns）有意でないp＝0.1553。（図6C）ヒト赤血球を使って細胞毒性について試験したアラニンスキャン変異型のそれぞれを表す。（図6D）Lアミノ酸とDアミノ酸がどちらもジカに対して有効であることを示すデータを表す。

【図７Ａ】Yodhaペプチドの天然の変異体がZIKVを阻害することを表す。Yodhaペプチドの天然変異体のリスト（SEQ ID NO:1、25～55）。
【図７Ｂ】細胞毒性試験を表す。これは、Yodhaペプチド変異体がヒトRBCにとって非毒性であることを表している。
【図７Ｃ】Yodhaペプチドのこれら天然変異体のそれぞれを、それらのZIKV中和能力について試験したことを表す。1つを除くすべての変異体がZIKVを阻害した。
【図７Ｄ】試験した切断型および変異型Yodhaペプチド（SEQ ID NO:56～58）。
【図７Ｅ】変異型ペプチドのZIKV阻害能力を表す。
【図７Ｆ】毒性の欠如を表す。
【図８】（図8A）YodhaペプチドがDENV血清型1、2、3、および4を中和することを表す。Yodhaペプチドを50μMでインキュベートし、ウイルスフォーカス形成単位の％を決定した。（図8B）Yodhaペプチドを160μMでインキュベートした結果を表す。低用量のYodhaペプチドでもDENV1、2、および4には有効だった。DENV3の中和には、それより高い用量のYodhaペプチドが必要だった。（図8C）FFAによる、DENV感染におけるYodhaのIC_{50}測定。（図8D）DENV3感染に対する切断型Yodha変異体12の用量漸増試験により、この切断型は完全長Yodhaペプチドより効率的であることがわかる。OVAペプチドを陰性対照として使用し、100％のウイルスFFU/ウェルとして設定した。
【図９】（図9A）YodhaペプチドがH1N1およびH3N2ヒトインフルエンザウイルスを中和することを表す。YodhaペプチドをH1N1およびH3N2ウイルスと共に37℃で1時間インキュベートした後、ウイルスをMDCK細胞単層上にプレーティングした。翌日、フォーカス形成アッセイを使ってウイルスを可視化した。（図9B）Yodhaペプチド（47）がインフルエンザウイルスの数多くのサブタイプに対して有効であることを表す。（図9C）YodhaペプチドがH2、H5、H7、およびH9鳥インフルエンザヘマグルチニンに結合することを示すデータを表す。
【図１０】（図10A）40uMのYodhaペプチド（47）がクレードA HIVを効率よく阻害したことを表す。クレードA、B、およびC HIVウイルスを、段階的用量（5um～160uM）のYodhaペプチドまたは対照OVAペプチドのどちらかに曝露した。（図10B）40uMのYodhaペプチド（47）は、クレードB HIVを効率よく阻害した。（図10C）40uMのYodhaペプチド（47）はクレードC HIVを効率よく阻害した。
【図１１】（図11A）Yodhaペプチドの投与がマウスにおけるZIKVウイルス血症およびウイルス負荷を低減することを示す感染後3日目の血清におけるウイルス血症。4～5週齢マウスのコホートに2mgの抗Ifnar1 mAbを腹腔内投与し、翌日、10^5FFUのPRVABC ZIKVに感染させた。ウイルス血症およびウイルス負荷をリアルタイムPCRでモニターした。（図11B）眼における6日目のウイルス負荷を表す。（図11C）脾臓における6日目のウイルス負荷を表す。
【図１２】Yodhaペプチドの切断型変異体がH3N2インフルエンザを中和することを示すデータを表す。
【発明を実施するための形態】
【００２６】
詳細な説明
本明細書に記載する材料、化合物、組成物、キット、および方法の理解は、以下に述べる本開示の主題の特定の局面の詳細な説明や、それに含まれる実施例および図面を参照することによって、さらに容易になるだろう。
【００２７】
本材料、化合物、組成物、キット、および方法を開示し、説明する前に、下記の局面は特定の合成方法または特定の試薬に限定されないことを理解すべきである。それらは当然、さまざまでありうるからである。本明細書において使用する術語には、特定の局面を説明する目的しかなく、限定を意図していないことも、理解すべきである。
【００２８】
また、本明細書の全体を通して、さまざまな刊行物に言及する。それら刊行物の開示は

、本開示の内容が関係する技術分野の現状をより詳しく説明するために、その全体が、参照により、本願に組み入れられる。また、開示した参考文献は、そこに含まれている題材であって、その参考文献が挙げられた文において議論されているものに関して、個別にかつ具体的に、参照により、本明細書に組み入れられる。

【００２９】

定義

本明細書および後述の特許請求の範囲ではいくつかの用語に言及するが、それらは以下の意味を有すると定義されるものとする。

【００３０】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形（a，an，the）は、文脈上そうでないことが明らかである場合を除き、複数の指示対象を包含することに留意しなければならない。

【００３１】

あるアミノ酸配列を有するペプチドに関して「を含む」という用語は、追加のN末（アミン端）アミノ酸またはC末（カルボン酸端）アミノ酸を含有しうるペプチドを指す。すなわちこの用語は、より大きなペプチド内のアミノ酸配列を包含するものとする。

【００３２】

あるアミノ酸配列を有するペプチドに関して「からなる」という用語は、配列中にちょうどその数のアミノ酸を有し、それ以上は有しないペプチド、または当該請求項において明確に指定された範囲を上回るアミノ酸を有しないペプチドを指す。

【００３３】

「任意の」または「任意で」とは、その次に記載される事象または状況が起こっても起こらなくてもよいこと、およびその記載は、その事象または状況が起こる場合と、それが起こらない場合とを包含することを意味する。例えば、「任意でアジュバント」という語句は、アジュバントが含まれていても含まれていなくてもよいことを意味する。

【００３４】

「薬学的に許容される」という用語は、妥当な医学的判断の範囲内で、合理的なベネフィット/リスク比に見合った、過剰な毒性、刺激、アレルギー応答、または他の問題もしくは合併症を伴わずにヒトおよび動物の組織と接触させて使用するのに適する、化合物、材料、組成物、および/または剤形を指す。

【００３５】

「担体」という用語は、ある化合物または組成物と組み合わせた場合に、その化合物または組成物の調製、貯蔵、投与、送達、有効性、選択性、または他の任意の特徴を、意図したその用途または目的のために、補助しまたは助長する化合物、組成物、物質、または構造を意味する。例えば担体は、活性成分のいかなる分解も最小限にし、対象におけるいかなる有害副作用も最小限にするように、選択することができる。

【００３６】

「アミド化」という用語は、例えばポリペプチドのC末におけるカルボン酸のアミドへの変換を指す。

【００３７】

「アセチル化」という用語は、例えばポリペプチドのN末におけるアセチル基によるアミン基の置換を指す。

【００３８】

「変異体」という用語は、アミノ酸の挿入、欠失、保存的置換、または非保存的置換を有するアミノ酸配列、または引用配列に対して60％、65％、70％、71％、72％、73％、74％、75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％＄、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、または99％の配列相同性または同一性を有するペプチドを指す。

【００３９】

変異体はアレル変異体を包含する。「アレル変異体」という用語は、ペプチドのアミノ

酸配列の変化につながる多形であって、自然集団（例えばカエル種またはカエル変種）内に存在するものを含有するポリペプチドを指す。そのような天然のアレル変異は典型的にはポリペプチドに1～5％の不一致をもたらしうる。アレル変異体は、複数の異なる種において関心対象のポリペプチド配列を配列決定することによって同定することができ、これは、ハイブリダイゼーションプローブを使ってそれらの種における同じ遺伝子座を同定することによって、容易に実行することができる。その結果生じるアミノ酸多形または変異であって、天然のアレル変異の結果であり、関心対象のペプチドの機能的活性を変化させないものはいずれもすべて、本開示の範囲内にあるものとする。

【００４０】

本明細書において使用する「ワクチン」という用語は、チャレンジ後に個体に免疫を与える組成物を指す。

【００４１】

「抗ウイルス性」および「殺ウイルス性」という用語は、相互可換的に使用され、ウイルス粒子を阻害しかつ/または殺す能力および/またはウイルス粒子が引き起こす感染を予防する能力を有する作用物質を指す。

【００４２】

「阻害する」という用語は、活性、応答、状態、疾患、または他の生物学的パラメータの減少を指す。これは、活性、応答、状態、または疾患の完全な除去を包含しうるが、それらに限定されるわけではない。これは、例えば、天然のレベルまたは対照レベルとの比較で、活性、応答、状態、または疾患の10％の低減も包含しうる。したがって低減は、天然のレベルまたは対照レベルとの比較で、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100％であるか、その間の任意の低減量であることができる。

【００４３】

「低減する」またはこの用語の他の形態、例えば「低減すること」または「低減」は、ある事象または特徴（例えばウイルス感染）の低下を意味する。これは、典型的には、何らかの標準または予想値に関連していると理解される。言い換えれば、これは相対的であるが、その標準値または相対値に言及する必要は必ずしもない。例えば「ウイルス感染を低減する」とは、標準または対照と比較してウイルスの感染率を低減することを意味する。

【００４４】

本明細書において使用する用語「予防」および「予防する」は、再発、伝播、または発症の予防を包含する。本開示を完全な予防に限定することは意図していない。いくつかの態様では、発症が遅延するか、または疾患の重症度が低減される。

【００４５】

本明細書において使用する場合、「処置」および「処置する」という用語は、対象（例えば患者）が治癒し、疾患が根絶される場合に限定されない。むしろ、本開示の態様では、単に症状を低減しかつ/または疾患の進行を遅延させる処置も想定される。

【００４６】

本明細書において使用する「との組合せ」という用語は、それが追加処置を伴う投与を説明するために使用される場合には、作用物質が、追加処置の前に、または追加処置と一緒に、または追加処置後に、またはそれらの組合せで投与されうることを意味する。

【００４７】

本明細書において使用する「滅菌」という用語は、伝染性作用物質（例えば真菌、細菌、ウイルス、プリオン、および胞子形態など）を効果的に殺しまたは排除するプロセスに付すことを指す。滅菌は、熱、化学物質、放射線、高圧、または濾過の適用によって達成することができる。あるプロセスは、蒸留によって調製され気密容器に保存された水を必要とし、そこには適切な添加剤がほぼ等張となるように導入される。

【００４８】

「ポリヌクレオチド」という用語は、2つ以上のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド、好ましくは4つ以上、通常は11個以上のデオキシリボヌクレオチドまたは

リボヌクレオチドで構成される分子を指す。正確なサイズは多くの因子に依存し、そしてそれはオリゴヌクレオチドの最終的な機能または用途に依存する。ポリヌクレオチドは、化学合成、DNA複製、逆転写、またはそれらの組合せを含む任意の方法で、生成させることができる。「オリゴヌクレオチド」という用語は、一般に、通常は30ヌクレオチド長に満たない短い一本鎖ポリヌクレオチド鎖を指すが、「ポリヌクレオチド」という用語と相互可換的にも使用されうる。

【００４９】

「核酸」という用語は、上述したヌクレオチドのポリマー、すなわちポリヌクレオチドを指す。この用語は、単一の分子または分子の集合体を指すために使用される。核酸は一本鎖であっても二本鎖であってもよく、コード領域およびさまざまな制御要素の領域を含みうる。

【００５０】

「異種」核酸配列または「異種」ペプチド配列とは、例えば全体の配列が、他の植物、細菌、ウイルス、他の生物からのセグメントを含有するか、同じ生物中に存在するが同じ生物またはいかなる自然状態でも天然には存在しない形で1つに結合されている2つの配列の結合体を含有するなどの理由で、天然には存在しない核酸配列またはペプチド配列を指す。

【００５１】

核酸分子に関して使用する場合、「組換え」という用語は、分子生物学的技法を使って1つに結合された核酸のセグメントで構成される核酸分子を指す。ただし、その核酸配列全体は、天然には存在しない、すなわち、たとえ個々のセグメントは天然に存在しうるとしても、配列全体は天然には存在しないように、配列全体には少なくとも1つの変異が存在するものとする。セグメントは、核酸配列全体が最初から最後に至るまで天然に存在するということがないように、改変された配置で結合されうる。タンパク質またはポリペプチドに関して使用する場合、「組換え」という用語は、組換え核酸分子を使って発現されるタンパク質分子を指す。

【００５２】

「タンパク質」、「ペプチド」、および「ポリペプチド」という用語は、ペプチド結合によって結合されたアミノ酸を含む化合物を指すために相互可換的に使用され、相互可換的に使用される。アミノ酸は天然でも非天然でもよい。「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、タンパク質の異なる部分が異なる起源に由来していて、分子全体は天然には存在しない分子である。キメラタンパク質は、同じ種または異なる種からのアミノ酸配列を含有しうるが、それらは、自然状態におけるそれらの配置と同じようには配置されていないものとする。キメラタンパク質の例として、例えばアミン側鎖基を含有するアミノ酸、例えばリジン、カルボン酸側鎖基を含有するアミノ酸、例えばアスパラギン酸またはグルタミン酸、ポリヒスチジンタグ、例えば典型的には4つ以上のヒスチジンアミノ酸を付加した場合など、どの天然タンパク質とも同一でない、C末端またはN末端に取り付けられた1つ、2つ、またはそれ以上のアミノ酸を含有する本明細書に開示する配列が挙げられる。考えられるキメラタンパク質として、P2A-GSGなどの自己切断ペプチドを持つものが挙げられる。Wang, Scientific Reports 5, Article number:16273（2015）参照。

【００５３】

本明細書において使用する用語「誘導体」は、同定された類似体の機能的属性を十分に保っている、構造的に類似するペプチドを指す。誘導体は、1つまたは複数の原子を欠く、例えばアミノ基、ヒドロキシル、またはチオール基が水素で置き換えられている、置換されている、塩、水和/酸化状態が異なるという理由で、または分子内の1つもしくは複数の原子が交換されている、例えば限定するわけではないが、酸素原子が硫黄原子で置き換えられている、またはアミノ基がヒドロキシル基で置き換えられているという理由で、構造的に類似しうる。誘導体はプロドラッグであってもよく、脂質、ポリエチレングリコール、糖、多糖を含みうる。誘導体は、連結基によって1つに連結された2つ以上のペプチドでありうる。連結基は生分解性でありうることが想定される。誘導体は、合成化学または

有機化学の教科書に提示されているさまざまな合成方法または適当な変法のいずれか、例えば、参照により本明細書に組み入れられるMarch's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, Wiley, 6th Edition（2007）Michael B. SmithまたはDomino Reactions in Organic Synthesis, Wiley（2006）Lutz F. Tietzeに掲載されているものなどによって調製されうる。

【００５４】

一定の態様において、本明細書において開示するペプチドは、少なくとも1つの非天然の分子修飾、例えばポリエチレングリコールの取付け、キメラペプチドの取付け、芳香族基を含む蛍光色素の取付け、蛍光ペプチド、^{18}Fなどの放射性核種を結合する能力を有するキレート剤、N末アセチル基、プロピオニル基、ミリストイル基、およびパルミトイル基、またはN末メチル化、またはC末アルキルエステルを有する。一定の態様において、本開示では、市販のビオチン化試薬を使って標識された本明細書に開示するペプチドが想定される。ビオチン化ペプチドは、ストレプトアビジンによるアフィニティー結合、アフィニティー精製、およびアフィニティー検出において使用することができる。一定の態様において、本開示では、N-アジドアセチルグルコサミン、N-アジドアセチルマンノースアミン、およびN-アジドアセチルガラクトサミンなどの天然の単糖のアジド誘導体を含有する本明細書に開示するペプチドが考えられる。

【００５５】

一定の態様において、本開示では、溶解度および血清中半減期などの薬物動態特性を改善するために、1つまたは複数のアミノ酸が、任意でリンカーを介して繋がれた、化学基で置換されている、本明細書に開示するペプチドの誘導体が想定される。一定の態様において、そのような誘導体は、置換基またはリンカーが生分解性であるか、置換基またはリンカーが生分解性ではないプロドラッグでありうる。一定の態様において、想定される置換基として、糖、多糖、アセチル、脂肪酸、脂質、および/またはポリエチレングリコールが挙げられる。置換基は、ペプチドのC末またはN末でのアミド結合の形成によって共有結合され、任意でリンカーを介して繋がれうる。一定の態様において、置換基は、ペプチド内のアミノ酸を介して、例えばリジンなどのアミン側鎖基を介して、または本明細書に開示する配列に含まれるペプチド内のカルボン酸側鎖基を含有するアミノ酸、例えばアスパラギン酸またはグルタミン酸などを介して、共有結合されうると考えられる。一定の態様において、置換基は、本明細書に開示する配列中のシステインを介して共有結合され、任意でリンカーを介して繋がれうると考えられる。一定の態様において、置換基は、システインアミノ酸側鎖基とジスルフィドを形成するリンカーを介して繋がれる。

【００５６】

「置換（された）」という用語は、少なくとも1つの水素原子が置換基で置き換えられている分子を指す。置換されている場合は、基のうちの1つまたは複数が置換基である。分子は多重に置換されうる。オキソ置換基（「＝O」）の場合は、2つの水素原子が置き換えられる。この文脈内での置換基の例として、ハロゲン、ヒドロキシ、アルキル、アルコキシ、ニトロ、シアノ、オキソ、カルボシクリル、カルボシクロアルキル、ヘテロカルボシクリル、ヘテロカルボシクロアルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、-NRaRb、-NRaC（＝O）Rb、-NRaC（＝O）NRaNRb、-NRaC（＝O）ORb、-NRaSO$_2$Rb、-C（＝O）Ra、-C（＝O）ORa、-C（＝O）NRaRb、-OC（＝O）NRaRb、-ORa、-SRa、-SORa、-S（＝O）$_2$Ra、-OS（＝O）$_2$Ra、および-S（＝O）$_2$ORaが挙げられる。この文脈におけるRaおよびRbは、同じであっても異なってもよく、独立して水素、ハロゲン　ヒドロキシル、アルキル、アルコキシ、アルキル、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、カルボシクリル、カルボシクロアルキル、ヘテロカルボシクリル、ヘテロカルボシクロアルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアリール、およびヘテロアリールアルキルでありうる。置換基は任意でさらに置換されうる。

【００５７】

本明細書にいう「脂質」基とは、水に著しく不溶である天然または非天然の疎水性基を指す。本明細書にいう脂質基は、脂質上の結合点を水素で置き換えて、その結果生じた化

合物が水に、水におけるオクタンの重量溶解百分率である0.63×10^{-4}%w/w（25℃）未満の溶解度を有する場合に、水に著しく不溶であると見なされる。Solvent Recovery Handbook, 2nd Ed, Smallwood, 2002, Blackwell Science刊の195頁を参照されたい。天然の脂質の例として、脂肪酸、グリセロ脂質、コレステロール、ステロイド、ポリケチド、および誘導体に見いだされる飽和または不飽和炭化水素鎖が挙げられる。非天然の脂質としては、天然の脂質の誘導体、アクリルポリマー、芳香族化合物、およびアルキル化化合物、ならびにそれらの誘導体が挙げられる。

【００５８】

「プロドラッグ」という用語は、インビボで生物学的に活性な形態に変換される作用物質を指す。プロドラッグは、状況によっては親化合物よりも投与しやすい場合があるので、しばしば有用である。プロドラッグは、薬学的組成物への溶解度が、親薬物より改善されている場合もある。プロドラッグは、酵素的プロセスおよび代謝的加水分解を含むさまざまな機序によって親薬物に変換されうる。典型的プロドラッグは薬学的に許容されるエステルである。プロドラッグとしては、ヒドロキシ基、アミノ基、またはメルカプト（チオール）基が、活性化合物のプロドラッグが対象に投与された場合に解離して遊離ヒドロキシ基、遊離アミノ基、または遊離メルカプト基をそれぞれ形成する任意の基に結合されている化合物が挙げられる。プロドラッグの例として、活性化合物中のアルコール官能基の酢酸エステル、ギ酸エステルおよび安息香酸エステル誘導体、または活性化合物中のアミン官能基のアセトアミド、ホルムアミド、およびベンズアミド誘導体などが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【００５９】

例えば、本開示のペプチドまたは薬学的に許容される形態のペプチドがカルボン酸官能基を含有する場合、プロドラッグは、その酸基の水素原子を、（C_1～C_8）アルキル、（C_2～C_{12}）アルカノイルオキシメチル、4～9個の炭素原子を有する1-（アルカノイルオキシ）エチル、5～10個の炭素原子を有する1-メチル-1-（アルカノイルオキシ）-エチル、3～6個の炭素原子を有するアルコキシカルボニルオキシメチル、4～7個の炭素原子を有する1-（アルコキシカルボニルオキシ）エチル、5～8個の炭素原子を有する1-メチル-1-（アルコキシカルボニルオキシ）エチル、3～9個の炭素原子を有するN-（アルコキシカルボニル）アミノメチル、4～10個の炭素原子を有する1-（N-（アルコキシカルボニル）アミノ）エチル、3-フタリジル、4-クロトノラクトニル、ガンマ-ブチロラクトン-4-イル、ジ-N,N-（C_1～C_2）アルキルアミノ（C_2～C_3）アルキル（例えばベータ-ジメチルアミノエチル）、カルバモイル-（C_1～C_2）アルキル、N,N-ジ（C_1～C_2）アルキルカルバモイル-（C_1～C_2）アルキルおよびピペリジノ-、ピロリジノ-またはモルホリノ-（C_2～C_3）アルキルなどの基で置き換えることによって形成される薬学的に許容されるエステルを含むことができる。

【００６０】

本開示のペプチドまたは薬学的に許容される形態のペプチドがアルコール官能基を含有する場合は、そのアルコール基の水素原子を、（C_1～C_6）アルカノイルオキシメチル、1-（（C_1～C_6）アルカノイルオキシ）エチル、1-メチル-1（（C_1～C_6）アルカノイルオキシ）エチル　（C_1～C_6）アルコキシカルボニルオキシメチル、-N-（C_1～C_6）アルコキシカルボニルアミノメチル、スクシノイル、（C_1～C_6）アルカノイル、アルファ-アミノ（C_1～C_4）アルカノイル、アリールアシルおよびアルファ-アミノアシル、または各アルファ-アミノアシル基が天然のL-アミノ酸から独立して選択されるアルファ-アミノアシル-アルファ-アミノアシル、P（O）（OH）$_2$、-P（O）（O（C_1～C_6）アルキル）$_2$、およびグリコシル（ヘミアセタール型の糖質のヒドロキシル基を除去して得られる基）などの基で置き換えることによって、プロドラッグを形成させることができる。

【００６１】

本開示のペプチドまたは薬学的に許容される形態のペプチドにアミン官能基が組み込まれている場合は、そのアミン基中の水素原子を、R-カルボニル、RO-カルボニル、NRR'-カルボニルなどの基で置き換えることによって、プロドラッグを形成させることができ、こ

こで、RおよびR'はそれぞれ独立して（C_1～C_{10}）アルキル、（C_3～C_7）シクロアルキル、ベンジル、天然アルファ-アミノアシル、-C（OH）C（O）OY_1、式中、Y^1はH、（C_1～C_6）アルキル、またはベンジル、-C（OY_2）Y_3、式中、Y_2は（C_1～C_4）アルキル、Y_3は（C_1～C_6）アルキル、カルボキシ（C_1～C_6）アルキル、アミノ（C_1～C_4）アルキル、またはモノ-Nもしくはジ-N,N-（C_1～C_6）アルキルアミノアルキル、-C（Y_4）Y_5、式中、Y_4はHまたはメチル、Y_5はモノ-N-もしくはジ-N,N-（C_1～C_6）アルキルアミノ、モルホリノ、ピペリジン-1-イル、またはピロリジン-1-イルである。

【００６２】

本明細書にいう「薬学的に許容されるエステル」としては、酸性基の、例えば限定するわけではないがカルボン酸、リン酸、ホスフィン酸、スルホン酸、スルフィン酸、およびボロン酸の、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アラルキル、およびシクロアルキルエステルが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【００６３】

本明細書にいう「薬学的に許容されるエノールエーテル」としては、-C＝C（OR）の誘導体（式中、Rはアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アラルキル、およびシクロアルキルから選択することができる）が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。薬学的に許容されるエノールエステルとしては、式-C＝C（OC（O）R）の誘導体（式中、Rは、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アラルキル、およびシクロアルキルから選択することができる）が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【００６４】

「連結基」とは、分子部分を橋かけして1つにするために使用することができる、さまざまな任意の分子的配置を指す。式の一例として、-R_m-を挙げることができ、ここでRは、以下のように出現場所ごとに個別に独立して選択される:-CR_mR_m-、-CHR_m-、-CH-、-C-、-CH_2-、-C（OH）R_m、-C（OH）（OH）-、-C（OH）H、-C（Hal）R_m-、-C（Hal）（Hal）-、-C（Hal）H-、-C（N_3）R_m-、-C（CN）R_m-、-C（CN）（CN）-、-C（CN）H-、-C（N_3）（N_3）-、-C（N_3）H-、-O-、-S-、-N-、-NH-、-NR_m-、-（C＝O）-、-（C＝NH）-、-（C＝S）-、-（C＝CH_2）-（これらはR基間に個別に独立して単結合、二重結合または三重結合を含有しうる）。RがR_mで分岐している場合は、末端に-CH_3、-H、-CH＝CH_2、-CCH、-OH、-SH、-NH_2、-N_3、-CN、または-Halなどの基を持つか、分岐した2つのRが環状構造を形成しうる。一定の例では、Rの総数、すなわち「m」は、100または50または25または10未満でありうる。連結基の例として、架橋アルキル基およびアルコキシアルキル基が挙げられる。連結基は1つまたは複数の置換基で置換されていてよい。

【００６５】

置換基またはリンカーに関して本明細書において使用する用語「生分解性」は、ペプチド誘導体における分子的配置であって、対象、例えばヒトに投与された場合に、生物学的機序によって破壊されることで、代謝産物が形成され、分子的配置は長期間は持続せず、例えば分子的配置は数時間または数日後には身体によって破壊されることになるものを指す。一定の態様において、本開示では、生分解性リンカーまたは生分解性置換基が1週間後または1ヶ月後には存在しないことが想定される。

【００６６】

投与が想定される「対象」として、ヒト（例えば任意の年齢群の男性または女性、例えば小児科対象（例えば幼児、小児、青年）または成人対象（例えば若年成人、中年成人、または老人））および/または他の霊長類（例えばカニクイザル、アカゲザル）、哺乳動物、例えばウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、および/またはイヌなどの商業的に重要な哺乳動物、および/または鳥、例えばニワトリ、アヒル、ガチョウ、ウズラ、および/またはシチメンチョウなどの商業的に重要な鳥が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【００６７】

「機能的に組み合わされた」、「機能的順序で」、および「機能的に連結された」とい

う用語は、所与の遺伝子の転写および/または所望のタンパク質分子の合成を指示する能力を有する核酸分子が生じるような形での核酸配列の連結を指す。この用語は、機能的なタンパク質が生じるような形でのアミノ酸配列の連結も指す。

【００６８】

一定の態様において、用語「配列同一性のパーセンテージ」は、2つの最適に整列された配列を比較ウインドウにおいて比較し、両配列中に同一核酸塩基（例えばA、T、C、G、U、またはI）が存在する位置の数を決定することで一致位置の数を得て、一致位置の数を比較ウインドウ内の位置の総数（すなわちウインドウサイズ）で割り、その結果に100を掛けて配列同一性の百分率を得ることによって算出される。

【００６９】

一定の態様において、配列「同一性」は、最短の配列か、内部ギャップを等価な位置として数えてオーバーハングを除く等価な位置の数かのどちらか大きい方で割った同一位置の数を使って算出される、アラインメントの2つの配列間での配列アラインメントにおいて正確に一致するアミノ酸の数（パーセンテージとして表したもの）を指す。例えばポリペプチドGGGGGGとGGGGTは、5つ中4つ、すなわち80％の配列同一性を有する。例えばポリペプチドGGGPPPとGGGAPPPは、7つ中6つ、すなわち85％の配列同一性を有する。一定の態様において、本明細書に示す配列同一性の記述はいずれも、配列類似性の代わりに使用されうる。「類似性」パーセントは、アラインメントの2つの配列間の類似性を定量するために使用される。この方法は、一定のアミノ酸が同一でなくても一致とされることを除けば、同一性の決定と同一である。アミノ酸は、それらが、以下のアミノ酸グループに従って類似する特性を持つグループ内にあるなら、一致と分類される:芳香族-F Y W;疎水性-A V I L;正荷電:R K H;負荷電-D E;極性-S T N Q。アミノ酸グループは保存的置換とも見なされる。

【００７０】

指定されたポリペプチド「をコードする核酸配列」という用語は、遺伝子のコード領域を含む核酸配列、言い換えると遺伝子産物をコードする核酸配列を指す。コード領域はcDNA、ゲノムDNA、またはRNAの形態で存在しうる。DNA形態で存在する場合、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、または核酸は、一本鎖（すなわちセンス鎖）または二本鎖でありうる。転写の適正な開始および/または一次RNA転写産物の正しいプロセシングが可能になるように、必要であれば、例えばエンハンサー/プロモーター、スプライスジャンクション、ポリアデニル化シグナルなどの適切な制御要素を、遺伝子のコード領域の近傍におくことができる。あるいは、本発明の発現ベクターにおいて利用されるコード領域は、内在性のエンハンサー/プロモーター、スプライスジャンクション、介在配列、ポリアデニル化シグナルなどを含有するか、内在性制御要素と外来性制御要素の両者の組合せを含有しうる。

【００７１】

真核生物における転写制御シグナルは、「プロモーター」要素および「エンハンサー」要素を含む。プロモーターおよびエンハンサーは、転写に関与する細胞タンパク質と特異的に相互作用するDNA配列の短いアレイからなる（Maniatis, et al., Science 236:1237, 1987）。プロモーター要素およびエンハンサー要素は、酵母細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞、および植物細胞中の遺伝子を含むさまざまな真核供給源から単離されている。プロモーター要素およびエンハンサー要素はウイルスからも単離されており、プロモーターなどの類似の制御要素は原核細胞にも見いだされる。特定のプロモーターおよびエンハンサーの選択は、関心対象のタンパク質を発現させるために使用する細胞タイプに依存する。一部の真核プロモーターおよび真核エンハンサーは広い宿主域を有するが、それ以外は限定された細胞タイプのサブセットにおいて機能的である（概観するにはVoss, et al., Trends Biochem. Sci., 11:287, 1986および前掲のManiatis, et al., 1987を参照されたい）。

【００７２】

本明細書において使用する用語「プロモーター要素」、「プロモーター」、または「プ

ロモーター配列」は、DNAポリマーのタンパク質コード領域の5'端に位置する（すなわちDNAポリマーのタンパク質コード領域の前にある）DNA配列を指す。自然界では、大半の公知プロモーターの位置は、転写される領域の前にある。プロモーターはスイッチとして機能し、遺伝子の発現を活性化する。遺伝子が活性化される場合、それを、転写されるまたは転写に関与するという。転写は遺伝子からのmRNAの合成を伴う。それゆえにプロモーターは、転写調節要素として役立ち、mRNAへの遺伝子の転写の開始部位にもなる。

【００７３】

対照的に、「調節可能」または「誘導性」プロモーターは、刺激（例えば熱ショック、化学物質、光など）の存在下では、刺激が存在しない場合の機能的に連結された核酸配列の転写レベルとは異なる、機能的に連結された核酸配列の転写レベルを指示する能力を有するものである。

【００７４】

エンハンサーおよび/またはプロモーターは「内在性」または「外来性」または「異種」であることができる。「内在性」のエンハンサーまたはプロモーターは、ゲノム中で、所与の遺伝子と元々連結されているものである。「外来性」または「異種」のエンハンサーまたはプロモーターは、遺伝子の転写が連結されたエンハンサーまたはプロモーターによって指示されるように、遺伝子操作（すなわち分子生物学的技法）を利用して、遺伝子と並置されたものである。例えば第1の遺伝子と機能的に組み合わされた内在性プロモーターを単離し、取り出し、第2の遺伝子と機能的に組み合わせることにより、それを第2の遺伝子と機能的に組み合わされた「異種プロモーター」にすることができる。そのような組合せは種々考えられる（例えば第1の遺伝子および第2の遺伝子は、同じ種に由来しても、異なる種に由来してもよい）。

【００７５】

以下に、本開示の材料、化合物、組成物、物品、および方法の特定の局面を詳述し、それらの例を下記の実施例および添付の図面において説明する。

【００７６】

ポリペプチド

一定の態様において、本開示は、本明細書に開示するポリペプチドおよびそれらの変異体、例えばSEQ ID NO:1～77を含むまたはSEQ ID NO:1～77からなるペプチドのいずれかに関する。一定の態様において、ペプチドは、アミノ酸配列

LFFX^{1}GTIX^{2}LX^{3}LC (SEQ ID NO: 78)

を含み、ここで、X^{1}は任意のアミノ酸であり;X^{2}はSまたはNであり;X^{3}は任意のアミノ酸であり、一定の態様では、X^{1}はL、A、任意のアミノ酸、またはL以外の任意のアミノ酸であり、X^{3}はS、A、任意のアミノ酸、またはS以外の任意のアミノ酸である。

【００７７】

一定の態様において、ポリペプチドはアミノ酸配列

SMLLLFFLGTISLSLCQDDQERC (SEQ ID NO: 1)

からなる。一定の態様において、ポリペプチドはアミノ酸配列

SMLLLFFLGTISLSLCQ (SEQ ID NO:56)

または

PMLLLFFLGTISLSLCQ (SEQ ID NO:57)

からなる。一定の態様において、ポリペプチドはアミノ酸配列

LLFFLGTISLSLCQDDQERC (SEQ ID NO: 65)

からなる。一定の態様において、ポリペプチドは1つまたは2つのアミノ酸置換を有する。

【００７８】

一定の態様において、ポリペプチドは、

LFFX^{1}GTIX^{2}LX^{3}LC (SEQ ID NO: 78)

を含むアミノ酸配列を含み、X^{1}は任意のアミノ酸であり;X^{2}は任意のアミノ酸であるか、SまたはNであり;X^{3}は任意のアミノ酸である。一定の態様において、X^{1}はAまたはL以外の他の任意のアミノ酸である。一定の態様において、X^{3}はAまたはS以外の他の任意のアミノ酸

である。

【００７９】

いくつかの態様において、ポリペプチドは、本明細書において開示するアミノ酸配列、例えばSEQ ID NO:1～58または59～77からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも60％の同一性を含むかまたはそれからなるアミノ酸配列、あるいは

$LFFX^1GTIX^2LX^3LC$ (SEQ ID NO: 78)

を有するアミノ酸配列を含み、ここで、X^1は任意のアミノ酸であり、X^2は任意のアミノ酸であるか、SまたはNであり、X^3は任意のアミノ酸であり、一定の態様では、X^1はL、A、任意のアミノ酸、またはL以外の任意のアミノ酸であり、X^3はS、A、任意のアミノ酸、またはS以外の任意のアミノ酸である。一定の態様において、ポリペプチドは、18、20、22、25、27、30、35、または40アミノ酸以下である。

【００８０】

いくつかの態様において、ポリペプチドは、本明細書に開示するアミノ酸配列、例えばSEQ ID NO:1～58または59～77からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも60％の同一性を含むかまたはそれからなるアミノ酸配列、あるいは

$LFFX^1GTIX^2LX^3LCX^4DD$ (SEQ ID NO: 79)

を有するアミノ酸配列を含み、ここで、X^1は任意のアミノ酸であり、X^2は任意のアミノ酸であり、X^3は任意のアミノ酸であり、X^4は任意のアミノ酸である。一定の態様において、X^1はL、A、任意のアミノ酸、またはL以外の任意のアミノ酸であり、X^2はSまたはNであり、X^3はS、A、任意のアミノ酸、またはS以外の任意のアミノ酸であり、X^4はQ、E、A、または任意のアミノ酸である。一定の態様において、ポリペプチドは、18、20、22、25、27、30、35、または40アミノ酸以下である。

【００８１】

いくつかの態様において、ポリペプチドは、本明細書に開示するアミノ酸配列、例えばSEQ ID NO:1～58または59～77からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも60％の同一性を含むかまたはそれからなるアミノ酸配列、あるいは

$LFFX^1GTIX^2LX^3LCX^4DDQERC$ (SEQ ID NO: 80)

を有するアミノ酸配列を含み、ここで、X^1は任意のアミノ酸であり、X^2は任意のアミノ酸であり、X^3は任意のアミノ酸であり、X^4は任意のアミノ酸である。一定の態様において、X^1はL、A、任意のアミノ酸、またはL以外の任意のアミノ酸であり、X^2はSまたはNであり、X^3はS、A、任意のアミノ酸、またはS以外の任意のアミノ酸であり、X^4はQ、E、A、または任意のアミノ酸である。一定の態様において、ポリペプチドは、18、20、22、25、27、30、35、または40アミノ酸以下である。

【００８２】

宿主防御ペプチドは、自然免疫系の非常に古い部分を構成する。これらは、生きている単細胞生物および多細胞生物のすべてにおいて防御の最前線として役立つ、天然に生産されるペプチドの多様なクラスを含む。これらは、外膜を物理的に破壊することで病原体を直接殺すことによって、または内部機能を阻止することによって、病原体を中和する（Zhang et al. Curr Biol 26, R14-R19（2016））。以前に、インド南西部の西ガーツ山脈に見いだされる森林カエル（forest frog）ヒドロフィラクス・バフビスタラ（Hydrophylax bahuvistara）およびハイララナ・オーランティアカ（Hylarana aurantiaca）の皮膚から、宿主防御ペプチドが単離されている（Vineeth Kumar et al. Acta Biol Hung 67, 121-124,（2016））。

【００８３】

本明細書では、ハイララナ・オーランティアカから単離され、抗ウイルス活性を有することが見いだされた、宿主防御ペプチドを開示する。このペプチドをYodhaペプチドと呼ぶ。また、変異体を調製し、それら変異体も本明細書に開示する。したがって本明細書には、Yodhaペプチドの活性なフラグメントおよび変異体を開示し、それらをポリペプチドと呼ぶ。「ポリペプチド」という用語は、当該ポリペプチドが本明細書に記載する抗ウイルス応答を生じるように機能する限り、本開示のYodhaペプチド配列に欠失、付加、変異

導入、置換、切断、反転、またはシャフリングを加えることによって生成する変異体が想定されるものとする。

【００８４】

本開示のペプチドは、ペプチド結合によってカップリングされたアミノ酸を含む。各アミノ酸は天然アミノ酸または非天然アミノ酸であることができる。「非天然アミノ酸」という用語は、天然アミノ酸と類似する構造を有し、それゆえに天然アミノ酸の構造および反応性を模倣するという点で天然アミノ酸の同類体である、有機化合物を指す。非天然アミノ酸は、20種の一般的な天然のアミノ酸の1つではなく、希少な天然アミノ酸セレノシステインまたはピロールリジンでもない、修飾アミノ酸および/またはアミノ酸類似体であることができる。非天然アミノ酸は、天然アミノ酸のD異性体であることもできる。

【００８５】

適切なアミノ酸の例として、アラニン、アロイソロイシン（allosoleucine）、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、ナフチルアラニン（napthylalanine）、フェニルアラニン、プロリン、ピログルタミン酸、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、それらの誘導体または組合せが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。これらおよびその他のアミノ酸を、本明細書において使用するそれぞれの略号と共に、表1に列挙する。

【００８６】

（表１）アミノ酸の略号

アミノ酸	略号*
アラニン	Ala (A)
アロイソロイシン	AIle
アルギニン	Arg (R)
アスパラギン	Asn (N)
アスパラギン酸	Asp (D)
システイン	Cys (C)
シクロヘキシルアラニン	Cha
2,3-ジアミノプロピオン酸	Dap
4-フルオロフェニルアラニン	Fpa (Σ)
グルタミン酸	Glu (E)
グルタミン	Gln (Q)
グリシン	Gly (G)
ヒスチジン	His (H)
ホモプロリン	Pip (Θ)
イソロイシン	Ile (I)
ロイシン	Leu (L)
リジン	Lys (K)
メチオニン	Met (M)
ナフチルアラニン	Nal (Φ)
ノルロイシン	Nle (Ω)
フェニルアラニン	Phe (F)
フェニルグリシン	Phg (Ψ)

アミノ酸	略号*
4-(ホスホノジフルオロメチル)フェニルアラニン	F_2Pmp (Λ)
ピペコリン酸	Pp (ϑ)
プロリン	Pro (P)
サルコシン	Sar (Ξ)
セレノシステイン	Sec (U)
セリン	Ser (S)
スレオニン	Thr (T)
チロシン	Tyr (Y)
トリプトファン	Trp (W)
バリン	Val (V)

＊一文字略号:本明細書において大文字で表される場合はL-アミノ酸型を示し、本明細書において小文字で表される場合はD-アミノ酸型を示す。

【００８７】

本開示のポリペプチドの変異体も開示する。変異体は当業者にはよく理解されており、アミノ酸配列修飾を伴いうる。例えば、アミノ酸配列修飾は、典型的には、置換変異体、挿入変異体、および欠失変異体という3種類のうちの1つまたは複数に属する。挿入には、単一アミノ酸残基または複数アミノ酸残基のアミノ末および/またはカルボキシル末融合、ならびに配列内挿入が含まれる。挿入は、通常、アミノ末融合またはカルボキシル末融合よりも小さな挿入であり、例えば1～3残基程度であるだろう。欠失はペプチド配列からの1つまたは複数のアミノ酸残基の除去を特徴とする。典型的には、ペプチド内の任意の一部位から、1～3残基以下を欠失させる。アミノ酸置換は典型的には単一残基であるが、いくつかの異なる位置に一度に存在することができ、挿入は通常、約1～3アミノ酸残基程度であり、欠失は約1～3残基の範囲にあるだろう。欠失または挿入は、好ましくは、隣り合うペアで行われる。すなわち、2残基の欠失または2残基の挿入である。最終コンストラクトに到達するために、置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組合せを組み合わせることができる。置換変異体は、少なくとも1つの残基が取り除かれ、その場所に異なる残基が挿入されたものである。そのような置換は、一般に下記表2に従って行われ、保存的置換と呼ばれる。

【００８８】

（表２）アミノ酸置換

例示的な保存的置換	
AlaをSerで置き換える	LeuをIleまたはValで置き換える
ArgをLysまたはGlnで置き換える	LysをArgまたはGlnで置き換える
AsnをGlnまたはHisで置き換える	MetをLeuまたはIleで置き換える
AspをGluで置き換える	PheをMet、Leu、Tyr、またはFpaで置き換える
CysをSerで置き換える	SerをThrで置き換える
GlnをAsnまたはLysで置き換える	ThrをSerで置き換える
GluをAspで置き換える	TrpをTyrで置き換える
GlyをProで置き換える	TyrをTrpまたはPheで置き換える
HisをAsnまたはGlnで置き換える	ValをIleまたはLeuで置き換える
IleをLeuまたはValで置き換える	NalをTrpまたはPheで置き換える

【００８９】

機能の実質的変化は、表2の置換よりも保存性の低い置換を選択することによって、すなわち（a）置換領域における例えばシートコンフォメーションまたはらせんコンフォメーションなどとしてのペプチド主鎖の構造、（b）標的部位における分子の電荷もしくは疎水性、または（c）側鎖の嵩高さの維持に及ぼすその効果が有意に異なる残基を選択することによって起こる。タンパク質の特性に最も大きな変化を生じさせると一般に予想される置換は、（a）親水性残基、例えばセリルまたはスレオニルで（を）疎水性残基、例えばロイシル、イソロイシル、フェニルアラニル、バリル、またはアラニルを（で）置換するもの、（b）システインまたはプロリンで（を）他の任意の残基を（で）置換するもの、（c）正荷電側鎖を有する残基、例えばリジル、アルギニル、またはヒスチジルで（を）負荷電残基、例えばグルタミルまたはアスパルチルを（で）置換するもの、または（d）嵩高い側鎖を有する残基、例えばフェニルアラニンで（を）側鎖を有しないもの、例えばグリシンを（で）置換するもの、この場合は、（e）硫酸化部位および/またはグリコシル化部位の数を増加させることによるものであるだろう。

【００９０】

例えば、あるアミノ酸残基を、生物学的および/または化学的に類似する別のアミノ酸残基で置き換えることは、当業者には保存的置換として公知である。例えば保存的置換は、ある疎水性残基を別の疎水性残基に置き換えること、またはある極性残基を別の極性残基に置き換えることであるだろう。置換としては、例えばGly、Ala; Val、Ile、Leu; Asp、Glu; Asn、Gln; Ser、Thr; Lys、Arg;およびPhe、Tyrなどの組合せが挙げられる。明示的に開示される各配列のそのような保存的置換変異は、本明細書に記載のペプチドに包含される。

【００９１】

いくつかの態様では、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、またはSEQ ID NO:58、SEQ ID NO:65に対して少なくとも約60％、70％、80％、または90％の配列同一性を有するポリペプチドが開示される。例えば本開示のポリペプチドは、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、もしくは8つのアミノ酸置換（保存的置換または非保存的置換）または1～3個のアミノ酸残基の欠失もしくは挿入を有することができる。

【００９２】

本明細書に開示するとおり、本開示のポリペプチドのアミノ酸配列は、SEQ ID NO:1と、少なくとも60％、65％、70％、71％、72％、73％、74％、75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％、または100％の相同性を有しうる（例え

ば配列は付加、欠失、および/または置換を含有しうる）。いくつかの態様において、ポリペプチド配列は、アミノ酸配列SEQ ID NO:2；SEQ ID NO:3；SEQ ID NO:4；SEQ ID NO:5；SEQ ID NO:6；SEQ ID NO:7；SEQ ID NO:8；SEQ ID NO:9；SEQ ID NO:10；SEQ ID NO:11；SEQ ID NO:12；SEQ ID NO:13；SEQ ID NO:14；SEQ ID NO:15；SEQ ID NO:16；SEQ ID NO:17；SEQ ID NO:18；SEQ ID NO:19；SEQ ID NO:20；SEQ ID NO:21；SEQ ID NO:22；SEQ ID NO:23；SEQ ID NO:24；SEQ ID NO:25；SEQ ID NO:26；SEQ ID NO:27；SEQ ID NO:28；SEQ ID NO:29；SEQ ID NO:30；SEQ ID NO:31；SEQ ID NO:32；SEQ ID NO:33；SEQ ID NO:34；SEQ ID NO:35；SEQ ID NO:36；SEQ ID NO:37；SEQ ID NO:38；SEQ ID NO:39；SEQ ID NO:40；SEQ ID NO:41；SEQ ID NO:42；SEQ ID NO:43；SEQ ID NO:44；SEQ ID NO:45；SEQ ID NO:46；SEQ ID NO:47；SEQ ID NO:48；SEQ ID NO:49；SEQ ID NO:50；SEQ ID NO:51；SEQ ID NO:52；SEQ ID NO:53；SEQ ID NO:54；SEQ ID NO:55；SEQ ID NO:56；SEQ ID NO:57；SEQ ID NO:58；または少なくとも約60％、70％、80％、もしくは90％の配列同一性（すなわち1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、または8つのアミノ酸置換）を有するそれらの保存的変異体を含むことができる。

【００９３】

本明細書に開示するとおり、本開示のポリペプチドのアミノ酸配列は、SEQ ID NO:1と、少なくとも60％、65％、70％、71％、72％、73％、74％、75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％、または100％の相同性を有することができる（例えば配列は付加、欠失、および/または置換を含有しうる）。いくつかの態様において、ポリペプチド配列は、アミノ酸配列SEQ ID NO:59；SEQ ID NO:60；SEQ ID NO:61；SEQ ID NO:62；SEQ ID NO:63；SEQ ID NO:64；SEQ ID NO:65；SEQ ID NO:66；SEQ ID NO:67；SEQ ID NO:68；SEQ ID NO:69；SEQ ID NO:70；SEQ ID NO:71；SEQ ID NO:72；SEQ ID NO:73；SEQ ID NO:74；SEQ ID NO:75；SEQ ID NO:76；SEQ ID NO:77；または少なくとも約60％、70％、80％、もしくは90％の配列同一性（すなわち1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、または8つのアミノ酸置換）を有するそれらの保存的変異体を含むことができる。

【００９４】

一定の態様において、本開示のポリペプチドは、本明細書に開示するポリペプチドのいずれか（例えばSEQ ID NO:1、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:58、またはSEQ ID NO:65）の残基18～23またはそれらの残基のうちの少なくとも1、2、3、4、もしくは5個に対応するアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含むことができる。例えばいくつかの態様において、本開示のポリペプチドは、アミノ酸配列SEQ ID NO:25；SEQ ID NO:26；SEQ ID NO:27；SEQ ID NO:28；SEQ ID NO:29；SEQ ID NO:30；SEQ ID NO:31；SEQ ID NO:32；SEQ ID NO:33；SEQ ID NO:48；SEQ ID NO:49；SEQ ID NO:50；SEQ ID NO:51；SEQ ID NO:52；または少なくとも約60％、70％、80％、または90％の配列同一性（すなわち1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、または8つのアミノ酸置換）を有するそれらの保存的変異体を含むことができる。

【００９５】

一定の態様において、本開示のポリペプチドは、本明細書に開示するポリペプチドのいずれか（例えばSEQ ID NO:1、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、またはSEQ ID NO:65）の残基1～5またはそれらの残基のうちの少なくとも1、2、3、もしくは4個に対応するアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含むことができる。例えばいくつかの態様において、本開示のポリペプチドは、アミノ酸配列SEQ ID NO:34；SEQ ID NO:35；SEQ ID NO:36；SEQ ID NO:38；SEQ ID NO:42；SEQ ID NO:44；SEQ ID NO:45；SEQ ID NO:46；SEQ ID NO:53；SEQ ID NO:54；SEQ ID NO:55；または少なくとも約60％、70％、80％、または90％の配列同一性（すなわち1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、または8つのアミノ酸置換）を有するそれらの保存的変異体を含むことができる。

【００９６】

特定の態様において、本開示のポリペプチドは、本明細書に開示するポリペプチドのい

ずれか（例えばSEQ ID NO:1、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58）の残基1にアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含むことができる。例えば、ポリペプチドの配列が上記の配列から逸脱する場合、プロリンを使って残基1のセリンを置き換えることができる。いくつかの態様において、本開示のポリペプチドは、アミノ酸配列SEQ ID NO:1；SEQ ID NO:36；SEQ ID NO:56；SEQ ID NO:57；SEQ ID NO:58；または少なくとも約60％、70％、80％、または90％の配列同一性（すなわち1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、または8つのアミノ酸置換）を有するそれらの保存的変異体を含むことができる。

【００９７】

一定の態様において、本開示のポリペプチドは、本明細書に開示するポリペプチドのいずれか（例えばSEQ ID NO:1、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、またはSEQ ID NO:58）の残基6～17またはそれらの残基のうちの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、もしくは12個に対応するアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含むことができる。例えばいくつかの態様において、本開示のポリペプチドは、アミノ酸配列SEQ ID NO:35；SEQ ID NO:37；SEQ ID NO:39；SEQ ID NO:41；SEQ ID NO:43；SEQ ID NO:46；SEQ ID NO:47；または少なくとも約60％、70％、80％、または90％の配列同一性（すなわち1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、または8つのアミノ酸置換）を有するそれらの保存的変異体を含むことができる。

【００９８】

一定の態様において、ポリペプチドの配列が上記の配列から逸脱する場合、ポリペプチドは複数アミノ酸領域（a multiple amino acid region）の欠失を含むことができる。欠失は、例えばアミノ末および/またはカルボキシ末における、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10アミノ酸、特に1、2、3、4、または5アミノ酸、特に1、2、または3アミノ酸の外部欠失であることができる。欠失は、SEQ ID NO:1の残基2～22などの、1、2、3、4、5、または6アミノ酸、特に1、2、3、4、または5アミノ酸の内部欠失であることができる。

【００９９】

特定の態様において、ポリペプチドは、本明細書に開示するポリペプチドのいずれか（例えばSEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:36）の残基18～23またはそれらの残基のうちの少なくとも1、2、3、4、もしくは5個に対応するアミノ酸欠失を有するアミノ酸配列を含むことができる。例えばいくつかの態様において、本開示のポリペプチドは、アミノ酸配列SEQ ID NO:56；SEQ ID NO:57；または少なくとも約60％、70％、80％、または90％の配列同一性（すなわち1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、または8つのアミノ酸置換）を有するそれらの保存的変異体を含むことができる。いくつかの態様において、ポリペプチドは、SEQ ID NO:1、または少なくとも約60％、70％、80％、もしくは90％の配列同一性（すなわち1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、または8つのアミノ酸置換）を有するその保存的変異体のうちの少なくとも残基2～17を含むことができる。いくつかの態様において、ポリペプチドは、SEQ ID NO:36、または少なくとも約60％、70％、80％、もしくは90％の配列同一性（すなわち1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、または8つのアミノ酸置換）を有するその保存的変異体のうちの少なくとも残基1～17を含む。

【０１００】

一定の態様において、ポリペプチドの配列が上記の配列から逸脱する場合、ポリペプチドは、アミノ末および/またはカルボキシ末において、上記の配列から1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10アミノ酸だけ、特に1、2、3、4、または5アミノ酸だけ、特に1、2、または3アミノ酸だけ、長くなりうる。

【０１０１】

本明細書に開示するとおり、ポリペプチドは、提供される配列のアミノ酸の置換を含有することができる。これらの置換は本開示の配列中に存在するアミノ酸に類似しうる（すなわち保存的変化）（例えばある酸性アミノ酸の代わりに別の酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸の代わりに塩基性アミノ酸、大きな疎水性アミノ酸の代わりに大きな疎水性アミノ酸など）。置換はアミノ酸類似体およびアミノ酸ミメティックも含むことができる。一特定

態様において、置換はらせん性またはらせん形成を増進すると予想される。
【０１０２】
ポリペプチドは、C末および/またはN末に、キャッピング部分、保護部分、および/または安定化部分を有することができる。そのような部分は当技術分野において周知であり、例えばアミド化およびアセチル化が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。ポリペプチドは任意のアミノ酸において脂質化またはグリコシル化（すなわち糖ペプチド）されることもできる。特にこれらのポリペプチドは薬としての能力を改善するためにPEG化されうる。
【０１０３】
本開示のポリペプチドは、本来のL-アミノ酸の代わりに少なくとも1つのD-アミノ酸を含むこともできる。いくつかの態様において、本開示のポリペプチドはD-アミノ酸だけを含むことができる。一特定態様において、本開示のポリペプチドは、約1、2、3、および/または4個（例えば3個の）連続的L-アミノ酸で隔てられたD-アミノ酸を含む。
【０１０４】
ポリペプチドは、標準アミノ酸の誘導体、例えば限定するわけではないがフッ素化残基、または非標準アミノ酸（例えばベータ-アミノ酸）を、少なくとも1つ含有することができる。さらに別の態様において、ペプチドはヘッドトゥーテールで環化しているか、数残基が局所的に環化していてもよい。
【０１０５】
組換えベクターおよび発現システム
一定の態様において、本開示は、本明細書に開示するペプチドをコードする核酸を含む組換えベクターに関する。一定の態様において、本開示は、本明細書に開示するペプチドをコードする核酸を含む組換えベクターを含む発現システムに関する。一定の態様において、本開示は、本明細書に開示するペプチドをコードする核酸を含む組換えベクターを含む細胞に関する。
【０１０６】
核酸分子に関して使用する場合、「組換え」という用語は分子生物学的技法を使って1つに結合された核酸のセグメントで構成される核酸分子を指す。タンパク質またはポリペプチドに関して使用する場合、「組換え」という用語は、組換え核酸分子を使って発現されるタンパク質分子を指す。
【０１０７】
「ベクター」または「発現ベクター」という用語は、所望のコード配列と、機能的に連結されたコード配列の、特定宿主生物または特定発現システム、例えば細胞発現システムもしくは無細胞発現システムにおける発現に必要な、適当な核酸配列とを含有する、組換え核酸を指す。原核生物における発現に必要な核酸配列には、通常、プロモーター、オペレーター（任意）、およびリボソーム結合部位が、しばしば他の配列と共に含まれる。真核細胞はプロモーター、エンハンサー、ならびに終結およびポリアデニル化シグナルを利用することが知られている。
【０１０８】
タンパク質「発現システム」はインビボシステムおよびインビトロ（無細胞）システムを指す。組換えタンパク質発現のためのシステムは、典型的には、鋳型を含有するDNA発現ベクターのトランスフェクトされた細胞を利用する。細胞を、それらが所望のタンパク質を翻訳するような条件下で培養する。発現したタンパク質を抽出してから精製に付す。原核細胞および真核細胞を使ったインビボタンパク質発現システムは周知である。一部のタンパク質は、変性剤およびタンパク質再フォールディング手順を使って回収される。インビトロ（無細胞）タンパク質発現システムは、典型的には、全細胞の翻訳適合抽出物（translation-compatible extract）、または転写、翻訳、および任意で翻訳後修飾に十分な構成要素、例えばRNAポリメラーゼ、調節タンパク質因子、転写因子、リボソーム、tRNAコファクター、アミノ酸、およびヌクレオチドを含有する組成物を使用する。発現ベクターの存在下で、これらの抽出および構成要素は、関心対象のタンパク質を合成すること

ができる。無細胞システムは典型的にはプロテアーゼを含有せず、修飾アミノ酸によるタンパク質の標識を可能にする。一部の無細胞システムは、コードされた翻訳用構成要素を発現ベクターに組み込んでいる。例えばShimizu et al., Cell-free translation reconstituted with purified components, 2001, Nat. Biotechnol., 19, 751-755およびAsahara&Chong, Nucleic Acids Research, 2010, 38(13):e141を参照されたい。これらの文献はどちらもその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【０１０９】

「選択可能マーカー」は、人工的な選択または同定に適した形質を付与するポリペプチドをコードする組換えベクター中に導入された核酸（レポーター遺伝子）である。例えばベータ-ラクタマーゼは抗生物質耐性を付与し、これにより、ベータ-ラクタマーゼを発現する生物は、成長培地中に抗生物質が存在しても生き残ることが可能になる。別の例はチミジンキナーゼである。これは宿主をガンシクロビル選択に対して感受性にする。これは、予期される色の有無に基づいて必要な細胞と不必要な細胞とを識別することを可能にするスクリーニング可能マーカーであってもよい。例えばlac-z遺伝子は、X-gal（5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシド）の存在下で青色を与えるベータ-ガラクトシダーゼ酵素を生産する。組換え挿入がlac-z遺伝子を不活化すると、その結果生じるコロニーは無色になる。1種または複数種の選択可能マーカー、例えば成長に必要な特定化合物を合成することができないという発現生物の性質（栄養要求性）を補完することができる酵素、およびある化合物を成長にとって有毒な別の化合物に変換できるものが存在してもよい。URA3、オロチジン5'-リン酸デカルボキシラーゼは、ウラシル生合成にとって必要であり、ウラシルに対して栄養要求性であるura3変異型を補完することができる。また、URA3は5-フルオロオロト酸を毒性化合物5-フルオロウラシルに変換する。

【０１１０】

考えられる他の選択可能マーカーとして、抗細菌耐性を付与するまたは蛍光タンパク質を発現する任意の遺伝子が挙げられる。例として、以下の遺伝子が挙げられるが、それらに限定されるわけではない:amp^r、cam^r、tet^r、ブラストサイジン^r、neo^r、hyg^r、abx^r、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼII型遺伝子（nptII）、p-グルクロニダーゼ（gus）、緑色蛍光タンパク質（gfp）、egfp、yfp、mCherry、p-ガラクトシダーゼ（lacZ）、lacZa、lacZAM15、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（cat）、アルカリホスファターゼ（phoA）、細菌ルシフェラーゼ（luxAB）、ビアラホス耐性遺伝子（bar）、ホスホマンノースイソメラーゼ（pmi）、キシロースイソメラーゼ（xylA）、アラビトールデヒドロゲナーゼ（atlD）、UDP-グルコース:ガラクトース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼI（galT）、アントラニル酸シンターゼのフィードバック非感受性αサブユニット（OASA1D）、2-デオキシグルコース（2-DOGR）、ベンジルアデニン-N-3-グルクロニド、大腸菌（E. coli）スレオニンデアミナーゼ、グルタミン酸-1-セミアルデヒドアミノトランスフェラーゼ（GSA-AT）、D-アミノ酸オキシダーゼ（DAAO）、塩耐性遺伝子（rstB）、フェレドキシン様タンパク質（pflp）、トレハロース-6-Pシンターゼ遺伝子（AtTPS1）、リジンラセマーゼ（lyr）、ジヒドロジピコリン酸シンターゼ（dapA）、トリプトファンシンターゼベータ1（AtTSB1）、デハロゲナーゼ（dhlA）、マンノース-6-リン酸レダクターゼ遺伝子（M6PR）、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ（HPT）、およびD-セリンアンモニアリアーゼ（dsdA）。

【０１１１】

「標識」とは、抗体またはタンパク質などの別の分子に、その分子の検出を容易にするために直接または間接的にコンジュゲートされる、検出可能な化合物または組成物を指す。標識の非限定的具体例として、蛍光タグ、酵素結合、および放射性同位体が挙げられる。一例において、「標識受容体」とは、受容体における異種ポリペプチドの組込みを指す。標識としては、放射標識アミノ酸の組込み、または目印が付けられたアビジン（例えば光学的方法または比色法によって検出することができる蛍光マーカーまたは酵素活性を含有するストレプトアビジン）によって検出することができるビオチン化部分の、ポリペプチドへの共有結合が挙げられる。ポリペプチドおよび糖タンパク質を標識するさまざまな

方法が当技術分野では公知であり、それらを使用しうる。ポリペプチド用標識の例として、以下の標識が挙げられるが、それらに限定されるわけではない:放射性同位体または放射性ヌクレオチド（^{35}Sまたは^{131}Iなど）、蛍光標識（フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ローダミン、ランタニド発光体（lanthanide phosphor）など）、酵素標識（セイヨウワサビペルオキシダーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼなど）、化学発光マーカー、ビオチニル基、二次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ（ロイシンジッパーペア配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグなど）、またはガドリニウムキレート化合物などの磁気作用物質。いくつかの態様において、標識は、潜在的な立体障害を低減するために、さまざまな長さのスペーサーアームによって取り付けられる。

【０１１２】

一定の態様において、本開示は、本明細書に開示する配列またはその変異体もしくは融合物を含む組換えポリペプチドであって、アミノ酸配列のアミノ末端または炭素末端が、任意で、異種アミノ酸配列、標識、またはレポーター分子に取り付けられている、組換えポリペプチドに関する。

【０１１３】

一定の態様において、本開示は、本明細書に開示するポリペプチドまたはそのキメラタンパク質をコードする核酸を含む組換えベクターに関する。

【０１１４】

一定の態様において、組換えベクターは、任意で、哺乳類、ヒト、昆虫、ウイルス、細菌、細菌プラスミド、酵母関連の複製起点または遺伝子、例えば遺伝子またはレトロウイルス遺伝子またはレンチウイルスLTR、TAR、RRE、PE、SLIP、CRS、およびINSヌクレオチドセグメントまたはtat、rev、nef、vif、vpr、vpu、およびvpxから選択される遺伝子またはgag、pol、およびenvから選択される構造遺伝子を含む。

【０１１５】

一定の態様において、組換えベクターは、任意で、選択可能マーカー領域、lacオペロン、CMVプロモーター、ハイブリッドニワトリBアクチン/CMVエンハンサー（CAG）プロモーター、tacプロモーター、T7 RNAポリメラーゼプロモーター、SP6 RNAポリメラーゼプロモーター、SV40プロモーター、配列内リボソーム進入部位（IRES）配列、シス作用性ウッドチャック転写後調節要素（WPRE, woodchuck post regulatory regulatory element）、スキャフォールド付着領域（SAR）、逆方向末端反復（ITR）、FLAGタグコード領域、c-mycタグコード領域、金属アフィニティータグコード領域、ストレプトアビジン結合性ペプチドタグコード領域、ポリHisタグコード領域、HAタグコード領域、MBPタグコード領域、GSTタグコード領域、ポリアデニル化コード領域、SV40ポリアデニル化シグナル、SV40複製起点、Col E1複製起点、f1起点、pBR322起点またはpUC起点、TEVプロテアーゼ認識部位、loxP部位、Creリコンビナーゼコード領域、またはマルチクローニング部位、例えば5、6もしくは7つまたはそれ以上の制限部位を50または60ヌクレオチド未満の連続するセグメント内に有するもの、または20もしくは30ヌクレオチド未満の連続するセグメント内に3つもしくは4つまたはそれ以上の制限部位を有するものなどといった、遺伝子ベクター要素（核酸）を含む。

【０１１６】

ワクチン組成物

本開示のポリペプチドのいずれかを薬学的に許容される媒体、希釈剤、または賦形剤中に含有するワクチン組成物も開示される。ワクチン組成物は、1つまたは複数の免疫賦活薬を、必要なわけではないものの、任意で含有する。免疫賦活薬とは、外来抗原に対する（抗体媒介性または細胞媒介性の）免疫応答を強化または増強する本質的に任意の物質を指す。免疫賦活薬の好ましい一タイプはアジュバントである。ワクチンは、任意で、薬学的に許容されるアジュバントを含有することができる。

【０１１７】

多くのアジュバントは、ポリペプチドを迅速な異化から保護するように設計された物質

、例えば水酸化アルミニウムまたは鉱油、および免疫応答の刺激因子、例えばリピドA、百日咳菌（Bortadella pertussis）由来タンパク質または結核菌（Mycobacterium tuberculosis）由来タンパク質を含有する。アジュバントは、代謝可能な油と乳化剤のサブミクロン水中油型エマルションであってもよい。例えばアジュバントは、スクアレン、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート（Tween（商標）80）、およびソルビタントリオレートのサブミクロン水中油型エマルションである、MF59（商標）を含みうる。アジュバントは、TLR4アゴニストMPL（3-O-デスアシル-4'-モノホスホリルリピドA）とアルミニウム塩の組合せ、例えばAS04（GlaxoSmithKline、ペンシルベニア州フィラデルフィア）であってもよい。一定のアジュバントは、例えばフロイント不完全アジュバント（Difco Laboratories、ミシガン州デトロイト）、Merck Adjuvant 65（Merck and Company、ニュージャージー州ローウェイ）、AS01、AS02、AS03およびAS04（GlaxoSmithKline、ペンシルベニア州フィラデルフィア）、アルミニウム塩、例えば水酸化アルミニウムゲル（アラム（alum））またはリン酸アルミニウム、カルシウム、鉄または亜鉛の塩、アシル化チロシンの不溶性懸濁液、アシル化糖類、カチオン性またはアニオン性に誘導体化された多糖、ポリホスファゼン、生分解性マイクロスフェア、モノホスホリルリピドA、およびquil Aなどとして市販されている。GM-CSF、インターロイキン-2、-7、-12、および他の類似の成長因子などのサイトカインもアジュバントとして使用しうる。

【０１１８】

アジュバント組成物は、（抗体媒介性または細胞媒介性の）抗炎症性免疫応答を誘導する組成物であることができる。したがって、高レベルの抗炎症性サイトカイン（抗炎症性サイトカインとしては、インターロイキン4（IL-4）、インターロイキン5（IL-5）、インターロイキン10（IL-10）、およびトランスフォーミング成長因子ベータ（TGFβ）を挙げることができるが、それらに限定されるわけではない。任意で、抗炎症性応答はCD4＋Tヘルパー細胞によって媒介されるであろう。細菌フラジェリンはアジュバント活性を有することが示されている（McSorley et al., J. Immunol. 169:3914-19, 2002）。アジュバント組成物中に使用することができるフラジェリンタンパク質をコードするポリペプチド配列も開示される。

【０１１９】

任意で、アジュバントはリポ多糖（LPS）応答性を増加させる。例示的アジュバントとして、モノホスホリルリピドA（MPL）、アミノアルキルグルコサミニド4-リン酸（AGP）、例えば限定するわけではないが、RC-512、RC-522、RC-527、RC-529、RC-544、およびRC-560（Corixa、モンタナ州ハミルトン）が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【０１２０】

加えて、アジュバント組成物は、主としてTh1型の免疫応答を誘導するものであることができる。高レベルのTh1型サイトカイン（例えばIFN-γ、TNFα、IL-2、およびIL-12）は、投与された抗原に対する細胞媒介性免疫応答の誘導に有利に働く傾向がある。対照的に、高レベルのTh2型サイトカイン（例えばIL-4、IL-5、IL-6、およびIL-10）は、体液性免疫応答の誘導に有利に働く傾向がある。ここに提供するワクチンの適用後に、対象は、Th1型応答およびTh2型応答を含む免疫応答を支えるであろう。任意で、Th1型サイトカインのレベルは、Th2型サイトカインのレベルより高度に増加するであろう。これらのサイトカインのレベルは、標準的アッセイを使って容易にアッセイしうる。主としてTh1型の応答を引き出すための一定のアジュバントとして、例えばモノホスホリルリピドA、好ましくは3-デ-O-アシル化モノホスホリルリピドAと、Corixa Corporation（ワシントン州シアトル）から入手可能なアルミニウム塩アジュバントとの組合せが挙げられる。CpG含有オリゴヌクレオチド（CpGジヌクレオチドがメチル化されていないもの）も主としてTh1応答を誘導する。別のアジュバントは、Quil Aなどのサポニンまたはその誘導体、例えばQS21およびQS7（Aquila Biopharmaceuticals Inc.、マサチューセッツ州フレーミングハム）、エスチン、ジギトニン、またはカスミソウ属（Gypsophila）もしくはキノア（Chenopodium quinoa）サポニンを含む。

【０１２１】
本開示のワクチン組成物において使用するためのさらなる例示的アジュバントとして、Montamide ISA 720（Seppic、フランス）、SAF（Chiron、米国カリフォルニア州）、ISCOMS（CSL）、MF-59（Chiron）、SBASシリーズのアジュバント（例えばSBAS-2またはSBAS-4、GlaxoSmithKline（ペンシルベニア州フィラデルフィア）から入手可能）、Detox（Enhanzyn（商標））（Corixa、モンタナ州ハミルトン）、RC-529（Corixa、モンタナ州ハミルトン）、および他のアミノアルキルグルコサミニド4-リン酸（AGP）が挙げられる。
【０１２２】
薬学的組成物
本開示のポリペプチドは薬学的に許容される担体と組み合わせて治療的に使用することができる。当業者にはよく知られているであろうとおり、担体は、当然、活性成分のいかなる分解も最小限にし、対象におけるいかなる有害副作用も最小限にするように、選択されるであろう。
【０１２３】
本開示のポリペプチドは溶液状態であるか、懸濁状態であるか、微粒子、リポソーム、または細胞に組み込まれるか、錠剤、ゲル剤、または坐剤に成形されうる。適切な担体およびそれらの製剤は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy（22nd ed.）eds. Loyd V.Allen, Jr., et al., Pharmaceutical Press, 2012に記載されている。典型的には、製剤には、製剤を等張性にするために、適当な量の薬学的に許容される塩を使用する。薬学的に許容される担体の例として、食塩水、リンゲル液、およびデキストロース溶液が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。溶液のpHは好ましくは約5～約8、より好ましくは約7～約7.5である。さらなる担体として、徐放性調製物、例えば抗体を含有する固形疎水性ポリマーの半透過性マトリックスであって、マトリックスがフィルム、リポソーム、または微粒子などの造形品の形態にあるものが挙げられる。例えば投与経路および投与される組成物の濃度に依存して、一定の担体がより好ましい場合があることは、当業者には明らかであるだろう。
【０１２４】
薬学的担体は当業者に公知である。それらは、最も典型的には、ヒトにワクチンを投与するための標準的担体、例えば無菌水、食塩水、および生理的pHの緩衝溶液などといった溶液であるだろう。薬学的組成物は、ワクチンに加えて担体、増粘剤、希釈剤、緩衝剤、保存剤、表面活性剤などを含みうる。薬学的組成物は、抗微生物剤、抗炎症剤、麻酔薬などの1つまたは複数の活性成分も含みうる。本開示のポリペプチドは、好ましくは、鼻腔内、筋肉内、皮下、経皮、または舌下投与による送達用に製剤化される。
【０１２５】
非経口投与用の調製物としては、無菌の水性または非水性溶液、懸濁液、およびエマルションが挙げられる。非水性溶液の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである。水性担体としては、食塩水および緩衝媒質を含む、水、アルコール/水溶液、エマルション、または懸濁液が挙げられる。非経口媒体としては、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸加リンゲル、または固定油が挙げられる。静脈内媒体としては、水分栄養補充剤、電解質補充剤（例えばリンゲルデキストロースに基づくもの）などが挙げられる。例えば抗微生物剤、酸化防止剤、キレート剤、および不活性ガスなどといった、保存剤その他の添加剤も存在しうる。
【０１２６】
経口投与形態の場合は、本開示のポリペプチドを、賦形剤、安定剤、または不活性希釈剤などの適切な添加剤と混合し、従来の方法を使って、錠剤、コート錠、硬カプセル剤、水溶液、アルコール溶液、または油性溶液などの適切な投与形態にする。適切な不活性担体の例は、アラビアガム、マグネシア、炭酸マグネシウム、リン酸カリウム、ラクトース、グルコース、またはデンプン、特にトウモロコシデンプンである。この場合、調製は乾燥顆粒としても湿顆粒としても実行することができる。適切な油性の賦形剤または溶媒は

、植物油または動物油、例えばヒマワリ油またはタラ肝油である。水溶液またはアルコール溶液用の適切な溶媒は、水、エタノール、糖溶液、またはそれらの混合物である。ポリエチレングリコールおよびポリプロピレングリコールも、他の投与形態のためのさらなる補助剤として有用である。即時放出錠剤としては、これらの組成物は、微結晶セルロース、リン酸二カルシウム、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、およびラクトース、ならびに/または当技術分野において公知の他の賦形剤、結合剤、増量剤、崩壊剤、希釈剤、および潤滑剤を含有しうる。

【０１２７】

鼻エアロゾルまたは吸入によって投与される場合、本開示のポリペプチドは、薬学的製剤の技術分野において周知の技法に従って調製することができ、ベンジルアルコールまたは他の適切な保存剤、バイオアベイラビリティを強化するための吸収促進剤、フルオロカーボン、および/または当技術分野において公知の他の可溶化剤もしくは分散剤を使って、食塩水中の溶液として調製しうる。エアロゾルまたはスプレーの形態で投与するための適切な薬学的製剤は、例えば、薬学的に許容される溶媒、例えばエタノールもしくは水、またはそのような溶媒の混合物中の、本開示の化合物またはそれらの生理学的に容認できる塩の溶液、懸濁液またはエマルションである。必要であれば、製剤は、界面活性剤、乳化剤、および安定剤、ならびに噴射剤などの他の薬学的補助剤を、さらに含有しうる。

【０１２８】

皮下投与または静脈内投与の場合は、本開示のポリペプチドを、所望であればそのための従来の物質、例えば可溶化剤、乳化剤、またはさらなる補助剤と共に、溶液、懸濁液、またはエマルションにする。本開示のポリペプチドを凍結乾燥し、得られた凍結乾燥物を、例えば注射調製物または注入調製物の生産に使用してもよい。適切な溶媒は、例えば水、生理食塩溶液、もしくはアルコール、例えばエタノール、プロパノール、グリセロール、糖溶液、例えばグルコース溶液もしくはマンノース溶液、または前述したさまざまな溶媒の混合物である。注射可能な溶液または懸濁液は、適切な非毒性の、非経口的に許容される希釈剤または溶媒、例えばマンニトール、1,3-ブタンジオール、水、リンゲル液、もしくは等張塩化ナトリウム溶液、または適切な分散もしくは湿潤および懸濁化剤、例えば合成モノグリセリドまたは合成ジグリセリドを含む無菌無刺激性固定油およびオレイン酸を含む脂肪酸を使って、公知の技術に従って製剤化しうる。

【０１２９】

坐剤の形態で直腸投与される場合、製剤は、ポリペプチドを、常温では固形物であるが、直腸腔では液化しかつ/または溶解して薬物を放出する適切な非刺激性賦形剤、例えばカカオ脂、合成グリセリドエステル、またはポリエチレングリコールと混合することによって調製されうる。

【０１３０】

本開示のポリペプチドの非経口投与は、もし使用するのであれば、一般的には注射を特徴とする。注射剤は、従来の形態で、溶液または懸濁液として、注射前に液体に溶解または懸濁させるのに適した固形として、またはエマルションとして調製することができる。

【０１３１】

一定の態様において、本開示のポリペプチドを含む組成物は持続放出製剤でありうることが想定される。典型的な持続放出製剤は腸溶コーティングを利用する。典型的には、消化系において経口薬が吸収される位置を制御する障壁が、経口薬に適用される。腸溶コーティングは、薬が小腸に到達する前に放出されてしまうのを防止する。腸溶コーティングは、多糖のポリマー、例えばマルトデキストリン、キサンタン、スクレログルカンデキストラン、デンプン、アルギナート、プルラン、ヒアルロン酸（hyaloronic acid）、キチン、キトサンなど;他の天然ポリマー、例えばタンパク質（アルブミン、ゼラチンなど）、ポリ-L-リジン;ポリ（アクリル酸）ナトリウム;ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリレート）（例えばポリ（ヒドロキシエチルメタクリレート））;カルボキシポリメチレン（例えばCarbopol（商標））;カルボマー;ポリビニルピロリドン;ゴム、例えばグアーガム、アラビアガム、カラヤガム、ガティガム、ローカストビーンガム、タマリンドガム、ジ

ェランガム、トラガントガム、寒天、ペクチン、グルテンなど;ポリ（ビニルアルコール）;エチレンビニルアルコール;ポリエチレングリコール（PEG）;およびセルロースエーテル、例えばヒドロキシメチルセルロース（HMC）、ヒドロキシエチルセルロース（HEC）、ヒドロキシプロピルセルロース（HPC）、メチルセルロース（MC）、エチルセルロース（EC）、カルボキシエチルセルロース（CEC）、エチルヒドロキシエチルセルロース（EHEC）、カルボキシメチルヒドロキシエチルセルロース（CMHEC）、ヒドロキシプロピルメチル-セルロース（HPMC）、ヒドロキシプロピルエチルセルロース（HPEC）およびカルボキシメチルセルロースナトリウム（Na-CMC）;ならびに上記ポリマーのいずれかのコポリマーおよび/または（単純）混合物を含有しうる。上述のポリマーの一部は標準的技法によってさらに架橋しうる。

【０１３２】

ポリマーの選択は、本開示の組成物中に使用される活性成分/薬物の性質および所望する放出速度によって決まることになる。特に、例えばHPMCの場合は、分子量が高いほど組成物からの薬物の放出速度が遅くなることは、当業者には理解されるであろう。さらにまた、HPMCの場合は、メトキシル基およびヒドロキシプロポキシ基の置換度が異なると、組成物からの薬物の放出速度が変化することになる。この点で上述のように、本開示の組成物はコーティングの形態で提供することが望ましく、その場合、ポリマー担体は、ある特定の必要なまたは所望の放出プロファイルが生じるように、例えば分子量が異なる2種以上のポリマーの配合物を使って提供されるだろう。

【０１３３】

ポリラクチド、ポリグリコリド、およびそれらのコポリマーであるポリ（ラクチド-co-グリコリド）のマイクロスフェアを使って、徐放性タンパク質送達系を形成させることができる。本開示のポリペプチドは、水を媒体とするタンパク質と有機溶媒を媒体とするポリマーとによる油中水型エマルションの形成（エマルション法）、溶媒ベースのポリマー溶液に分散された固形タンパク質による油中固形物型（solid-in-oil）懸濁液の形成（懸濁法）、または溶媒ベースのポリマー溶液にタンパク質を溶解することによる方法（溶解法）を含むいくつかの方法によって、ポリ（ラクチド-co-グリコリド）マイクロスフェアデポーに捕捉することができる。循環する治療タンパク質のインビボ半減期を増加させ、免疫応答の機会を減少させるために、ポリ（エチレングリコール）をタンパク質に取り付けること（PEG化）ができる。

【０１３４】

リポソーム懸濁液（ウイルス抗原を標的とするリポソームを含む）も、薬学的に許容される担体を生産するための従来の方法によって調製しうる。これは、本開示による遊離のヌクレオシド、アシルヌクレオシドまたはリン酸エステルプロドラッグ型のヌクレオシド化合物の送達にとって適当でありうる。

【０１３５】

必要とされる組成物の正確な量は、対象の種、年齢、体重および全身状態、処置されるべきアレルギー障害の重症度、使用される特定核酸またはベクター、その投与様式などに依存して、対象ごとにさまざまであるだろう。したがって、すべての組成物について正確な量を指定することは不可能である。しかし本明細書における教示を考慮すれば、当業者であれば、日常的な実験を使って、適当な量を決定することができる。例えば、有効投薬量および組成物を投与するためのスケジュールは、実験的に決定することができ、そのような決定を下すことは、当技術分野における技能の範囲内である。組成物の投与のための投薬量範囲は、障害の症状に影響が及ぶ所望の効果を生じるのに十分な大きさのものである。投薬量は、望ましくない交差反応、アナフィラキシー反応などといった有害副作用を引き起こすほど大きくてはいけない。一般に、投薬量は患者の年齢、状態、性別、疾患の程度、投与経路、またはレジメンに他の薬物が含まれているかどうかによって変動し、当業者は投薬量を決定することができる。何らかの禁忌症がある場合、医師は投薬量を調節することができる。投薬量はさまざまであり、1日に1回または複数回、1日または数日にわたって投与することができる。所与の種類の薬学的製品の適当な投薬量については、文

献に指針を見いだすことができる。単独で使用される本開示のワクチンの典型的な投薬量は、上記の因子に依存して、ワクチン接種1回あたり約1μg/kg～100mg/kg体重またはそれ以上、例えば10μg/kg～50mg/kgまたは50μg/kg～10mg/kgの範囲にあるだろう。

【０１３６】

外用投与のための製剤として、軟膏、ローション剤、クリーム剤、ゲル剤、滴剤、坐剤、スプレー剤、液剤、および散剤が挙げられる。従来の薬学的担体、水性、粉末または油性基剤、増粘剤などが必要であるか、望ましいだろう。

【０１３７】

本開示のポリペプチドのいくつかは、潜在的に、塩酸、臭化水素酸、過塩素酸、硝酸、チオシアン酸、硫酸、およびリン酸などの無機酸、ならびにギ酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、乳酸、ピルビン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、およびフマル酸などの有機酸との反応、または水酸化ナトリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カリウムなどの無機塩基、ならびにモノ-、ジ-、トリアルキルおよびアリールアミンおよび置換エタノールアミンなどの有機塩基との反応によって形成される、薬学的に許容される酸付加塩または塩基付加塩として投与されうる。

【０１３８】

本開示の薬学的調製物は好ましくは単位剤形にあって、例えば箱、ブリスター、バイアル、ボトル、分包、アンプル、または他の任意の適切な単回投与用または複数回投与用のホルダーまたは容器（適正なラベルが貼付されていてもよい）に適切に梱包することができ、任意で、製品情報および/または使用説明を含む1つまたは複数のリーフレットが添付される。一般に、そのような単位投薬量は、1～1000mg、通常は5～500mgの少なくとも1つの本開示の化合物、例えば単位投薬量あたり約10、25、50、100、200、300、または400mgを、含有するであろう。

【０１３９】

本開示のポリペプチドは、既存のヒトワクチンを補って交差防御（cross protection）を改善するためにも使用することができる。それゆえに本開示の組成物は、不活化全ウイルス、スプリットウイルスワクチン、弱毒生デングウイルスワクチン、弱毒生ZIKVウイルスワクチンまたは他のウイルス様粒子（VLP）ワクチンならびにDNAワクチンを、さらに含む（またはそれらと組み合わせて投与する）ことができる。

【０１４０】

本開示の組成物は、抗ウイルス薬、抗生物質、ステロイド、鎮痛薬、抗炎症剤、抗ヒスタミン剤、またはそれらの任意の組合せのうちの1種類または複数種類を、さらに含む（またはそれらと組み合わせて投与する）ことができる。

【０１４１】

ある特定の態様において、本開示のポリペプチドは、抗ウイルス薬と共に投与する（同じ組成物に入れて組み合わせて投与するか、組み合わせて投与するが別々の組成物に入れて投与するか、逐次的に投与する）ことができる。そのような組合せにおいて使用することができる適切な抗ウイルス薬の例として、アセマンナン、アシクロビル、アシクロビルナトリウム、アデホビル、アロブジン、アルビルセプトスドトックス、アマンタジン塩酸塩、アラノチン、アリルドン、アテビルジンメシル酸塩、アブリジン、シドフォビル、シパムフィリン、シタラビン塩酸塩、デラビルジンメシル酸塩、デスシクロビル、ジダノシン、ジソキサリル、エドクスジン、エンビラデン、エンビロキシム、ファムシクロビル、ファモチン塩酸塩、フィアシタビン、フィアルリジン、ホサリラート、ホスカルネットナトリウム、ホスホネットナトリウム、ガンシクロビル、ガンシクロビルナトリウム、イドクスウリジン、ケトキサール、ラミブジン、ロブカビル、メモチン塩酸塩、メチサゾン、ネビラピン、ペンシクロビル、ピロダビル、リバビリン、リマンタジン塩酸塩、サキナビルメシル酸塩、ソマンタジン塩酸塩、ソリブジン、スタトロン、スタブジン、チロロン塩酸塩、トリフルリジン、バラシクロビル塩酸塩、ビダラビン、ビダラビンリン酸、ビダラビンリン酸ナトリウム、ビロキシム、ザルシタビン、ジドブジン、ジンビロキシムが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【０１４２】
ペプチドを投与する方法としては、非経口投与（例えば皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、および皮下）、硬膜外および粘膜（例えば鼻腔内および経口経路）が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。ある特定の態様では、ペプチドまたはキメラタンパク質が、筋肉内、静脈内、または皮下投与される。組成物は、任意の好都合な経路によって、例えば注入またはボーラス注射によって、上皮または皮膚粘膜ライニング（例えば口腔粘膜、直腸および腸粘膜など）を通した吸収によって投与することができ、生物学的に活性な他の作用物質と一緒に投与してもよい。
【０１４３】
投与は全身性または局所的であることができる。加えて、例えば吸入器またはネブライザーおよびエアロゾル化剤を含む製剤の使用によって、経肺投与を使用することもできる。例えば米国特許第6,019,968号、同第5,985,20号、同第5,985,309号、同第5,934,272号、同第5,874,064号、同第5,855,913号、同第5,290,540号および同第4,880,078号ならびにPCT公開番号WO 92/19244、WO 97/32572、WO 97/44013、WO 98/31346およびWO 99/66903を参照されたい。特定の一態様では、処置を必要とする領域に薬学的組成物を局所的に投与することが望ましいであろう。これは、限定するわけではないが、例えば局所注入、注射、またはインプラントの使用によって達成することができ、インプラントは、シラスティックメンブレン（sialastic membrane）などのメンブレンまたは繊維を含む、多孔性、非多孔性、またはゼラチン状材料でできている。
【０１４４】
一定の態様において、エアロゾル化剤または噴射剤は、ヒドロフルオロアルカン、1,1,1,2-テトラフルオロエタン、1,1,1,2,3,3,3-ヘプタフルオロプロパン、プロパン、n-ブタン、イソブテン、二酸化炭素、空気、窒素、亜酸化窒素、ジメチルエーテル、trans-1,3,3,3-テトラフルオロプロパ-1-エン、またはそれらの組合せである。
【０１４５】
製剤に使用される厳密な用量は、投与経路および状態の重篤度にも依存し、医師の判断および各患者の状況に応じて決定されるべきである。有効量は、インビトロ試験系または動物モデル試験系から導き出された用量応答曲線から推定することができる。ペプチドおよび融合タンパク質の場合、患者に投与される投薬量は典型的には0.0001mg/kg～100mg/kg患者体重である。好ましくは、患者に投与される投薬量は、0.0001mg/kg～20mg/kg、0.0001mg/kg～10mg/kg、0.0001mg/kg～5mg/kg、0.0001～2mg/kg、0.0001～1mg/kg、0.0001mg/kg～0.75mg/kg、0.0001mg/kg～0.5mg/kg、0.0001mg/kg～0.25mg/kg、0.0001～0.15mg/kg、0.0001～0.10mg/kg、0.001～0.5mg/kg、0.01～0.25mg/kg、または0.01～0.10mg/kg患者体重である。さらに、例えば脂質化などの修飾によって融合タンパク質の取り込みおよび組織浸透を強化することによって、タンパク質の投薬量および投与頻度を低減することができる。
【０１４６】
組成物には、薬学的組成物の製造に有用な原薬（bulk drug）組成物（例えば不純な組成物または非無菌組成物）と、単位剤形の調製に使用することができる薬学的組成物（すなわち対象または患者への投与に適した組成物）とが包含される。そのような組成物は、予防的または治療的に有効な量の、本明細書に開示する予防的および/もしくは治療的作用物質またはそれら作用物質の組合せと、薬学的に許容される担体とを含む。一定の態様において、薬学的組成物は、脂質、コレステロール、脂肪酸、脂肪酸アルキルエステル、リノール酸、オレイン酸　アラキドン酸、糖、多糖、シクロデキストリン、2-ヒドロキシプロピル（シクロデキストリン）またはそれらの組合せなどの可溶化剤である薬学的に許容される賦形剤を含有する。
【０１４７】
特定の一態様において、「薬学的に許容される」という用語は、動物、より具体的にはヒトにおける使用に関して、連邦政府もしくは州政府の規制当局によって承認されていること、または米国薬局方もしくは他の広く認識されている薬局方に記載があることを意味

する。「担体」という用語は、治療薬と一緒に投与される希釈剤、アジュバント（例えばフロイントの（完全および不完全）アジュバント、賦形剤または媒体を指す。そのような薬学的担体は、水および油などの無菌の液体、例えば落花生油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油など、石油、動物、植物、または合成起源のものであることができる。薬学的組成物が静脈内投与される場合、水が好ましい担体である。食塩溶液ならびにデキストロースおよびグリセロール水溶液も、液状担体として、特に注射用溶液剤に使用することができる。適切な薬学的賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、胡粉、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。所望であれば、組成物は、少量の湿潤もしくは乳化剤またはpH緩衝剤も含有することができる。これらの組成物は、溶液剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、徐放性製剤などの形態をとることができる。

【０１４８】

一態様は、本明細書に開示するペプチドが充填された1つまたは複数の容器を含む薬学的パックまたはキットを提供する。加えて、疾患の処置に有用な1つまたは複数の他の予防的または治療的作用物質も、薬学的パックまたはキットに含めることができる。一態様は、薬学的組成物の成分のうちの1つまたは複数が充填された1つまたは複数の容器を含む薬学的パックまたはキットを提供する。そのような容器には、任意で、医薬品または生物学的製剤の製造、使用または販売を規制する政府機関によって指定された形式で、ヒト投与のための製造、使用または販売の、当該機関による承認を反映した告知を添付することができる。

【０１４９】

一定の態様において、本開示では、本明細書に開示するタンパク質と薬学的に許容される賦形剤とを含む薬学的組成物が想定される。一定の態様において、本開示では、本明細書に開示するタンパク質を含む医薬の生産、および本明細書に開示する方法のための使用が想定される。

【０１５０】

一定の態様において、本開示は、本明細書に開示するタンパク質と薬学的に許容される賦形剤とを含む薬学的組成物に関する。一定の態様において、組成物は丸剤であるか、カプセルに入っているか、組成物は、例えばpH6～8の水性緩衝液である。一定の態様において、薬学的に許容される賦形剤は、充填剤、流動促進剤、結合剤、崩壊剤、潤滑剤、および糖から選択される。

【０１５１】

非経口注射に適した組成物は、生理学的に許容される無菌の水性または非水性の溶液、分散系、懸濁液、またはエマルション、および無菌の注射可能な溶液または分散系に再構成するための無菌粉末を含みうる。適切な水性または非水性の担体、希釈剤、溶媒、または媒体の例として、水、エタノール、ポリオール（プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、グリセロールなど）、それらの適切な混合物、植物油（オリーブ油、ゴマ油、およびビスコレオ（viscoleo））およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルが挙げられる。微生物の作用の防止は、さまざまな抗細菌および抗真菌作用物質、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などの添加によって制御することができる。等張剤、例えば糖類、塩化ナトリウムなどを含めることも望ましいであろう。注射可能な薬学的形態の持続的吸収は、吸収を遅延させる作用物質、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの使用によって生じさせることができる。

【０１５２】

経口投与用の固形剤形として、カプセル剤、錠剤、丸剤、散剤、および顆粒剤が挙げられる。そのような固形剤形において、タンパク質は、少なくとも1つの不活性な従来の賦形剤（または担体）、例えばクエン酸ナトリウムまたはリン酸二カルシウム、または（a）充填剤もしくは増量剤、例えばデンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、およびケイ酸、（b）結合剤、例えばカルボキシメチルセルロース、アルギナ

ート、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース、およびアラビアガムなど、（c）保水剤、例えばグリセロールなど、（d）崩壊剤、例えば寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモデンプンもしくはタピオカデンプン、アルギン酸、一定のシリケート、および炭酸ナトリウムなど、（e）溶解遅延剤、例えばパラフィンなど、（f）吸収加速剤、例えば4級アンモニウム化合物など、（g）湿潤剤、例えばセチルアルコールおよびモノステアリン酸グリセロールなど、（h）吸収剤、例えばカオリンおよびベントナイトなど、ならびに（i）潤滑剤、例えばタルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固形ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、またはそれらの混合物と、混合されうる。カプセル剤、錠剤、および丸剤の場合、剤形は緩衝剤も含みうる。

【０１５３】

経口投与用の液状剤形としては、薬学的に許容される乳剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、およびエリキシル剤が挙げられる。液状剤形は、タンパク質の他にも、当技術分野においてよく使用される不活性希釈剤、例えば水または他の溶媒、可溶化剤および乳化剤、例えばエチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、油、特に綿実油、落花生油、トウモロコシ胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油およびゴマ油、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコールおよびソルビタンの脂肪酸エステル、またはこれらの物質の混合物などを含有しうる。

【０１５４】

一定の態様では、2つの構成要素、すなわち本明細書に開示するタンパク質と薬学的担体とが、一緒に再構成される準備が既に整った混合乾燥形態で提供される、生産プロセスが想定される。別の態様では、本明細書に開示するタンパク質と薬学的担体とを混合して薬学的組成物を得ることが想定される。

【０１５５】

医薬組成物の提供は、単に適切な薬学的に許容される希釈剤を容器中の組成物に加えることによる一工程プロセスで可能である。一定の態様において、容器は、好ましくは、希釈剤との接触後に再構成された薬学的組成物を投与するためのシリンジである。一定の態様において、コーティングされたタンパク質（coated protein）をシリンジに充填し、次にそのシリンジを栓で閉じることができる。希釈剤は所望の最終濃度が達成される量で使用される。薬学的組成物は、イオン、緩衝剤、賦形剤、安定剤など、他の有用な構成要素を含有しうる。

【０１５６】

「乾燥」薬学的組成物は、典型的には、同等な市販品の含水量にほぼ一致しうる残存含水量しか有さず、例えば乾燥製品として約12％の水分を有する。通常、本発明の乾燥薬学的組成物は、好ましくは水分10％未満、より好ましくは水分5％未満、とりわけ水分1％未満の残存含水量を有する。薬学的組成物は、例えば0.1％またはそれ未満の、さらに低い含水量も有しうる。一定の態様において、薬学的組成物は、分解を防止し、貯蔵安定性を与えるために、乾燥状態で提供される。

【０１５７】

容器は、組成物を薬学的に格納（および貯蔵）するのに適した任意の容器、例えばシリンジ、バイアル、チューブなどであることができる。次に、薬学的組成物は、好ましくは、シリンジの特殊な針を介して、または適切なカテーテルを介して、適用されうる。典型的な希釈剤は注射用水ならびにNaCl（好ましくは50～150mM、とりわけ110mM）、$CaCl_2$（好ましくは10～80mM、とりわけ40mM）、酢酸ナトリウム（好ましくは0～50mM、とりわけ20mM）およびマンニトール（好ましくは最大10％w/w、とりわけ2％w/w）を含む。好ましくは希釈剤は、再構成された乾燥組成物のpHを好ましくは6.2～7.5のpH、とりわけ6.9～7.1のpHに緩衝するために、緩衝剤または緩衝系も含むことができる。

【０１５８】

一定の態様において、希釈剤は別の容器に用意される。これは好ましくはシリンジであ

ることができる。その場合、シリンジ中の希釈剤は、乾燥組成物の再構成用の容器に、容易に適用することができる。その容器もシリンジである場合は、両方のシリンジを1つのパックに仕上げることができる。それゆえに、乾燥安定組成物を再構成するための薬学的に許容される希釈剤を含む希釈剤シリンジと共に仕上げられた、シリンジ中の乾燥組成物を提供することが好ましい。

【０１５９】

一定の態様において、本開示では、本明細書に開示する薬学的組成物と適切な希釈剤が入っている容器とを含むキットが想定される。本キットのさらなる構成要素は、使用説明書、シリンジ、カテーテル、ブラシなどの投与手段（組成物が既に投与手段に入れて提供されているのではない場合）または医療行為（外科医療）における使用に必要な他の構成要素、例えば代替の針またはカテーテル、余分のバイアルまたはさらなる創傷被覆手段でありうる。一定の態様において、キットは、乾燥安定止血組成物リンジを収容しているシリンジおよび希釈剤が入っているシリンジ（または別の希釈剤容器から希釈剤を吸い込むために用意されたシリンジ）を含む。

【０１６０】

作製方法

本明細書に開示するポリペプチドは、公知の方法に従って、さまざまな方法で調製することができる。いくつかの態様では、適当な供給源（例えば細菌または動物の培養細胞または組織、任意で形質転換されたもの）からイムノアフィニティー精製によってポリペプチドを精製することができる。例えばSEQ ID NO:1は、インド南西部の西ガーツ山脈に見いだされるヒドロフィラクス・バフビスタラおよびハイララナ・オーランティアカを含むカエルから得ることができる。ポリペプチドをコードする核酸分子を利用できれば、当技術分野において公知のインビトロ発現法および無細胞発現システムを使ってタンパク質を生産することが可能になる。インビトロ転写および翻訳システムは例えばPromega（商標）Biotech（ウィスコンシン州マディソン）またはGibco（登録商標）-BRL（メリーランド州ゲイサーズバーグ）から市販されている。

【０１６１】

より大量のポリペプチドは、適切な原核システムまたは真核システムでの発現によって生産することができる。例えば、ポリペプチドをコードするDNA分子の一部または全部を、大腸菌などの細菌細胞における発現に適合したプラスミドベクターに挿入することができる。そのようなベクターは、宿主細胞におけるDNAの発現を可能にするような形で配置された、宿主細胞におけるDNAの発現に必要な調節要素を含む。発現に必要なそのような調節要素は、プロモーター配列、転写開始配列、および任意でエンハンサー配列を含む。

【０１６２】

組換え原核システムまたは組換え真核システムにおける遺伝子発現によって生産されたポリペプチドは、当技術分野において公知の方法に従って精製することができる。組換えタンパク質が発現後に宿主細胞から分泌され、周囲の培地から容易に精製される市販の発現/分泌システムを使用することができる。発現/分泌ベクターを使用しない場合、代替的アプローチの1つは、アフィニティー分離による、例えば組換えタンパク質に特異的に結合する抗体との免疫学的相互作用による、または6～8個のヒスチジン残基がN末またはC末にタグ付けされた組換えタンパク質を単離するためのニッケルカラムによる、組換えタンパク質の精製を伴う。代替的タグはFLAGエピトープまたはヘマグルチニン（hemaglutinin）エピトープを含みうる。そのような方法は当業者にはよく使用されている。

【０１６３】

ポリペプチドは化学合成することもできる。例えばペプチドは、Applied Biosystemのシンセサイザーを使って、固相法（Steward, J.M. and Young, J.D., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd Ed., Pierce Chemical Company, Rockford, 111,（1984））で合成することができる。

【０１６４】

また、複数のフラグメントを合成してから、それらを1つに連結することで、さらに大

きなフラグメントを形成させてもよい。特別な位置にアミノ酸置換を持つこれらの合成ペプチドフラグメントを作製して、抗ウイルス活性についてインビトロおよびインビボで試験することもできる。固相ペプチド合成については、多くの技法の要約を、J.M. Stewart and J.D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co.（San Francisco）, 1963およびJ. Meienhofer, Hormonal Proteins and Peptides, vol. 2, p. 46, Academic Press（New York）, 1973に見いだすことができる。古典的な溶液合成については、G.Schroder and K.Lupke, The Peptides, Vol. 1, Academic Press（New York）を参照されたい。一般に、これらの方法は、伸長中のペプチド鎖への1つまたは複数のアミノ酸または適切に保護されたアミノ酸の逐次的付加を含む。通常、第1のアミノ酸のアミノ基またはカルボキシル基が、適切な保護基で保護される。次に、保護または誘導体化されたアミノ酸を、不活性固形支持体に取り付けるか、適切に保護された相補（アミノまたはカルボキシル）基を有する配列中の次のアミノ酸を、アミド結合を形成させるのに適切な条件下で加えることにより、溶解状態で利用する。次に、この新たに付加されたアミノ酸残基から保護基を除去し、次のアミノ酸（適切に保護されたもの）を付加するなどする。所望のアミノ酸をすべて適正な順序で連結したら、残っている保護基（およびあらゆる固形支持体）を、逐次的にまたは同時に除去することで、最終ポリペプチドを得る。この一般手順に簡単な変更を加えれば、例えば保護されたトリペプチドを適正に保護されたジペプチドと（キラル中心をラセミ化させない条件下で）カップリングして脱保護後にペンタペプチドを形成させることなどにより、伸長中の鎖に2つ以上のアミノ酸を一度に付加することができる。

【０１６５】

適切なペプチド調製方法の1つは、アミノ酸α-N末が酸感受性基または塩基感受性基で保護される固相ペプチド合成を伴う。そのような保護基は、ペプチド結合形成の条件には安定である一方で、伸長中のペプチド鎖を破壊することも、そこに含まれているどのキラル中心をラセミ化することもなく、容易に除去できるという特性を有するべきである。適切な保護基は9-フルオレニルメチルオキシカルボニル（Fmoc）、t-ブチルオキシカルボニル（Boc）、ベンジルオキシカルボニル（Cbz）、ビフェニルイソプロピルオキシカルボニル、t-アミルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、α,α-ジメチル-3,5-ジメトキシベンジルオキシカルボニル、o-ニトロフェニルスルフェニル、2-シアノ-t-ブチルオキシカルボニルなどである。他の側鎖保護基は、リジンおよびアルギニンのような側鎖アミノ基には、2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル（pmc）、ニトロ、p-トルエンスルホニル、4-メトキシベンゼン-スルホニル、Cbz、Bocおよびアダマンチルオキシカルボニル;チロシンには、ベンジル、o-ブロモベンジルオキシ-カルボニル、2,6-ジクロロベンジル、イソプロピル、t-ブチル（t-Bu）、シクロヘキシル、シクロペンチル（cyclopenyl）およびアセチル（Ac）;セリンには、t-ブチル、ベンジルおよびテトラヒドロピラニル;ヒスチジンには、トリチル、ベンジル、Cbz、p-トルエンスルホニルおよび2,4-ジニトロフェニル;トリプトファンには、ホルミル;アスパラギン酸およびグルタミン酸には、ベンジルおよびt-ブチル、そしてシステインには、トリフェニルメチル（トリチル）である。

【０１６６】

固相ペプチド合成法では、α-C末アミノ酸を適切な固形支持体または樹脂に取り付ける。上記の合成に有用な適切な固形支持体は、段階的縮合-脱保護反応の試薬および反応条件に対して不活性であり、かつ使用する媒質に不溶な材料である。α-C末カルボキシペプチド合成用の固形支持体は、4-ヒドロキシメチルフェノキシメチル-コポリ（スチレン-1％ジビニルベンゼン）である。α-C末アミドペプチド用の固形支持体は、Applied Biosystems（カリフォルニア州フォスターシティ）から入手できる4-（2',4'-ジメトキシフェニル-Fmoc-アミノメチル）フェノキシアセトアミドエチル樹脂である。α-C末アミノ酸は、4-ジメチルアミノピリジン（DMAP）、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール（HOBT）、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ-トリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート（BOP）またはビス（2-オキソ-3-オキサゾリジニル）ホスフィンクロリド（BOPC

l）を使って、またはそれらを使わずに、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド（DIC）またはO-ベンゾトリアゾール-1-イル-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート（HBTU）媒介カップリングを利用して、ジクロロメタンまたはDMFなどの溶媒中、10℃～50℃の温度で約1～約24時間、樹脂にカップリングする。固形支持体が4-（2',4'-ジメトキシフェニル-Fmoc-アミノメチル）フェノキシ-アセトアミドエチル樹脂である場合は、上述のα-C末アミノ酸とのカップリングに先だって、Fmoc基を二級アミン、好ましくはピペリジンで切断する。

【０１６７】

脱保護された4（2',4'-ジメトキシフェニル-Fmoc-アミノメチル）フェノキシ-アセトアミドエチル樹脂にカップリングするための方法は、DMF中のO-ベンゾトリアゾール-1-イル-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート（HBTU、1当量）および1-ヒドロキシベンゾトリアゾール（HOBT、1当量）である。次に続く保護アミノ酸のカップリングは、当技術分野において周知のとおり、自動ポリペプチド合成装置で実行することができる。

【０１６８】

一態様において、伸長中のペプチド鎖のアミノ酸におけるα-N末は、Fmocで保護される。伸長中のペプチドのα-N末側からのFmoc保護基の除去は、2級アミン、好ましくはピペリジンによる処理で達成される。次に、各保護アミノ酸を約3倍モル過剰に導入し、カップリングを好ましくはDMF中で実行する。カップリング剤は通常、O-ベンゾトリアゾール-1-イル-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート（HBTU、1当量）および1-ヒドロキシベンゾトリアゾール（HOBT、1当量）である。固相合成の最後に、ポリペプチドを樹脂から切り離し、逐次的にまたは一回の操作で、脱保護する。

【０１６９】

ポリペプチドの切り離しと脱保護は、チオアニソール（thianisole）、水、エタンジチオールおよびトリフルオロ酢酸を含む切断試薬で、樹脂に結合しているポリペプチドを処理することにより、1回の操作で果たすことができる。ポリペプチドのα-C末がアルキルアミドである場合は、アルキルアミンによるアミノ分解によって樹脂を切断する。あるいは、例えばメタノールとのエステル交換とそれに続くアミノ分解によって、または直接的なアミド交換によって、ペプチドを除去してもよい。保護ペプチドは、この時点で精製するか、次の工程にそのまま移ることができる。側鎖保護基の除去は、上述の切断カクテルを使って達成される。完全に脱保護されたペプチドは、以下のタイプのいずれかまたはすべてを使用する一連のクロマトグラフィー工程で精製することができる:弱塩基性樹脂（アセテート型）でのイオン交換;非誘導体化ポリスチレン-ジビニルベンゼン（例えばAmberlite XAD）での疎水吸着クロマトグラフィー;シリカゲル吸着クロマトグラフィー;カルボキシメチルセルロースでのイオン交換クロマトグラフィー;例えばSephadex G-25、LH-20または向流分配法での分配クロマトグラフィー;高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、とりわけオクチル-またはオクタデシルシリル-シリカ結合相カラムパッキングでの逆相HPLC。

【０１７０】

上述の方法によって調製されたポリペプチドは、標準的手順に従って分析し、検証することができる。例えばそのようなポリペプチドは、公知の方法によるアミノ酸配列分析に付すことができる。

【０１７１】

ポリペプチドの活性は、任意の方法によって、例えばデングウイルスまたはジカウイルスによる細胞の感染を阻止するポリペプチドの能力を測定することなどによって、測定することができる。

【０１７２】

使用方法

本開示は、本明細書に開示するポリペプチドを使用する方法も包含する。ここに提供するポリペプチドおよび組成物は、ウイルス感染性疾患を処置するために使用することがで

きる。ウイルスは、通例、生物の生きた細胞内で複製することができる感染因子である。ウイルス粒子（ビリオン）は通常、核酸、タンパク質外皮、および場合によってはタンパク質外皮を取り囲む脂質のエンベロープからなる。ウイルスの外形は、単純ならせん形および正二十面体から、より複雑な構造までさまざまである。ウイルスがコードするタンパク質サブユニットは自己集合してキャプシドを形成し、一般的には、ウイルスゲノムの存在を必要とする。複雑なウイルスは、それらのキャプシドの構築を助けるタンパク質をコードすることができる。核酸と会合したタンパク質はヌクレオタンパク質として公知であり、ウイルスキャプシドタンパク質とウイルス核酸との会合はヌクレオキャプシドと呼ばれる。

【０１７３】

いくつかの態様において、本開示は、エンベロープRNAウイルスに感染した対象を処置する方法に関する。エンベロープRNAウイルスの例として、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、インフルエンザ、肝炎、ジカウイルスおよびデングが挙げられる。

【０１７４】

一定の態様において、本開示は、ジカウイルス（ZIKV）感染と診断された対象を処置する方法に関する。一定の態様において、本開示は、対象におけるZIKV感染を予防する方法に関する。ジカウイルス（ZIKV）は、フラビウイルス科（フラビウイルス属）に属する新たに出現した節足動物媒介ヒト病原体であり、ウガンダのジカ森において発熱したセンチネルアカゲザルから1947年に初めて分離された。主にネッタイシマカ（Aedes aegypti）によって伝染するが、最新の報告によると、このウイルスは周産期、性行為、および輸血によって伝染していることが強く示唆される。ZIKV感染は通常、自然治癒し、感染個体のうちの80％は臨床的に無症候性である。発病した患者の症状は通常は軽度であり、命に関わることはない。症状としては、発熱、斑状丘疹状皮疹、関節痛および/または結膜炎、筋痛、頭痛および後眼窩痛が挙げられる。最近、ギラン・バレー（Gullain-Barre）症候群（GBS）の通常より高い発生率、非ポリオウイルス関連急性弛緩性麻痺の最も高頻度な原因、および原発性小頭症例が、フランス領ポリネシアおよびブラジルにおけるZIKVの大流行と関係づけられている。GBSは、一定のウイルスまたは細菌感染による抗原曝露に対する免疫媒介応答によって開始されると考えられる、重篤な疾患である。患者のおおよそ20％には重篤な肢体不自由が残り、患者の約5％は死亡する。ZIKV感染と2015年にブラジルで報告された小頭症例発生率の20倍の増加との見掛けの相関関係も、大きな懸念事項である。症状のうち、最も一般的なものは発作、精神遅滞、発育遅延、脳性麻痺、難聴、および失明である。

【０１７５】

ZIKVの感染機序は十分には研究されていないが、ウイルスの複製サイクルは、DFVなどの他のフラビウイルスと類似している可能性がある。ZIKV感染蚊からの唾液を接種されたヒト皮膚は、表皮ケラチノサイト、皮膚線維芽細胞およびランゲルハンス細胞の感染につながる。ZIKVは、リンパ節および血流によってヒト宿主全体に伝播し続ける。ZIKVゲノム複製は、ウイルスの非構造タンパク質、ウイルスRNAおよび正体がほとんどわかっていない宿主タンパク質からなる膜結合型ウイルス複製複合体により、小胞体中の細胞内コンパートメントで起こる。ZIKVのゲノムは、5'-NCRおよび3'-NCRとして公知の2つの非コード隣接領域（NCR）を持つ約10.7kb長の一本鎖（＋）-RNA分子である。ZIKV RNAゲノムは、3つの構造タンパク質（C、prM、およびE）と7つの非構造タンパク質（NS1、NS2a、NS2b、NS3、NS4a、NS4b、およびNS5）に切断される3,419アミノ酸ポリペプチドをコードする単一のオープンリーディングフレーム（ORF）を含有している。複合体はまず、ゲノムのプラス鎖RNAを相補的マイナス鎖RNA中間体に転写して、二重鎖RNAの形成をもたらす。この二重鎖のマイナス鎖は複数ラウンドのプラス鎖RNA合成のための鋳型として役立つ。ウイルスRNA合成は、マイナス鎖RNAの10倍のプラス鎖が合成される非対称複製サイクルによって起こる。

【０１７６】

一定の態様において、本開示は、デング感染と診断された対象を処置する方法に関する

。一定の態様において、対象は、血清型1、2、3、または4のデングと診断される。

【０１７７】

一定の態様において、本開示は、インフルエンザ感染と診断された対象を処置する方法に関する。一定の態様において、対象は、インフルエンザAウイルス、インフルエンザBウイルス、インフルエンザCウイルス、鳥インフルエンザまたはSARS、例えばサブタイプH1N1、H3N2、H7N9、H5N1、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3、H10N7、H5N1、H5N1、H5N1アヒル/MN/1525/81、H5N2、H7N1、H7N7、およびH9N2）と診断される。

【０１７８】

一定の態様において、本開示は、HIVと診断された対象を処置する方法に関する。HIVは、後天性免疫不全症候群（AIDS）を引き起こすレンチウイルス（レトロウイルス科の一メンバー）である。レンチウイルスは一本鎖プラス・センスエンベロープRNAウイルスとして伝染する。標的細胞に侵入すると、ウイルスRNAゲノムは、ウイルスがコードする逆転写酵素によって二本鎖DNAに変換される。次に、このウイルスDNAは、宿主細胞のコファクターと共にウイルスがコードするインテグラーゼによって、細胞DNAに組み込まれる。2種類のHIVがある。HIV-1はLAVまたはHTLV-IIIと呼ばれることもある。

【０１７９】

HIVは、典型的には、抗ウイルス剤の併用、例えば2つのヌクレオシド類似体逆転写阻害剤と1つの非ヌクレオシド類似体逆転写阻害剤またはプロテアーゼ阻害剤とによって処置される。この3剤併用は、トリプルカクテルとして一般に公知である。一定の態様において、本開示は、本明細書に開示する薬学的組成物を2つのヌクレオシド類似体逆転写阻害剤および1つの非ヌクレオシド類似体逆転写阻害剤またはプロテアーゼ阻害剤と組み合わせて投与することによる、HIVと診断された対象の処置に関する。非ヌクレオシド類似体逆転写阻害剤またはプロテアーゼ阻害剤の例として、エムトリシタビン、テノホビル、エファビレンツ、ラルテグラビル、リトナビル、およびダルナビルが挙げられる。

【０１８０】

一定の態様において、本開示は、C型肝炎（HCV）またはB型肝炎（HBV）と診断された対象を処置する方法に関する。C型肝炎ウイルスは一本鎖プラスセンスRNAウイルスである。これはフラビウイルス科ヘパシウイルス属の唯一公知のメンバーである。C型肝炎ウイルスには6つの主要遺伝子型があり、それらは数字で示される。C型肝炎ウイルス粒子は、正二十面体保護殻に取り囲まれ、さらに脂質エンベロープに包まれた、遺伝物質のコア（RNA）からなる。2つのウイルスエンベロープ糖タンパク質E1およびE2は脂質エンベロープに埋まっている。ゲノムは単一のタンパク質に翻訳される単一のオープンリーディングフレームからなる。この大きなプレタンパク質は、後に、細胞プロテアーゼおよびウイルスプロテアーゼによって、宿主細胞内でのウイルス複製を可能にし、または成熟ウイルス粒子に集合する、より小さなタンパク質、例えばE1、E2、NS2、NS3、NS4、NS4A、NS4B、NS5、NS5A、およびNS5Bに切断される。

【０１８１】

B型肝炎ウイルスはヘパドナウイルスである。ウイルス粒子（ビリオン）は外側の脂質エンベロープとタンパク質で構成された正二十面体ヌクレオキャプシドコアとからなる。HBVのゲノムは環状DNAでできているが、そのDNAは完全には二本鎖でない。鎖の一端はウイルスDNAポリメラーゼに連結される。このウイルスはRNA中間体型を介して逆転写によって複製する。複製は典型的には肝臓で起こり、そこで炎症（肝炎）を引き起こす。このウイルスは血液に伝播し、感染者では血中にウイルス特異的タンパク質とそれらに対応する抗体とが見いだされる。これらのタンパク質および抗体に関する血液検査が感染を診断するために使用される。

【０１８２】

本明細書に開示する方法は、HIV、インフルエンザ、デング、またはZIKVなどのエンベロープウイルスを持つ対象に本開示のポリペプチドを投与する工程を含むことができる。本開示のポリペプチドはいくつかの方法で投与することができる。例えば本開示のポリペプチドは、筋肉内投与または鼻腔内投与するか、皮膚にマイクロニードルによって投与す

ることができる。組成物は、経口投与、静脈内投与、皮下投与、経皮投与（例えばマイクロニードルによって投与）、腹腔内投与、点眼、膣投与、直腸投与、舌下投与、または吸入によって投与することができる。

【０１８３】

ポリペプチドは、一般に、「有効量」で投与されることになる。これは、適切に投与された時に、投与された対象において所望の治療効果または予防効果を達成するのに十分な、ポリペプチドの任意の量を意味する。通常、予防または処置されるべき状態および投与経路に依存して、そのような有効量は通常、1日あたり患者の体重1キログラムあたり0.01～1000mg、多くの場合、1日あたり患者の体重1キログラムあたり0.1～500mg、例えば1～250mg、例えば約5、10、20、50、100、150、200、または250mgであるだろう。これを、1日1回投与するか、1日に1回または複数回にわけて投与することができる。投与される量、投与経路、およびさらなる処置レジメンは、処置を行う臨床医が、患者の年齢、性別および全身状態ならびに処置される疾患/症状の性質および重症度などといった因子に応じて決定しうる。米国特許第6,372,778号、米国特許第6,369,086号、米国特許第6,369,087号および米国特許第6,372,733号、その他上述の参考文献、ならびに標準的ハンドブック、例えばRemington's Pharmaceutical Sciencesの最新版を参照されたい。

【０１８４】

一定の態様において、本明細書に開示する薬学的組成物は、第2の抗ウイルス剤と組み合わせて投与される。一定の態様において、第2の抗ウイルス剤は、オセルタミビル、ザナミビルおよび/またはペラミビルである。一定の態様において、抗ウイルス剤は、アバカビル、アシクロビル、アシクロビル、アデホビル、アマンタジン、アンプレナビル、アンプリジェン（ampligen）、アルビドール、アタザナビル、アトリプラ、ボセプレビル、シドフォビル、コンビビル、コムプレラ、ダルナビル、デラビルジン、ジダノシン、ドコサノール、ドルテグラビル、エドクスジン、エファビレンツ、エムトリシタビン、エンフビルチド、エンテカビル、ファムシクロビル、ホミビルセン、ホスアンプレナビル、ホスカルネット、ホスホネット、ガンシクロビル、イバシタビン、イムノビル（imunovir）、イドクスウリジン、イミキモド、インジナビル、イノシン、インターフェロンIII型、インターフェロンII型、インターフェロンI型、ラミブジン、ロピナビル、ロビリド、マラビロク、モロキシジン、メチサゾン、ネルフィナビル、ネビラピン、ネキサビル（nexavir）、オセルタミビル、ペグインターフェロンアルファ-2a、ペンシクロビル、ペラミビル、プレコナリル、ポドフィロトキシン、ラルテグラビル、リバビリン、リマンタジン、リトナビル、ピラミジン（pyramidine）、サキナビル、スタブジン、スタリビルド、テノホビル、テノホビルジソプロキシル、テノホビルアラフェナミドフマル酸塩、チプラナビル、トリフルリジン、トリジビル、トロマンタジン、ツルバダ、バラシクロビル、バルガンシクロビル、ビクリビロック、ビダラビン、ビラミジン、ザルシタビン、ザナミビル、ジドブジン、およびそれらの組合せである。

【０１８５】

本開示の態様をいくつか説明した。それでも、本開示の要旨および範囲から逸脱することなく、さまざまな変更を加えうることは、理解されるであろう。したがって他の態様も後述する請求項の範囲内である。

【実施例】

【０１８６】

本願に係る化合物、組成物、物品、デバイス、および/または方法をどのように作製し評価するかについての完全な開示および説明を当業者に提供するために、以下に実施例を挙げるが、これらの実施例は本発明の例示に過ぎず、本発明者らが自分達の発明であると見なすものの範囲を限定しようとするものではない。数字（例えば量、温度など）については正確性を確保するように努めたが、多少の誤差および偏差は考慮されるべきである。別段の表示がある場合を除き、部は重量部、温度は℃または周囲温度、圧力は大気圧または大気圧付近である。

【０１８７】

細胞およびウイルス:ベロ細胞は、10％FBS（FBS;Atlanta Biologicals）、1％Pen/Strep、および1％HEPESを補足したダルベッコ変法イーグル培地（DMEM;Lonza）で培養した。ZIKV株PRVABC59、MR-766、DakAr、およびP6-740を使用した。ZIKV感染実験はバイオセーフティーレベル2＋（BSL2＋）下で行った。

【０１８８】

ペプチド:ペプチドは元々は南インドの西ガーツ山脈地域のカエルから、刺激駆動型の分泌によって単離され、Reshmy, et al., J Pept Sci 17, 342-347,（2011）に記載のとおり特徴づけられた。ペプチドは、Genemed Synthesis Inc.（カリフォルニア州サンフランシスコ）、Neo Scientific、およびエモリー大学にあるBrian Evavold博士の研究室において合成された。対照としてOVA257-264ペプチド（Invivogen）を使用した。

【０１８９】

フォーカス形成アッセイ:ペプチドをZIKV（100FFU/ウェル）と共に37℃で2時間インキュベートした。インキュベートされたこの混合物を使ってベロ細胞を37℃で1.5時間感染させた。細胞および接種物に2％メチルセルロース溶液（OptiMEM;Gibco）を重層し、37℃で72時間インキュベートした。細胞をPBSで洗浄し、1:1メタノール/アセトン混合物で30分間固定した。5％ミルク/PSBを使って細胞を室温で20分間ブロッキングし、一次抗体（抗フラビウイルスマウス4G216抗体）と共に37℃で2時間インキュベートした。次に、細胞を二次抗体（HRPコンジュゲートヤギ抗マウスIgG、Cell Signaling）と共に37℃で1時間インキュベートした。細胞をTrueBlueペルオキシダーゼ基質（KPL）で呈色させた。プレートをCTL-ImmunoSpot S6マイクロアナライザーで読み取った。

【０１９０】

溶血毒性アッセイ:単一ドナーヒト赤血球（Innovative Research）を、PBS（pH7.4）中で500×gで5分間の遠心分離を3回行って洗浄した。連続希釈したカエルペプチドまたはOVA対照ペプチドを、V底96ウェルプレートに調製し、37℃で1時間にわたって、各ウェルにつき2×10^7個のhRBCと混合した。PBS溶液を陰性対照（0％溶解）として使用し、PBS中の0.1％Triton X-100を100％溶解として使用した。プレートを4℃において300×gで5分間遠心分離することで、無傷のRBCをペレット化し、各ウェルの上清を450nmにおける吸光度によって測定した。

【０１９１】

免疫蛍光:ベロ細胞を生育し、カバーガラス上で30分間、ZIKV（PRVABC59）に1のMOIで感染させ、固定前にリン酸緩衝食塩水（PBS）で3回洗浄した。次に細胞を4％パラホルムアルデヒド溶液で10分間固定し、0.2％Triton X-100中、室温で12分間、透過処理した。細胞を無血清タンパク質ブロッキング溶液（protein Block Solution Serum-Free）（Dako）で1時間ブロッキングし、一次抗体（マウス4G2モノクローナル抗体およびウサギ抗アルファチューブリンポリクローナル抗体、Millipore）および二次抗体（ロバ抗マウスAlexa-488およびAlexa-594、Thermo Fisher）で染色した。洗浄後に、試料をProLong（商標）Gold with DAPI（Thermo Fisher）で封入した。FV10-ASW2.1ソフトウェアを使ってOlympus Fluoview FV1000顕微鏡で画像を撮影した。

【０１９２】

qRT-PCR:全RNAをモック感染またはZIKV感染ベロ細胞（1試料あたり2×10^5細胞）からRNeasy Plusミニキット（Qiagen）を使って抽出した。qRT-PCR用に、High-Capacity cDNA逆転写キット（Applied Biosystems）を使って、ランダムヘキサマーで、全RNAを相補DNAに変換した。ウイルスRNAを定量するために、TaqMan Gene Expression Master Mix（Applied Biosystems）を使って、製造者の説明書により、qRT-PCRを行った。RT-PRCに使用したプライマーはQuickeらによって以前に記載されている。25のウイルスRNAを細胞GAPDHに対して正規化し、モック感染対照と比較した。

【０１９３】

EMのためのZIKVネガティブ染色:ネガティブ染色前にZIKV試料を4％緩衝パラホルムアルデヒドで固定した。次に、5μLのジカ試料を、20秒間のグロー放電によって処理しておいた400メッシュ炭素被覆銅グリッド上に載せ、覆いをしたガラス皿中で試料を5分間沈降さ

せた。次に、試料側を2滴の再蒸留水に接触させることで、試料を含むグリッドを手早く洗浄し、濾紙で吸い取り、次に1％リンタングステン酸（PTA）で15秒間染色してから、PTAを濾紙で除去した。Gatan US1000 CCDカメラ（Gatan、カリフォルニア州プレザントン）を装備したJEOL JEM-1400透過型電子顕微鏡（JEOL Ltd.、日本国東京）で、ジカウイルスを撮像した。

【０１９４】

Yodhaペプチドおよび変異体はジカウイルスに対して殺ウイルス性である

カエル皮膚ペプチドをスクリーニングすることで、ZIKV感染に対して潜在的殺ウイルス活性を持つペプチドを同定した。個々のペプチドをZIKV（PRVABC59株）と共に2時間インキュベートしてから、フォーカス形成アッセイにおいてウイルスの生存能を試験した。76ペプチドのライブラリーのうち、12ペプチドがZIKVの感染性を減少させた（図1A）。宿主防御ペプチドの大きな短所は、それらが哺乳動物細胞に対して毒性を示しうることである。12ペプチドの中から非毒性候補を同定するために、各ペプチドの毒性をヒト赤血球で測定した。12ペプチドのうち、1つだけは、高濃度でさえ、細胞毒性を示さなかった（図1B）。このペプチドをYodhaと名付けた。これはサンスクリット語で「戦士」を意味する。Yodhaペプチドは23個のアミノ酸を含有し、

SMLLLFFLGTISLSLCQDDQERC (SEQ ID NO:1)

として提供され、ブレベニンスーパーファミリーに属する。Hopp-Woodsプロット（Hopp et al. P Natl Acad Sci-Biol 78, 3824-3828,（1981））を使ってこのペプチドを分析したところ、興味深いことに、疎水性側鎖を持つアミノ酸が、YodhaペプチドのN末領域のほとんど半分を占めていた（図1C）。YodhaペプチドのC末側は3つの負荷電アミノ酸（（Asp（D）およびGlu（E））を含んでいる。

【０１９５】

50％阻害濃度（IC_{50}）を決定するために、Yodhaペプチドの用量漸増分析（2.5μM～160μM）をZIKVに対して行ったところ、10μM、20μM、40μM、80μM、および160μMにおいてそれぞれ35％、50％、65％、80％、および90％の低減が見られた。YodhaペプチドのIC_{50}は20μMである（図1D）。毒性を伴わずに使用することができるYodhaの最大濃度を決定するために、ヒト赤血球（RBC）細胞毒性試験を、31.25μM～2000μMの範囲のペプチド濃度で行った。Yodhaは1000μMでさえ非毒性であり、2000μMで初めて毒性を示した（図1E）。ZIKVへの曝露に続くこのペプチドによるウイルス低減の動態も決定した。ZIKVを、5分、15分、30分、1時間、および2時間にわたって、Yodhaペプチドに曝露した。ウイルス価（フォーカス形成単位FFUとして測定したもの）は、試験したすべての時点で有意に減少しており、Yodhaペプチドの最大活性がZIKVとのインキュベーションの最初の5分以内に起こることを強く示している（図1F）。

【０１９６】

ZIKVは配列相同性に基づいて4つの異なる系統に分類することができる（Petersen et al. N Engl J Med 375, 294-295,（2016）、Hamel et al. Microbes Infect 18, 441-449,（2016））。最初のZIKVであるMR-766は、1947年にセンチネルアカゲザルからウガンダで分離された。1966年には、最初の非アフリカ株P6-740がマレーシアにおいてネッタイシマカのプールから分離された。アフリカ株DaKar41524は1984年にセネガルのアフリカヤブカ（Aedes africanus）のプールから分離された。2015年に、現代の株PRVABC59がプエルトリコにおいて感染したヒト患者から分離された。南北アメリカにおいて流行している流行株と近縁であるこの株は、子宮内ZIKV感染に関連づけられている。図1A～1Fの実験はすべて、ZIKVのPRVABC59（プエルトリコ2015）株を使用した。

【０１９７】

次に、YodhaペプチドがZIKVの異なる株MR-766（ウガンダ、1947）、DakAr41524（セネガル1984）、P6-740（マレーシア、1966）、およびPRVABC59（プエルトリコ、2015）を阻害する程度を決定した。Yodhaペプチドはすべての ZIKV株を阻害した（図2Aおよび図2B）。総合すると、YodhaペプチドはZIKVが共有している共通の領域を標的とするのかもしれないことを、このデータは示唆している。

【０１９８】
また、Yodhaペプチドが、既にZIKVに感染している細胞における感染性ウイルス生産を低減できるかどうかも決定した。簡単に述べると、ベロ細胞を感染させて、ウイルスを付着および侵入させてから、感染の1、14、48、および72時間後に、Yodhaペプチドを培養培地に加えた。ZIKVをFFUアッセイで定量するために、ZIKV感染の3、24、48、および72時間後に、培養上清を集めた（図3A）。OVAペプチド処理細胞でもYodhaペプチド処理細胞でも、感染後3時間の時点では、ZIKVは検出されなかった。感染後48時間および72時間の時点で、ZIKV生産の60～70％の低減が見られた（図3B）。総合すると、このデータは、Yodhaペプチドがインビトロで ZIKVのウイルス価を有意に低減し、ZIKVの伝播を制限できることを示している。

【０１９９】
次に、ここで観察された、Yodhaペプチドが誘導するウイルス価の減少が、ウイルスの侵入がブロックされたためであるかどうかを決定した。ペプチドがZIKVを直接殺すか、ZIKVのエンベロープ構造を破壊するのであれば、それがウイルス侵入を防止することになるだろうと推論した。これを検証するために、ZIKVを4℃で1時間、細胞に結合させてから、細胞を37℃に移してウイルス侵入させることによって、ウイルス侵入を測定するための実験を行った（図4A）。DENV2の侵入は、初期エンドソーム輸送により、25分以内に起こることが示されている（Ang et al. Virol J 7, 24,（2010））。ZIKVをYodhaペプチドに曝露してから、ウイルスをベロ細胞に30分間感染させた。ベロ細胞内のウイルスRNA（図3A）を、定量リアルタイムPCR（qRT-PCR）によって測定した（図4B）。ウイルスのみの試料および対照OVAペプチドと共にインキュベートしたZIKVの対照試料には同等量のZIKV RNAが検出された。Yodhaペプチドとプレインキュベートした ZIKVに感染させた細胞は、OVA対照およびウイルスのみの対照と比較して、20％のZIKV RNAしか発現していないことが示された。これは、Yodhaペプチドへの曝露が宿主細胞に侵入するZIKVの能力を有意に低減したことを示唆している。次に、ZIKVの侵入またはその欠如を、汎フラビウイルスEタンパク質に対する抗体を使った免疫蛍光によって可視化した（図4C）。qRT-PCRの結果から予期されるとおり、Yodhaペプチド処理試料（図4E）ではZIKVエンベロープ発現の減少が観察され、一方、OVA対照（図4D）はそのような効果を示さなかった。これは、YodhaペプチドがZIKVを阻害し、細胞へのウイルス侵入を防止することを示唆している。

【０２００】
図4A～4Eは、YodhaペプチドへのZIKVの曝露がウイルス侵入を阻害すること、そしてこの効果がウイルスへのペプチド結合と侵入の阻止によるものであるかもしれないこと、あるいはペプチドがウイルスを破壊しているのかもしれないことを示している。これを検証するために、ZIKVをYodhaペプチドまたは対照ペプチドで10分間処理してから、電子顕微鏡法で分析した。驚いたことに、Yodhaペプチドによる10分間の処理は、無傷のビリオンを呈した対照ペプチド処理ZIKVとは対照的に、ウイルス粒子の破壊を誘導した（図5Aおよび図5B）。Yodhaペプチドで処理したZIKVは、明快な境界を持つ形態の喪失、明確に規定された層の喪失、および破壊されたウイルス粒子で構成される凝集物の形成によってわかるとおり、著しい構造破壊を呈した。これは、ディフェンシンが誘導するウイルス凝集でも見られた特徴である（Doss et al. Protein D.J Immunol 182, 7878-7887,（2009）、Doss et al. J Immunol 188, 2759-2768,（2012））。総合すると、これらの結果は、Yodhaペプチドで処理されたZIKVは、ジカビリオンの物理的破壊により、その感染性を失うことを示している。

【０２０１】
Yodhaペプチドをさらに特徴づけるために、このペプチドのアラニンスキャニング変異型を生成させた。これは、側鎖を除去するが、ペプチドコンフォメーションは維持するので、より大きな構造内での各アミノ酸の重要性を評価することが可能になる（図6A）。23の変異型ペプチド（SEQ ID NO:2～24）のそれぞれを、その（a）ZIKVを中和する能力（図6B）および（b）あるとすれば、ヒトRBCに対する毒性（図6C）について試験した。興味深いことに、アラニン変異型のうちの1つだけ（ペプチド8）が、親ペプチドと比較して統計

的に有意な（p＝0.02）抗ウイルス活性を示し、23の変異型のうち20は活性が減少しており、2つの変異型はYodhaペプチドと同等な活性を呈した（図6B）。ALA変異型はいずれも毒性ではなく、RBCの溶解を引き起こさなかった（図6C）。キラリティーは、薬学的応用について考慮するには、重要な因子である。というのも、鏡像であるDエナンチオマーペプチドは、インビボでは、天然のL-エナンチオマーより安定だからである。D型のペプチドとL型のペプチドはどちらも同等な効率でZIKVを中和したことから（図6D）、このペプチドは、D型のペプチドにもL型のペプチドにも認識されるウイルス中の対称構造を標的とするのかもしれないことが示唆される。

【０２０２】

ハイララナ・オーランティアカ南インドカエルが、とりわけてジカウイルスと戦うためにではなく、そのニッチにおいて遭遇するであろう他の病原体と戦うために、Yodhaペプチドを生産することは、ほぼ確実である。このペプチドまたはその類似体が、世界中の他のどこかから単離された宿主防衛ペプチドと、どのくらい共通しているかを決定した。BLASTpプログラムを検索したところ、とりわけ疎水性N末において高レベルの相同性を呈する31のペプチドが同定された（図7A）（SEQ ID NO:25～55）。これらの変異体ペプチドのいずれかがZIKVを中和できる程度を決定した。

【０２０３】

まず、それらの毒性を決定したところ、これらの変異体ペプチドはいずれも、ヒトRBCに対して毒性を示さなかった（図7B）。変異体ペプチドは、1つを除いてすべて、ZIKVに対して殺ウイルス活性を示した（図7C）。6つのC末アミノ酸以外はYodhaと同一である変異体25（SEQ ID NO:49）は、このウイルスに対して殺ウイルス効果を呈さなかった。一方、変異体12（SEQ ID NO:36）（（ラナ・ククノリス（Rana kukunoris））由来のブレビニン（brevinin）-2KK2、
PMLLLFFLGTISLSLCQEEERGA
）は、Yodhaペプチドより1.6倍増加した効果をZIKVに対して示した。N末上で、Yodhaペプチドと変異体12（SEQ ID NO:36）は、セリン残基からプロリン残基に変わっている1番目を除いて、同一であり、これらのペプチドのC末は17番目（Q）以降が異なっている。Yodhaペプチドを発現するカエルであるハイララナ・オーランティアカ（Hyalarana aurantiaca）と同じ地理的区域に産するカエルであるI.テンポラリス（I. temporalis）から単離されたペプチドであって、S1-P変化を見せるが、末端部のグルタミン酸アミノ酸は1つ少ない、変異体21（SEQ ID NO:45）
(PMLLLFFLGTISLSLCQEERGA)
も、ZIKVに対する活性を呈した。

【０２０４】

次に、1番目におけるSからPへの変化またはC末（Q17後の配列）の除去が、改善された活性に貢献するかどうかを調べた。C末のDDQERC（SEQ ID NO:81）をYodhaから取り除いた切断型短鎖（short）Yodhaペプチド（SEQ ID NO:56）、変異体12からEEERGA（SEQ ID NO:82）を取り除いた短鎖12ペプチド（SEQ ID NO:57）および完全長YodhaにおいてS1-Pを置き換えたS1P Yodha（SEQ ID NO:58）も生成させた（図7D）。これらをZIKVに対する活性について試験した（図7D）。S1P完全長Yodhaペプチドは、ZIKVに対する効果が、WT Yodhaペプチドより有意に高かった。Yodhaおよび変異体12（SEQ ID NO:36）からのC末の除去は、活性を有意に改善した。これも活性がN末疎水性領域に存することを示唆している。総合すると、これらの結果は、N末の1番目におけるS-P変化またはC末端-DDQERC（SEQ ID NO:81）の除去が、ジカウイルスに対するYodhaペプチドの活性を改善することを示唆している。

【０２０５】

（表３）Yodhaポリペプチド、その変異型および変異体

SEQ ID NO	由来	アミノ酸配列
SEQ ID NO:1 (Yodha)	ハイララナ・オーランティアカ	SMLLLFFLGTISLSLCQDDQERC
SEQ ID NO:2	アラニンスキャニング変異型 1	AMLLLFFLGTISLSLCQDDQERC
SEQ ID NO:3	アラニンスキャニング変異型 2	SALLLFFLGTISLSLCQDDQERC
SEQ ID NO:4	アラニンスキャニング変異型 3	SMALLFFLGTISLSLCQDDQERC
SEQ ID NO:5	アラニンスキャニング変異型 4	SMLALFFLGTISLSLCQDDQERC
SEQ ID NO:6	アラニンスキャニング変異型 5	SMLLAFFLGTISLSLCQDDQERC
SEQ ID NO:7	アラニンスキャニング変異型 6	SMLLLAFLGTISLSLCQDDQERC
SEQ ID NO:8	アラニンスキャニング変異型 7	SMLLLFALGTISLSLCQDDQERC
SEQ ID NO:9	アラニンスキャニング変異型 8	SMLLLFFAGTISLSLCQDDQERC
SEQ ID NO:10	アラニンスキャニング変異型 9	SMLLLFFLATISLSLCQDDQERC

SEQ ID NO:11	アラニンスキャニング変異型 10	SMLLLFFLGAISLSLCQDDQERC
SEQ ID NO:12	アラニンスキャニング変異型 11	SMLLLFFLGTASLSLCQDDQERC
SEQ ID NO:13	アラニンスキャニング変異型 12	SMLLLFFLGTIALSLCQDDQERC
SEQ ID NO:14	アラニンスキャニング変異型 13	SMLLLFFLGTISASLCQDDQERC
SEQ ID NO:15	アラニンスキャニング変異型 14	SMLLLFFLGTISLALCQDDQERC
SEQ ID NO:16	アラニンスキャニング変異型 15	SMLLLFFLGTISLSACQDDQERC
SEQ ID NO:17	アラニンスキャニング変異型 16	SMLLLFFLGTISLSLAQDDQERC
SEQ ID NO:18	アラニンスキャニング変異型 17	SMLLLFFLGTISLSLCADDQERC
SEQ ID NO:19	アラニンスキャニング変異型 18	SMLLLFFLGTISLSLCQADQERC
SEQ ID NO:20	アラニンスキャニング変異型 19	SMLLLFFLGTISLSLCQDAQERC
SEQ ID NO:21	アラニンスキャニング変異型 20	SMLLLFFLGTISLSLCQDDAERC
SEQ ID NO:22	アラニンスキャニング変異型 21	SMLLLFFLGTISLSLCQDDQARC
SEQ ID NO:23	アラニンスキャニング変異型 22	SMLLLFFLGTISLSLCQDDQEAC
SEQ ID NO:24	アラニンスキャニング変異型 23	SMLLLFFLGTISLSLCQDDQERA
SEQ ID NO:25	変異体 1	SMLLLFFLGTISLSLCQDERGA
SEQ ID NO:26	変異体 2	SMLLLFFLGTISLSLCQDEGA

SEQ ID NO:27	変異体3	SMLLLFFLGTISLSLCQEEERGA
SEQ ID NO:28	変異体4	SMLLLFFLGTISLSLCEQERNA
SEQ ID NO:29	変異体5	SMLLLFFLGTISLSLCEQERDSD
SEQ ID NO:30	変異体6	SMLLLFFLGTISLSLCEQERDAD
SEQ ID NO:31	変異体7	SMLLLFFLGTISLSLCQEERGA
SEQ ID NO:32	変異体8	SMLLLFFLGTISLSLCEEERNA
SEQ ID NO:33	変異体9	SMLLLFFLGTISLSLCQEERDA
SEQ ID NO:34	変異体10	SLLLLFFLGTISLSLCQDETNA
SEQ ID NO:35	変異体11	SLLLLFFLGTINLSLCQDDEMPK
SEQ ID NO:36	変異体12	PMLLLFFLGTISLSLCQEEERGA
SEQ ID NO:37	変異体13	SMLLLFFLGTINLSLCQEERDA
SEQ ID NO:38	変異体14	SLLLLFFLGTISLSLCQEEERNA
SEQ ID NO:39	変異体15	SMLLLFFLGMISLSLCQDERGA
SEQ ID NO:40	変異体16	MLLLFFLGTISLSLCEQERNA
SEQ ID NO:41	変異体17	SMLLLFFLGTINLSLCEQERDA
SEQ ID NO:42	変異体18	PMLLLFFLGTISLSLCEQERNA
SEQ ID NO:43	変異体19	SMLLLFFLGTINLSLCEQERNA
SEQ ID NO:44	変異体20	SLLLLFFLGTISLSLCQREAD
SEQ ID NO:45	変異体21	PMLLLFFLGTISLSLCQEERGA
SEQ ID NO:46	変異体22	SLLLLFFLGTINLSLCQDETNA
SEQ ID NO:47	変異体23	SMLLLFFLGTINLSLCEEERDA
SEQ ID NO:48	変異体24	SMLLLFFLGTISLSLCEEER
SEQ ID NO:49	変異体25	SMLLLFFLGTISLSLCEEERDA
SEQ ID NO:50	変異体26	SMLLLFFLGTISLSLCEEERSA
SEQ ID NO:51	変異体27	SMLLLFFLGTISLSLCEEERNA
SEQ ID NO:52	変異体28	SMLLLFFLGTISLSLCEEERGA
SEQ ID NO:53	変異体29	SMLLFFFLGTISLSLCQEEERGA
SEQ ID NO:54	変異体30	SLLLLFFLGTISLSLCEEERNA
SEQ ID NO:55	変異体31	SMLLI FFLGTISLSLCEQERDA
SEQ ID NO:56	短鎖Yodha	SMLLLFFLGTISLSLCQ
SEQ ID NO:57	短鎖Yodha12	PMLLLFFLGTISLSLCQ
SEQ ID NO:58	SIP Yodha	PMLLLFFLGTISLSLCQDDQERC

【０２０６】

自然免疫系の非常に古い部分を構成する宿主防御ペプチドは、宿主を防御する。両生類宿主防御ペプチドであるYodhaは、ジカウイルスに抗する作用をする。このペプチドおよ

びその変異体は、少なくとも以下の理由から、抗ウイルス薬として使用することができる。第1に、これらはウイルスに直接作用して、ウイルスの溶解を引き起こすことができる。第2に、YodhaペプチドはZIKVのすべての系統に作用する。4つのZIKV株のそれぞれは、独立して配列決定され、P6-1966、MR-1947、およびDak-194は、PR-2015とはそれぞれアミノ酸レベルで1.1％、3.2％、および3.0％異なることが見いだされた。またMR-1947は、PR-2015から、非構造タンパク質（2.9％）より構造タンパク質（4.4％）において、より顕著に分岐していた。にもかかわらず、Yodhaペプチドは、4つの異なる系統のすべてを標的とすることから、これはすべてのZIKVの間で保存されたモチーフを標的としている可能性が示唆される。第3に、YodhaペプチドはヒトRBCに対して非毒性である。このペプチドのIC_{50}は20μM（0.052mg/mL）であり、1000μM（2.6mg/ml）において非毒性であることから、投与できる用量範囲が大きくなる。第4に、Yodhaペプチドはウイルスを迅速に、少なくともウイルスへの曝露から5分以内に中和する。これは、治療薬として有利な特徴である。第5に、YodhaペプチドのL-エナンチオマー型とD-エナンチオマー型はどちらもZIKVに対して機能することが示された（図2D）。これは重要である。なぜなら、天然のL型とは異なり、D型は内在性プロテアーゼへの感受性が低いため、インビボで、より安定だからである。

【０２０７】

YodhaペプチドがZIKVのどの部分を標的とするのかは不明である。このペプチドは、68年間（1947年～2015年）にわたって流行してきたZIKVウイルスに有効であるため、これらのウイルスのすべてに保存されている何らかのモチーフを標的とする可能性が高い。EM研究により、Yodhaペプチドはウイルスの溶解を誘導することがわかった。脂質二重層へのタンパク質の膜貫通セグメントの組込みにとって疎水性が主な推進力であることは公知であった。興味深いことに、図7A～7Fに示すYodhaペプチドおよび天然の変異体ペプチドは、共通する疎水性N末（図1C）を有し、ペプチドの活性はそこにマッピングすることができる。これは、このペプチドがおそらくは、疎水性N末を使ってウイルス脂質二重層に組み込まれることによって、ウイルスを不安定化することを示唆している。

【０２０８】

Yodhaペプチドの天然の変異体もZIKVに対して活性である。これらのペプチドは、インド、中国、スリランカ、ミャンマー、米国、カナダ、メキシコ、朝鮮、ロシア、およびヨーロッパと、地球全体に広がる自然生息地に由来したものである。これらの両生類がZIKVと戦うためにこれらのペプチドを生産する可能性は著しく低い。そうではなく、これらのペプチドは、何らかの共通する両生類病原体に抗して、生存上の利点を与える。これらのペプチドは、toll様受容体に似た「パターン認識」によって作用し、ZIKVは偶然にもそれらのパターン/モチーフを共有しているのかもしれない。これらの知見は、YodhaペプチドがZIKVウイルスに対する抗ウイルス化合物として有用でありうることを示している。このペプチドのZIKVに対する直接的殺ウイルス活性と、ヒトRBCに対するその低い毒性とが、このペプチドを、ZIKVと戦うための候補にする。

【０２０９】

Yodhaペプチドはマウスにおいてウイルス価を低減するのに有効である

YodhaペプチドのマウスにおけるZIKVウイルス血症およびウイルス負荷を低減する。4～5週齢マウスのコホートに、2mgの抗Ifnar1 mAbを腹腔内投与し、翌日、10^5FFUのPRVABC ZIKVに感染させた。血清および組織におけるウイルス血症およびウイルス負荷をリアルタイムPCRによってモニターした。図11A～C参照。

【０２１０】

Yodhaペプチドはデングウイルスに対して殺ウイルス性である

デング熱は、世界中でおよそ4億例を引き起こす蚊媒介疾患である。128カ国の39億人にデング熱で死ぬリスクがあると推定される。これは、ジカと同じウイルスの科であるフラビウイルス科に属するデングウイルスによって引き起こされる。デングウイルスにはDENV1～4という4つの血清型がある。ある血清型への曝露は、他の血清型への感染性を強化する。一方の血清型に対して作られた抗体が他方の血清型に交差反応して結合し、感染の増

加を助長するからである。現在、デングウイルスに対しては、ワクチンも抗ウイルス薬も利用できるものがない。Yodhaペプチドは、デングウイルスの4つすべての血清型に対して殺ウイルス性であることがわかった。興味深いことに、DENV1、2、および4は、50μMのペプチド濃度で容易に中和され（図8A）、DENV4は、より高い用量（160μM）のYodhaペプチドでなければ有効でなかった（図8B）。DENV3感染に対する切断型Yodha変異体12の用量漸増試験により、この切断型は完全長Yodhaペプチドより効率的であることが示される（図8D）。

【０２１１】

Yodhaペプチドはヒトインフルエンザウイルスに対して殺ウイルス性である

Yodhaペプチドがインフルエンザウイルスのすべての血清型に対して有効であることを示す実験を行った。YodhaペプチドはH1、H3、N1、N2インフルエンザウイルスに対して効果的である。図9Aは、YodhaペプチドがH1N1、H3N2、H1N2、H3N1、およびH3N2ウイルスに対して殺ウイルス性であることを示すデータを表す。YodhaペプチドはH2、H5、H7、およびH9鳥インフルエンザヘマグルチニンにも結合する。3つのH3ウイルスおよび鳥ウイルスH2、H5、H7、およびH9からの組換えヘマグルチニンをビオチン化Yodhaペプチドと共にインキュベートした。抗インフルエンザ抗血清によるウェスタンブロットを使ってウイルスHAを検出し、ストレプトアビジンPEを使ってビオチン化Yodhaペプチドを検出した。試験したインフルエンザのHAにYodhaペプチドが結合することから、これはインフルエンザウイルスに対して広い活性を有することが示唆される。

【０２１２】

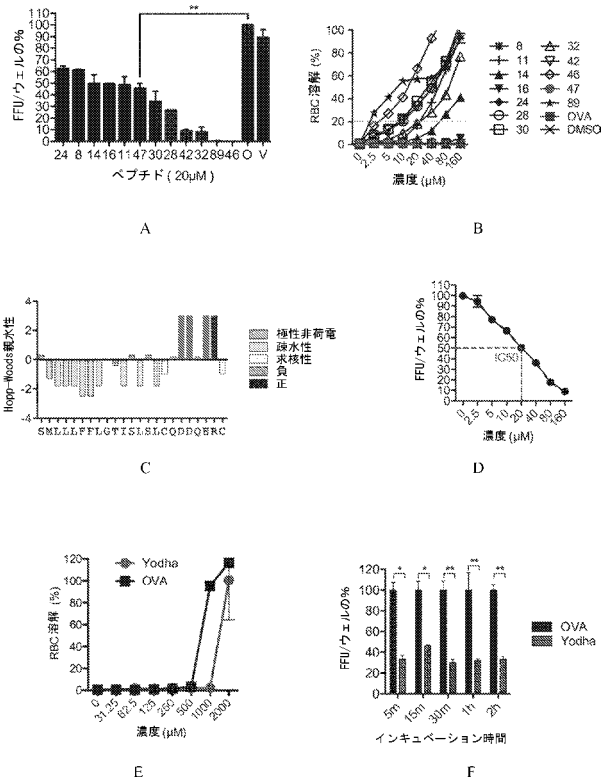
Yodhaペプチドの切断変異体

Yodhaペプチドの入れ子状（nested）切断変異体を作製した。これらをH3N2インフルエンザ（A/愛知/2/68）と共にインキュベートしてから、対照ペプチドと比較した中和能について、細胞ベースアッセイで試験した。図12参照。このデータは、試験した19の切断体のうち8つ（42％）が、添加されたH3N2の50％以上を中和することを示している。

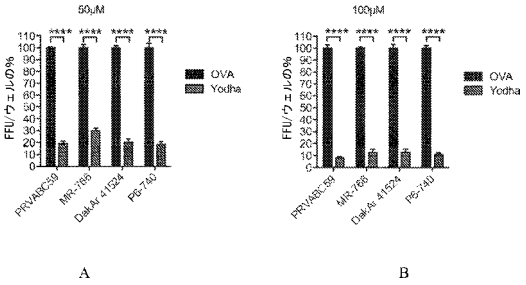
配列	コード	
SMLLLFFLGTISLSLCQDDQER	SY-1	SEQ ID NO: 59
SMLLLFFLGTISLSLCQDDQE	SY-2	SEQ ID NO: 60
SMLLLFFLGTISLSLCQDDQ	SY-3	SEQ ID NO: 61
SMLLLFFLGTISLSLCQDD	SY-4	SEQ ID NO: 62
MLLLFFLGTISLSLCQDDQERC	NSY-1	SEQ ID NO: 63
LLLFFLGTISLSLCQDDQERC	NSY-2	SEQ ID NO: 64
LLFFLGTISLSLCQDDQERC	NSY-3	SEQ ID NO: 65
LFFLGTISLSLCQDDQERC	NSY-4	SEQ ID NO: 66
FFLGTISLSLCQDDQERC	NSY-5	SEQ ID NO: 67
FLGTISLSLCQDDQERC	NSY-6	SEQ ID NO: 68
LGTISLSLCQDDQERC	NSY-7	SEQ ID NO: 69
GTISLSLCQDDQERC	NSY-8	SEQ ID NO: 70
TISLSLCQDDQERC	NSY-9	SEQ ID NO: 71
ISLSLCQDDQERC	NSY-10	SEQ ID NO: 72
LSLCQDDQERC	NSY-11	SEQ ID NO: 73
SLCQDDQERC	NSY-12	SEQ ID NO: 74
LCQDDQERC	NSY-13	SEQ ID NO: 75
CQDDQERC	NSY-14	SEQ ID NO: 76
QDDQERC	NSY-15	SEQ ID NO: 77

【０２１３】
別段の定義がある場合を除き、本明細書において使用する技術用語および科学用語はすべて、本開示が属する技術分野の当業者が一般に理解している意味と同じ意味を有する。本明細書において言及する刊行物およびそれらに言及する理由となった材料は、参照により、本明細書に特に組み入れられる。
【０２１４】
本明細書に記載した開示の特定の態様に対する数多くの等価物は、当業者にはわかるか、せいぜい日常的な実験を使って確かめることができるであろう。そのような等価物は、下記特許請求の範囲に包含されるものとする。

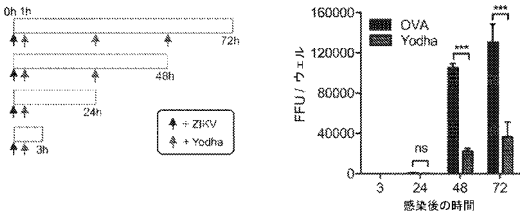
【図１】


FFU/ウェルの%
ペプチド（20μM）
RBC溶解（%）
濃度（μM）
8
11
14
16
24
28
30
32
42
46
47
89
OVA
DMSO
A
B
Hopp-Woods親水性
極性非荷電
疎水性
求核性
負
正
SMLLLFFLGTISLSLCQDDQERC
C
IC50
濃度（μM）
D
Yodha
OVA
RBC溶解（%）
濃度（μM）
E
FFU/ウェルの%
インキュベーション時間
F

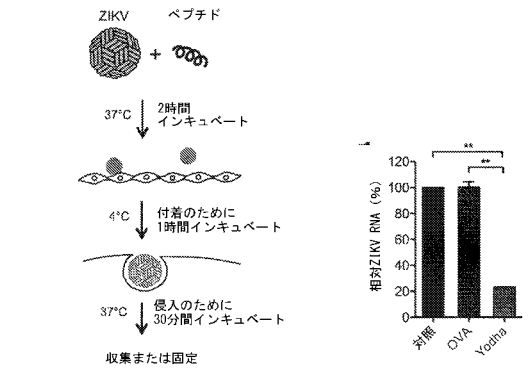
【図２】


50μM
100μM
FFU/ウェルの%
OVA
Yodha
PRVABC59
MR-766
DakAr 41524
PE-7M0
A
B

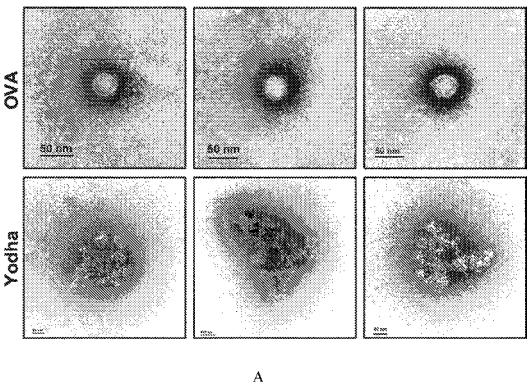
【図３】

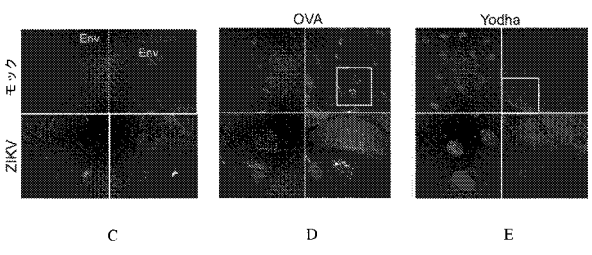

0h 1h
72h
48h
24h
3h
+ ZIKV
+ Yodha
FFU/ウェル
OVA
Yodha
ns
感染後の時間
A
B

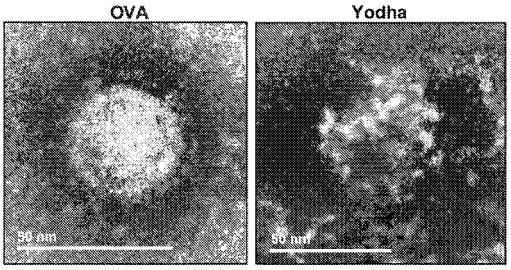
【図４】


ZIKV
ペプチド
37°C
2時間
インキュベート
4°C
付着のために
1時間インキュベート
37°C
侵入のために
30分間インキュベート
収集または固定
相対ZIKV RNA（%）
対照
OVA
Yodha
A
B

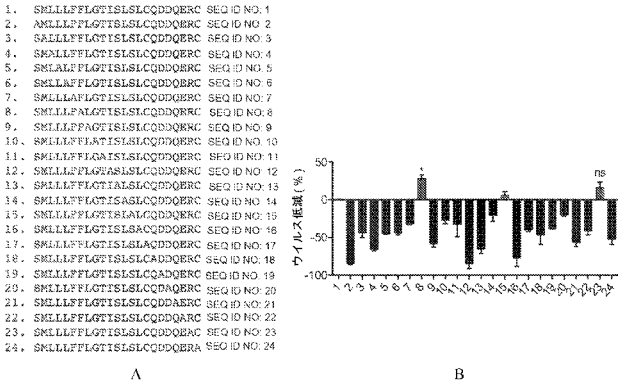
【図５】


OVA
Yodha
50 nm
A


Env
モック
ZIKV
OVA
Yodha
C
D
E


OVA
Yodha
50 nm
B

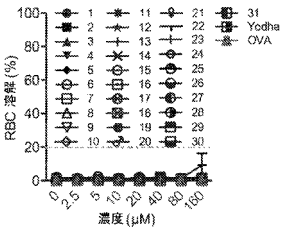
【図６】



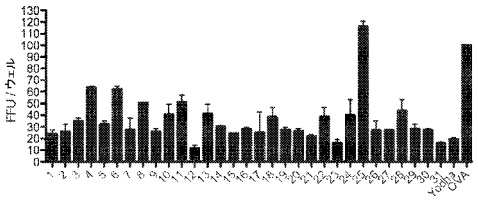
【図７Ａ】

	ペプチド配列		由来	Genebank アクセション番号
Yodha	SMLLLFFLGTISLSLCQDDQERC	SEQ ID NO: 1	ハイララナ・オーランティアカ (Hylarana aurantiaca)	本研究
変異体.1	SMLLLFFLGTISLSLCQDERGA	SEQ ID NO: 25	ヤマアカガエル (Rana ornativentris)	BAI53089
変異体.2	SMLLLFFLGTISLSLCQDEGA	SEQ ID NO: 26	チョウセンヤマアカガエル (Rana dybowskii)	AEK25126
変異体.3	SMLLLFFLGTISLSLCQEERGA	SEQ ID NO: 27	ラナ・ククノリス (Rana kukunoris)	AFP24867
変異体.4	SMLLLFFLGTISLSLCEQERNA	SEQ ID NO: 28	ヒラユビニオイガエル (Odorrana grahami)	ABX58825
変異体.5	SMLLLFFLGTISLSLCEQERDSD	SEQ ID NO: 29	シルビラナ・ラトウチイ (Sylvirana latouchii)	CDN57484
変異体.6	SMLLLFFLGTISLSLCEQERDAD	SEQ ID NO: 30	ハナニオイガエル (Odorrana schmackeri)	CDI30156
変異体.7	SMLLLFFLGTISLSLCQEERGA	SEQ ID NO: 31	オキタゴガエル (Rana tagoi okiensis)	BAJ67382
変異体.8	SMLLLFFLGTISLSLCEEERNA	SEQ ID NO: 32	アモロプス・ロロエンシス (Amolops loloensis)	AFX61483
変異体.9	SMLLLFFLGTISLSLCQEERDA	SEQ ID NO: 33	アムールアカガエル (Rana amurensis)	CAJ80863
変異体.10	SLLLLFFLGTISLSLCQDETNA	SEQ ID NO: 34	オドラナ・アンデルソニイ (Odorrana andersonii)	ACS71263
変異体.11	SLLLLFFLGTINLSLCQDDEMPK	SEQ ID NO: 35	オドラナ・アンデルソニイ (Odorrana andersonii)	ADP06153
変異体.12	PMLLLFFLGTISLSLCQEERGA	SEQ ID NO: 36	ラナ・ククノリス (Rana kukunoris)	ATU99883
変異体.13	SMLLLFFLGTINLSLCQEERDA	SEQ ID NO: 37	イシカワガエル (Odorrana ishikawae)	BAK93309
変異体.14	SLLLLFFLGTISLSLCQEERNA	SEQ ID NO: 38	オドラナ・アンデルソニイ (Odorrana andersonii)	ADP06113
変異体.15	SMLLLFFLGMISLSLCQDERGA	SEQ ID NO: 39	シルビラナ・ラトウチイ (Sylvirana latouchii)	ACM67502
変異体.16	MLLLFFLGTISLSLCEQERNA	SEQ ID NO: 40	オドラナ・アンデルソニイ (Odorrana andersonii)	ABX58825
変異体.17	SMLLLFFLGTINLSLCEQERDA	SEQ ID NO: 41	アモロプス・ハイナネンシス (Amolops hainanensis)	AEB52967
変異体.18	PMLLLFFLGTISLSLCEQERNA	SEQ ID NO: 42	オドラナ・アンデルソニイ (Odorrana andersonii)	ACS71283
変異体.19	SMLLLFFLGTINLSLCEQERNA	SEQ ID NO: 43	アモロプス・ハイナネンシス (Amolops hainanensis)	AEB52956
変異体.20	SLLLLFFLGTISLSLCQREAD	SEQ ID NO: 44	ヒョウガエル (Rana pipiens)	Q8QFQ3
変異体.21	PMLLLFFLGTISLSLCQEERGA	SEQ ID NO: 45	インドシルビラナ・テンポラリス (Indosylvirana temporalis)	ADE40980
変異体.22	SLLLLFFLGTINLSLCQDETNA	SEQ ID NO: 46	ヒラユビニオイガエル (Odorrana grahami)	ABG76537
変異体.23	SMLLLFFLGTINLSLCEERDA	SEQ ID NO: 47	ペロフィラクス・エスクレンツス (Pelophylax esculentus)	P32412
変異体.24	SMLLLFFLGTISLSLCEERR	SEQ ID NO: 48	アムールアカガエル (Rana amurensis)	AFX61483
変異体.25	SMLLLFFLGTISLSLCEEERDA	SEQ ID NO: 49	ヤマアカガエル (Rana ornativentris)	BAI53086
変異体.26	SMLLLFFLGTISLSLCEEERSA	SEQ ID NO: 50	アモロプス・ジングドンゲンシス (Amolops jingdongensis)	AFY06624
変異体.27	SMLLLFFLGTISLSLCEERRNA	SEQ ID NO: 51	アモロプス・ロロエンシス (Amolops loloensis)	AFX61483
変異体.28	GMLLLFFLGTISLSLCEEERGA	SEQ ID NO: 52	ラナ・パルストリス (Rana palustris)	ANW09708
変異体.29	SMLLPFFLGTISLSLCQEEERGA	SEQ ID NO: 53	エゾアカガエル (Rana chensinensis)	ALA55067
変異体.30	SLLLLFFLGTISLSLCEEERNA	SEQ ID NO: 54	チョウセンヤマアカガエル (Rana dybowskii)	AFP24872
変異体.31	SMLLIFFLGTISLSLCEQERDA	SEQ ID NO: 55	ラナ・ドライトニイ (Rana draytonii)	AFR43679

【図７Ｂ】



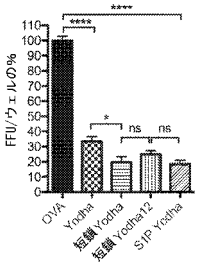
【図７Ｃ】



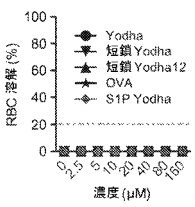
【図７Ｄ】

Yodha	SMLLLFFLGTISLSLCQDDQERC	SEQ ID NO: 1
短鎖 Yodha	SMLLLFFLGTISLSLCQ	SEQ ID NO: 56
短鎖 Yodha12	PMLLLFFLGTISLSLCQ	SEQ ID NO: 57
S1P Yodha	PMLLLFFLGTISLSLCQDDQERC	SEQ ID NO: 58

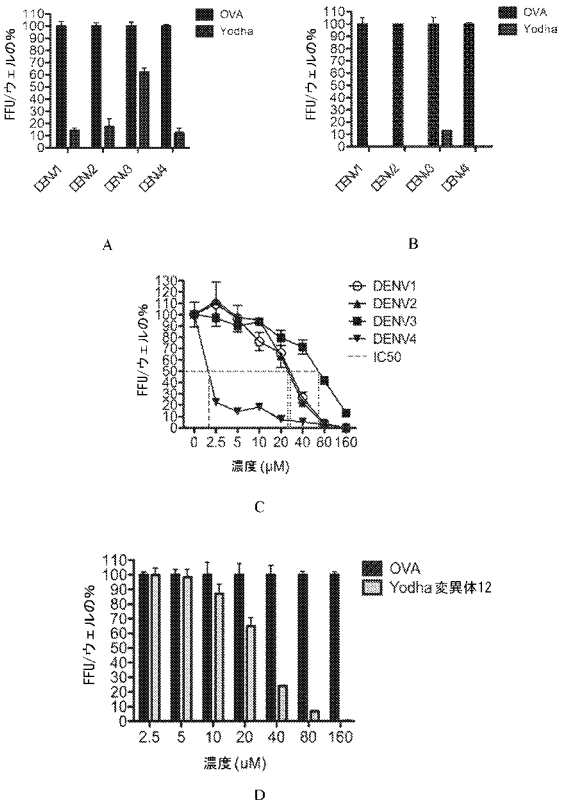
【図７Ｅ】



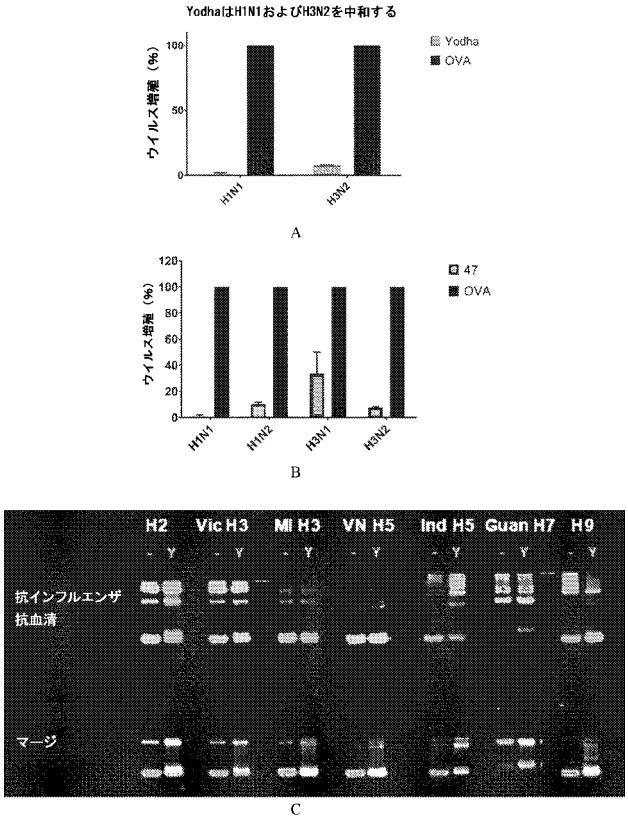
【図７Ｆ】



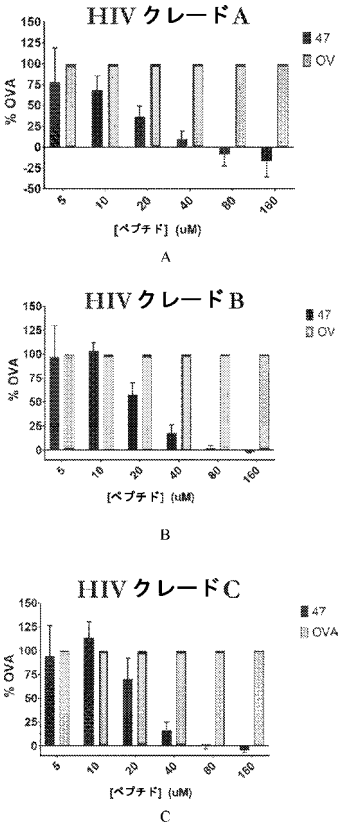
【図８】



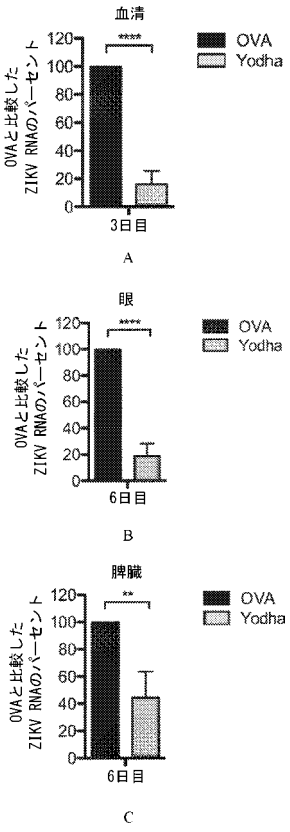
【図９】



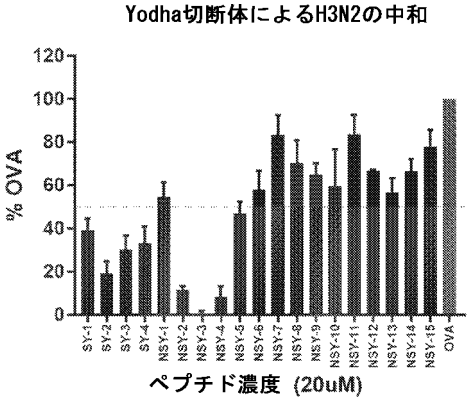
【図１０】



【図１１】



【図１２】



【配列表】
2020513418000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/064330

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 38/17; A61K 38/46; A61K 45/06; A61K 48/00; C07H 21/00; C07H 21/02 (2018.01)
CPC - A61K 38/1729; A61K 38/465; A61K 45/06; A61K 48/0066; A61K 48/0075; A61K 48/0091; C07H 21/02; C07K 14/4723; C12Y 301/27 (2018.02)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC - 424/278.1; 514/44R (keyword delimited)

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/039857 A1 (MODERNA THERAPEUTICS et al) 21 March 2013 (21.03.2013) entire document	1, 5-10, 12-15, 18-20
A	US 2007/0207209 A1 (MURPHY et al) 06 September 2007 (06.09.2007) entire document	1-20
A	RESIMY et al. "Three novel antimicrobial peptides from the skin of the Indian bronzed frog Hylarana temporalis (Anura: Ranidae)," Journal of Peptide Science, 15 March 2011 (15.03.2011), Vol. 17, Pgs. 342-347. entire document	1-20
A	US 2014/0296137 A1 (LOS ALAMOS NATIONAL SECURITY, LLC) 02 October 2014 (02.10.2014) entire document	1-20
A	YANG et al. "Induction of antimicrobial peptides from Rana dybowskii under Rana grylio virus stress, and bioactivity analysis," Canadian Journal of Microbiology, 15 June 2012 (15.06.2012), Vol. 58, Pgs. 848-855. entire document	1-20
A	WO 1998/025961 A1 (SBL VACCIN AB et al) 18 June 1998 (18.06.1998) entire document	1-20
P, A	HOLTHAUSEN et al. "An Amphibian Host Defense Peptide Is Virucidal for Human H1 Hemagglutinin-Bearing Influenza Viruses," Immunity, 18 April 2017 (18.04.2017), Vol. 46, Iss. 4, Pgs. 587-595. entire document	1-20

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28 February 2018	12 MAR 2018
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/064330

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

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

   a. ☒ forming part of the international application as filed:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

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

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 1, 56, 57, 65, and 78 were searched.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI			テーマコード（参考）
A61K 9/20	*(2006.01)*	A61K	9/20		4C065
A61K 9/14	*(2006.01)*	A61K	9/14		4C072
A61K 9/16	*(2006.01)*	A61K	9/16		4C076
A61K 9/06	*(2006.01)*	A61K	9/06		4C084
A61K 9/08	*(2006.01)*	A61K	9/08		4C086
A61P 31/12	*(2006.01)*	A61P	31/12		4C206
A61P 31/16	*(2006.01)*	A61P	31/16		4H045
A61P 31/18	*(2006.01)*	A61P	31/18		
A61P 43/00	*(2006.01)*	A61P	43/00	121	
A61K 31/215	*(2006.01)*	A61K	31/215		
A61K 31/351	*(2006.01)*	A61K	31/351		
A61K 31/52	*(2006.01)*	A61K	31/52		
A61K 31/13	*(2006.01)*	A61K	31/13		
A61K 31/341	*(2006.01)*	A61K	31/341		
A61K 31/708	*(2006.01)*	A61K	31/708		
A61K 31/5365	*(2006.01)*	A61K	31/5365		
A61K 31/536	*(2006.01)*	A61K	31/536		
A61K 31/513	*(2006.01)*	A61K	31/513		
A61K 31/4745	*(2006.01)*	A61K	31/4745		
A61K 31/5375	*(2006.01)*	A61K	31/5375		
C07K 7/08	*(2006.01)*	C07K	7/08	ZNA	
C07K 14/00	*(2006.01)*	C07K	14/00		
C07D 309/28	*(2006.01)*	C07D	309/28		
C07D 473/16	*(2006.01)*	C07D	473/16		
C07D 307/20	*(2006.01)*	C07D	307/20		
C07H 19/16	*(2006.01)*	C07H	19/16		
C07D 498/14	*(2006.01)*	C07D	498/14		
C07D 265/18	*(2006.01)*	C07D	265/18		
C07D 411/04	*(2006.01)*	C07D	411/04		
C07D 471/04	*(2006.01)*	C07D	471/04	105C	
C07D 295/215	*(2006.01)*	C07D	295/215		

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＲＩＴＯＮ

(74)代理人　100160923
弁理士　山口　裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部　俊

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 ジョージ サニル
インド ６９５０２８ ティルヴァナンタプラム バタパラ ピー．オー． チッタザ マニル パーク ケムマーラクジ ハウス
(72)発明者 ジェイコブ ジョシー
アメリカ合衆国 ３００７８ ジョージア州 スネルビル ハーンドン ロード ２４４７
(72)発明者 ホルトハウゼン デビッド
アメリカ合衆国 ３０３２９ ジョージア州 アトランタ ブライアー ビスタ ウェー ノースイースト １５７８
(72)発明者 イ ソン ヒ
アメリカ合衆国 ３０３２４ ジョージア州 アトランタ セイント クレア レーン ノースイースト ６２
(72)発明者 シャアトウニー ジェシカ
アメリカ合衆国 ３０３２２ ジョージア州 アトランタ クリフトン ロード ノースイースト １５９９ フォース フロア

Ｆターム(参考) 4C037 DA04
4C056 AA02 AB01 AC02 AD03 AE03 DA03 DA05 DB04 DC01
4C057 BB02 CC03 DD01 LL39
4C062 BB07 BB16 BB19
4C063 AA01 BB02 CC62 DD29 EE01
4C065 AA05 AA18 BB06 CC09 DD03 EE02 HH01 JJ07 KK01 KK09
LL01 PP01
4C072 AA01 BB03 CC02 CC11 DD10 EE06 FF08 GG07 GG09 HH02
UU01
4C076 AA09 AA11 AA30 AA31 AA36 AA53 CC35 FF01 FF11 FF61
4C084 AA02 AA03 BA01 BA08 BA18 BA23 MA01 MA02 MA17 MA28
MA35 MA37 MA41 MA43 NA05 NA14 ZB33 ZC75
4C086 AA01 AA02 BA03 BA07 BC42 BC72 BC73 CB05 CB07 CB22
EA18 GA05 GA07 GA16 MA01 MA02 MA04 MA07 MA17 MA28
MA35 MA37 MA41 MA43 NA05 NA14 ZB33 ZC75
4C206 AA01 AA02 FA29 GA02 GA30 KA09 MA01 MA02 MA04 MA11
MA37 MA48 MA55 MA57 MA61 MA63 NA05 NA14 ZB33 ZC75
4H045 AA10 AA30 BA10 BA16 BA17 CA53 EA20 FA74