



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7 C07K 7/08, 16/28, A61K 31/00, 38/00	A1	(11) 国際公開番号 WO00/59932 (43) 国際公開日 2000年10月12日(12.10.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01867 (22) 国際出願日 2000年3月27日(27.03.00) (30) 優先権データ 特願平11/91962 1999年3月31日(31.03.99) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒101-8535 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 佐藤智典(SATO, Toshinori)[JP/JP] 〒251-0004 神奈川県藤沢市藤が丘3-24RA-13 Kanagawa, (JP) 石川 大(ISHIKAWA, Dai)[JP/JP] 〒770-0002 徳島県徳島市春日3-1-7-102 Tokushima, (JP) 田中理紀(TANAKA, Michinori)[JP/JP] 〒771-1265 徳島県板野郡藍住町住吉千鳥ヶ浜42-13 Tokushima, (JP) 荻野晃一(OGINO, Koichi)[JP/JP] 〒772-0003 徳島県鳴門市撫養町南浜字東浜197-3 Tokushima, (JP)		瀧 孝雄(TAKI, Takao)[JP/JP] 〒771-0204 徳島県板野郡北島町鯛浜字西ノ須51-24 Tokushima, (JP) (74) 代理人 三枝英二, 外(SAEGUSA, Eiji et al.) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka, (JP) (81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, MX, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: INFLUENZA VIRUS HEMAGGLUTININ-BINDING PEPTIDES (54)発明の名称 インフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチド (57) Abstract Influenza virus hemagglutinin-binding peptides having amino acid sequences represented by, for example, SEQ ID NOS: 1 to 11. These peptides can bind specifically to hemagglutinin participating in the first step of the infection with influenza virus and thus inhibit the binding of the virus to the receptor of the host. Thus, these peptides are useful as preventives for the infection with influenza virus and remedies for influenza.		

(57)要約

本発明によれば、例えば配列番号 1 ~ 11 に示されるアミノ酸配列を有するインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチドが提供される。当該ペプチドは、インフルエンザウイルス感染の第 1 ステップに関与するヘマグルチニンに特異的に結合することにより、宿主受容体へのウイルスの結合を妨げることができ、これによりインフルエンザウイルス感染予防剤として、またインフルエンザ治療剤として有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノールウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュー・ジーランド		
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明 細 書

インフルエンザウイルス・ヘマグルチニン 結合性ペプチド

5 技術分野

本発明は、インフルエンザウイルスに特異的結合性を有するペプチドに関する。より詳細には、本発明はインフルエンザウイルス膜に存在するヘマグルチニンに特異的に結合するペプチドに関する。

- 10 インフルエンザウイルスの宿主への感染は、ウイルスがその表面膜に埋め込まれたヘマグルチニンを介して宿主受容体に結合することによって成立する。本発明のペプチドは、ヘマグルチニンと結合することにより、インフルエンザウイルスの宿主受容体への結合を妨げること
- 15 によって、インフルエンザウイルス感染の防止に有意に寄与するものである。

- ゆえに、本発明は、上記ペプチドについて、インフルエンザウイルスのヘマグルチニンを介した宿主受容体への結合の阻害剤としての用途、並びに抗インフルエンザ
- 20 剤としての用途に関するものでもある。

背景技術

インフルエンザウイルス膜にはヘマグルチニン（H
A）及びノイラミニダーゼ（N A、シアリダーゼ）とい
った２種類のスパイク糖蛋白質が存在し、それぞれウイ
ルスの感染成立及びウイルスの宿主細胞からの出芽に重
5 要な役割を果たしている。前者のヘマグルチニンは、ヒ
トやその他の動物（ほ乳類、鳥類、は虫類、魚類、両生
類等）といった宿主の細胞膜上に普遍的に存在するシア
ル酸含有糖鎖を受容体として認識してそれに特異的に結
合し、インフルエンザウイルスの細胞内へのエンドサイ
10 トーシスを導く。一方、後者のノイラミニダーゼは、受
容体破壊酵素であり、宿主細胞からウイルス粒子が出芽
または遊離する際に、自らのまたは宿主細胞膜上のシア
ル酸残基を切断する役割を担っている。

インフルエンザウイルスは、ウイルス核蛋白質やウイ
15 ルス膜の内側に存在するマトリックス蛋白質などの抗原
性により、A型、B型及びC型に分類される。特にA型
インフルエンザウイルスは、遺伝子交雑や点変異等によ
る抗原性の変化に伴う亜型間の変化により、世界的規模
での流行を繰り返している。

20 前述するようにインフルエンザウイルス感染の第1ス
テップに関与するヘマグルチニンには、極めて変異しや
すい抗原決定領域（A～E）のアミノ酸配列の多様性に

基づいて、種々の亜型が存在する。ヘマグルチニンの亜型間のアミノ酸配列の相違は25～75%にわたるが、宿主細胞の受容体と結合するいわゆる受容体結合ポケット領域は、比較的変異がなく、その三次元構造はよく保存されている（Y. Suzuki, Prog. Lipid. Res., 33, 429 (1994)）

従来から、インフルエンザウイルスの感染を防止するために、感染成立に寄与するヘマグルチニンに特異的に結合することによってその働きを阻害する作用を有するワクチンの開発が検討されている。

その一例として、ヘマグルチニンが宿主受容体のシアル酸含有糖鎖を認識して結合することに基づいて、種々の糖アナログを用いてヘマグルチニンのその結合部位に特異的に結合する糖をスクリーニングするという手法により、現在までに種々のヘマグルチニン結合性糖アナログが取得されている（R. Roy, et al., J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1869 (1993); M. Mammen, et al., J. Med. Chem., 38, 4179 (1995); T. Sato, et al., Chem. Lett., 145 (1999); M. Itzstein, et al., Nature, 363, 418 (1993)）。

そのほか、ヘマグルチニンの受容体糖鎖に対するモノクローナル抗体の抗原結合部位のもつ抗原性（イディオ

タイプ) に対する抗体 (抗イディオタイプ抗体) を作成する手法もある。すなわち、これはヘマグルチニンの受容体となるシアル酸およびシアロ糖鎖の三次元構造に代えて、それと立体構造が類似する抗イディオタイプ抗体の超可変部のアミノ酸配列を作成し、宿主細胞のヘマグルチニン受容体に模擬させるというものである (鈴木康夫「ウイルス感染と糖鎖」、別冊日経サイエンス「糖鎖と細胞」, 89-101頁, 1994年10月)。

しかし、これらのいずれもヘマグルチニンの種々の亜型に特異的であり、また結合定数も高くない。

このため、亜型の別に関わらずインフルエンザウイルス全般に働く広域ワクチンの開発が待たれているのが現状である。

インフルエンザウイルスのヘマグルチニンを特異的に認識し結合する物質、すなわち宿主細胞の受容体に代えてヘマグルチニンの受容体となり得る物質が提供できれば、インフルエンザがヘマグルチニンを介して宿主受容体に結合することを競合的に抑制ないし阻害することができ、インフルエンザウイルスの感染を予防することが可能になるものと期待される。また上記物質が、インフルエンザウイルスの亜型間でよく保存されたヘマグルチニンの「受容体結合ポケット」を特異的に認識してそれ

と結合するものであれば、亜型の別なくインフルエンザウイルス全般にわたってその感染を予防できるものと期待される

本発明は、かかる効果を奏し得る、インフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチドを提供すること
5 を目的とするものである。

図面の簡単な説明

図 1 は、マイクロプレートへのインフルエンザウイルス・ヘマグルチニンの固定化工程を示す概略図である。
10

図 2 は、ヘマグルチニン H 1 をターゲットとしてパニングされた H 1 フェージ（H 1 / 7 フェージ及び H 1 / 3 フェージ）について、ヘマグルチニン H 1 に対する結合性を調べた結果を示す図である。

図 3 は、実施例 4 において、実施例 1 及び実施例 3 で得られたフェージクローン（「A-1」,「B-1」,「B-2」,「C-1」,「C-2」,「H1-1」及び「H1-2」）の、インフルエンザ・ヘマグルチニン H 1 及び H 3 、並びに小麦胚アグルチニン（WGA）に対する結合性を調べた結果を示す図である。
15

図 4 は、実施例 5 において、実施例 1 及び実施例 3 で得られたフェージクローン（「A-1」,「B-1」,「B-2」,「C-1」及び「C-2」（以上、図 4（a）に示す）,「H1-1」及び「H1-2」
20

(以上、図4(b)に示す))の、抗GM3抗体に対する結合性を調べた結果を示す図である。尚、図中、random library(図中-△-で示す)とは、パニング前のランダムなペプチドを発現しているファージの集合を意味する。

5 図5は、実施例7において、ヘマグルチニンへのファージクローン(「A-1」,「B-1」,「B-2」,「C-1」及び「C-2」)の結合に対するガングリオシドGM3の阻害作用を調べた結果を示す図である。図5のa)はヘマグルチニンとしてH1亜型(A/PR/8/34(H1N1))を使用した場合の結果
10 を、b)はヘマグルチニンとしてH3亜型(A/武漢/359/95(H3N2))を使用した場合の結果を示す。

図6は、実施例7において、ヘマグルチニンへのファージクローン(「A-1」,「B-1」,「B-2」,「C-1」及び「C-2」)の結合に対するガングリオシドGM1の阻害作用を調べた
15 結果を示す図である。図6のa)はヘマグルチニンとしてH1亜型(A/PR/8/34(H1N1))を使用した場合の結果を、b)はヘマグルチニンとしてH3亜型(A/武漢/359/95(H3N2))を使用した場合の結果を示す。

図7は、実施例11において、ガングリオシドGM3
20 (GM3キャスト膜)へのヘマグルチニンの結合に対する、ファージクローン(「A-1」)発現ペプチド(合成ペプチド)の阻害作用を調べた結果を示す図である(図中、

－○－で示す。）。図7のa)はヘマグルチニンとして
H1亜型(A/PR/8/34(H1N1))を使用した場合の結果を、
b)はヘマグルチニンとしてH3亜型(A/武漢/359/95
(H3N2))を使用した場合の結果を示す。尚、図中、－
5 □－はペプチドを挿入しているpIII蛋白のN端15残基
ペプチド(コントロール)、－◇－はシアリルラクトー
ス(スタンダード)による結果を示す。

図8は、実施例12において、実施例9で調製したリポ
ペプチド(C₁₈A-1 リポペプチド)を用いて、細胞に対す
10 るインフルエンザウイルス感染阻害活性を調べた結果を
示す図である。a)はインフルエンザウイルスとしてH
1亜型(A/PR/8/34(H1N1))を使用したときの結果を、
b)はH3亜型(A/武漢/359/95(H3N2))を使用したと
き結果である。尚、図中、－○－はC₁₈A-1 リポペプチド
15 の結果、－□－はpIII蛋白N端15残基ペプチドのステア
リン酸誘導体の結果を示す。

図9は、実施例12において、実施例9で調製したリポ
ペプチド(C₁₈A-1 リポペプチド)修飾リポソームを用い
て、細胞に対するインフルエンザウイルス感染阻害活性
20 を調べた結果を示す図である。a)はインフルエンザウ
イルスとしてH1亜型(A/PR/8/34(H1N1))を使用した
ときの結果を、b)はH3亜型(A/武漢/359/95(H3N

2)) を使用したとき結果である。尚、図中、 $-○-$ はC₁₈A-1 リポペプチドの結果、 $-□-$ は p III 蛋白 N 端 15 残基ペプチドのステアリン酸誘導体の結果を示す。

5

発明の開示

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねていたところ、ファージディスプレイ法を用いることにより、インフルエンザウイルスのヘマグルチニンの特異的に認識して結合するペプチドが選択的に取得できることを確認した。

10

本発明は、かかる知見に基づいて開発されたものである。

すなわち、本発明は下記 1 ～ 6 に掲げるインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチドである：

15 1. 下記 (a) または (b) のいずれかである、インフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチド：

(a) 配列番号 1 ～ 11 で示されるアミノ酸配列のいずれかから選ばれるアミノ酸配列を有するペプチド、

(b) 上記 (a) に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失若しくは付加により改変されたアミノ酸配列からなり、且つインフルエンザウイルス・ヘマグルチニンに結合性を有するペプチド。

20

2．配列番号 1 または 6 で示されるアミノ酸配列を有するインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチド。

5 3．配列番号 7 ～ 11 で示されるいずれかのアミノ酸配列を有するインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチド。

4．インフルエンザウイルスが A 型ウイルスである、1 乃至 3 のいずれかに記載のインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチド。

10 5．インフルエンザウイルスが H1N1 亜型である、1 乃至 3 のいずれかに記載のインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチド。

6．インフルエンザウイルスが H3N2 亜型である、1 又は 3 に記載のインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチド。

これらのペプチドはアルキル化又は脂質（リン脂質）化することによってリポペプチドとして調製することもできる。従って本発明のペプチドにはリポペプチドが含まれる。

20 また本発明は、当該リポペプチドを含有するリポソームである。

さらに本発明は、上に記載されるインフルエンザウイ

ルス・ヘマグルチニン結合性ペプチドの少なくとも1種を有効成分として含有するインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合阻害剤である。尚、当該ペプチドはリポソームの形態であることもできる。

- 5 また本発明は下記に掲げる、抗インフルエンザ剤、具体的にはインフルエンザ予防若しくは治療剤として有用な薬学的組成物である。

（A）有効成分として上記のいずれかに記載のインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチドの少なくとも1種、及び薬学的に許容される担体を含有する薬学的組成物。

（B）有効成分であるインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチドをリポペプチドの形態で含有する上記薬学的組成物。

- 15 （C）有効成分であるインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチドをリポソーム修飾体の形態で含有する上記薬学的組成物。

（D）対象とするインフルエンザウイルスがA型ウイルスである上記薬学的組成物。

- 20 （E）対象とするインフルエンザウイルスがA型ウイルスのH1亜型である上記薬学的組成物。

（F）対象とするインフルエンザウイルスがA型ウイル

スの H 3 亜型である上記薬学的組成物。

(G) インフルエンザの予防又は治療剤として用いられる上記薬学的組成物。

- 5 また本発明は、上記 (A) ～ (G) のいずれかに記載の薬学的組成物を被験者に投与することからなるインフルエンザの感染予防方法若しくはインフルエンザの治療方法である。なお、ここで被験者としては、インフルエンザウイルスの感染を受ける可能性のある者 (ヒト若しくはその他の動物 (ほ乳類、鳥類、は虫類、魚類、両生類等を含む) 並びにインフルエンザウイルスに感染した者を挙げる) ことができる。好ましくは感染に係るインフルエンザウイルスが A 型に属するものであり、より好ましくは A 型 H 1 亜型又は H 3 亜型に属するものである。

15

- さらに本発明は前記に記載するインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチド並びに該ペプチド修飾リポソームの、上記抗インフルエンザ剤 (インフルエンザ予防若しくは治療剤) としての使用に関し、さらには前記記載のインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチド並びに該ペプチド修飾リポソームの、抗インフルエンザ剤 (インフルエンザ予防若しくは治療
- 20

剤)として用いられる薬学的組成物の製造のための使用に関する。

なお、以下、本明細書におけるアミノ酸、ペプチド、
5 塩基配列、核酸等の略号による表示は、IUPAC、IUBの規定、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」(特許庁編)及び当該分野における慣用記号に従うものとする。

本発明のインフルエンザウイルスのヘマグルチニン結合性ペプチドの具体例としては、後述する実施例に示される方法により得られる配列番号1から11に示されるアミノ酸配列を有するものを例示することができる。

以下、本発明のヘマグルチニン結合性ペプチド(以下、HA結合性ペプチドともいう)の選別方法及びこれにより得られたペプチドの同定、並びに該ペプチドのヘマグルチニンへの結合性について説明する。

本発明のHA結合性ペプチドの選別及び同定には、分子ライブラリーのスクリーニング手法を採用することができ、上記ライブラリーとしては、例えばファージディスプレイライブラリーを好ましく用いることができる。

かかるライブラリーとしては、市販のものをを用いることができる。該ライブラリー中のランダムペプチドディ

スプレイファージによれば、特定の標的分子又は目的の細胞に結合するペプチドを、該分子又は細胞を用いてインビトロでスクリーニングでき、しかも該スクリーニングにより選別されたペプチドが発現できるので、標的とする分子又は細胞と特異的に結合するペプチドの選別及び同定に有用である。該ファージディスプレイライブラリーを用いるスクリーニングは、ファージディスプレイ法と呼ばれ、従来から種々の細胞表面レセプターと特異的に結合するリガンドや種々の抗体の選別及び同定に使用されている。なお、これらファージディスプレイライブラリーの作成方法及びインビトロスクリーニング法については、スコット及びスミスらの方法が参照される (Scott, J. M. and Smith, G. P., Science, 249, 386-390 (1990); Smith, G. P. and Scott, J. K., Methods in Enzymology, 217, 228-257 (1993))。なお、これらの文献は、本発明の一部としてここに引用される。

本発明のHA結合性ペプチドは、上記ファージディスプレイ法を用いてヘマグルチニンに結合するペプチドをインビトロでスクリーニングすることによって取得することができる。具体的には以下の方法によって行うことができる。

すなわち、まず、公知のファージライブラリーにラン

ダムなDNA配列を挿入して、ファージの外殻表面にランダムなアミノ酸配列を有するペプチドを発現し得るよう
に構築したランダムペプチドディスプレイファージを用いて、これを予めマイクロプレート等の固相表面上に
5 固定化したインフルエンザウイルスのヘマグルチニンと反応させて、該ヘマグルチニンと特異的に結合するファージを回収する（バイオパニング）。

なお、マイクロプレートに固定化させるインフルエンザウイルスのヘマグルチニンとしては、少なくとも宿主
10 細胞の受容体と結合する「受容体結合ポケット」を保存的に有するものであれば特に制限されず、例えばヘマグルチニンまたはインフルエンザウイルスそのものであってもよいし、またインフルエンザウイルスをエーテル等の各種有機溶媒で抽出処理したインフルエンザウイルス
15 抽出物等であってもよい。また、インフルエンザウイルスの種類も特に制限されず、目的に応じてA型、B型またはC型、乃至はヒト分離型、ブタやウマ等の他の哺乳動物分離型または鳥類分離型等のいずれであることができる。好ましくはA型ウイルス、またはヒト分離型のウ
20 イルスである。

前述するようにヘマグルチニンの「受容体結合ポケット」の三次構造はインフルエンザウイルスの亜型にかか

わらずよく保存されているので、上記マイクロプレートに固定化させるインフルエンザウイルスのヘマグルチニンとしては、亜型の別を何ら問うものではないが、好適には最近約 10 年の間ヒトから分離されている A 型の亜型である H 1 亜型や H 3 亜型を例示することができる。

ヘマグルチニンと特異的に結合するファージの回収は、宿主細胞の受容体と競合してヘマグルチニンと結合する能力を有する H A 受容体物質、またはヘマグルチニンの宿主細胞の受容体への結合を阻害する能力を有する H A 阻害剤を、固定化したヘマグルチニンに対して作用させることによって行うことができる。すなわち、マイクロプレート上に固定化されたヘマグルチニンに特異的に結合しているファージは、上記 H A 受容体物質または H A 阻害剤を競合反応させることにより脱離溶出し、それにより回収することができる。

ここで、H A 受容体物質としては、ヘマグルチニンに特異的に結合する能力を有するものであれば特に制限されない。ヘマグルチニンの受容体結合ポケットに特異的に結合しているファージを回収するには、H A 受容体物質としてヘマグルチニンの受容体結合ポケットに特異的に結合する能力を有するものを用いることが好ましい。かかる H A 受容体物質としては、制限はないが、ガング

リオシド GM 3、 α (2 $\rightarrow$ 6) GM 3、シアリル Lewis X 等を例示することができる。

また、HA 阻害剤としては、ヘマグルチニンの宿主細胞受容体への結合を阻害する能力を有するものであれば
5 特に制限されず、例えばシアル酸誘導体 7-F-Neu5Ac2en、2,7-Dideoxy-7-fluoro-2,3-didehydro sialic acid、シアル酸デンドリマー、シアル酸含有ポリマー等を挙げる
ことができる。

かくして得られるファージを大腸菌に感染させて大量
10 培養し、分離、精製して、ヘマグルチニンと特異的に結合するペプチド発現ファージ、好ましくはヘマグルチニンの受容体結合ポケットに特異的に結合するペプチド発現ファージを得る。かくして得られるファージは、再び
上記と同様に、固定化ヘマグルチニンと反応させてイン
15 フルエンザウイルスのヘマグルチニンと特異的に結合するファージをスクリーニングするパニング (panning) 操作に供される。

かかるパニング操作を数回、好ましくは 4 ~ 6 回程度繰り返すことによりヘマグルチニンと特異的に結合する
20 ペプチド、好ましくはヘマグルチニンの受容体結合ポケットに特異的に結合するペプチドを発現し得るファージが選別できる。

次いで、選択されたファージからDNAを抽出しその配列を決定することにより、ファージが発現するペプチド、すなわちインフルエンザのヘマグルチニンと特異的に結合するペプチド（HA結合性ペプチド）、好ましくはヘマグルチニンの受容体結合ポケットに特異的に結合するペプチドを同定することができる。

上記DNAの配列決定は、当業界で公知の方法により容易に行うことができ、例えばジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 74, 5463-5467 (1977)〕やマキサム-ギルバート法〔Method in Enzymology, 65, 499 (1980)〕等を挙げることができる。かかる塩基配列の決定は、市販のシーケンスキット等を用いても容易に行うことができる。

上記ファージディスプレイ法においてファージライブラリーとしては、通常この方法で用いられる公知のファージライブラリーがいずれも使用できる。特に制限されないが、具体的にはファージのコートタンパク質 p III 遺伝子にランダムなDNAが挿入されて、ファージ外殻表面にランダムな15個のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するペプチドを発現し得るように構築されたランダムペプチドディスプレイファージ（繊維状ファージ）を好適に例示することができる（演題：2C103「ファージデ

ィスプレイ法による糖脂質に結合するペプチドのセレクション」、第3回 日本化学会バイオテクノロジー部会シンポジウム（1998）；日本国特願平11-000769号；）。

- 5 このようにして同定されたHA結合性ペプチドのヘマグルチニンに対する親和性（結合性）は、前述するHA結合性ペプチドを発現し得るファージの選別方法（パニング）において、ランダムペプチドディスプレイファージに代えて、測定対象ペプチドである同定されたHA結合性ペプチドを用いて同様に行うことによって確認、評価
- 10 することができる。

 本発明の一例として、固定化インフルエンザウイルス（ヘマグルチニン）として、A型（H1亜型）のインフルエンザウイルスであるA/PR/8/34（H1N1）のエーテル抽出物を、また溶出用物質としてHA受容体物質またはHA阻害剤のいずれかを用いて、HA結合性ペプチドを発現するファージを選択し、その発現ペプチドを同定する方法を後記実施例1に記載する。

15

 かかる本発明の一態様によって同定されたペプチドは、

20 配列番号1から6に示されるいずれかのアミノ酸配列を有するものであり、これらはいずれもインフルエンザウイルスのヘマグルチニン、特にヘマグルチニンの受容体

結合ポケットに対して結合性を有することにより特徴づけられる。またこれらのペプチドは、インフルエンザウイルスの中でも A 型ウイルスまたはヒト型ウイルスのヘマグルチニンに対して結合性を有するものとして特徴づけることができる。なお、これらのペプチドは、ヘマグルチニン H 1 亜型をターゲットとして選択されたものであり、この亜型に特異的結合性を有するものとして特徴づけられる。中でも配列番号 1 及び配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を有するペプチドが、H 1 亜型に特異的に結合するペプチドとして好適に例示される。

また本発明の一例として、固定化インフルエンザウイルス（ヘマグルチニン）として、A 型の H 1 亜型である A/PR/8/34（H1N1）及び H 3 亜型である A/武漢/359/95

（H3N2）のエーテル抽出物を、また溶出用物質として各種の H A 受容体物質（シアリル Lewis X、 α （2 → 6）GM 3）を用いて、これらのヘマグルチニンの両方を認識し結合するペプチドを発現するファージを選択し、該発現ペプチドを同定する方法を後記実施例 3 に記載する。

かかる本発明の態様によって同定されたペプチドは、配列番号 7 から 11 に示されるいずれかのアミノ酸配列を有するものである。これらの H A 結合性ペプチドは、ヘマグルチニンの亜型である H 1 及び H 3 の両方に対し

て結合性を有することにより特徴づけられる。ヘマグルチニンの H 1 亜型及び H 3 亜型は、互いにアミノ酸配列が 75 % 相違することが知られていることから、上記 H A 結合性ペプチドはヘマグルチニンの H 1 亜型と H 3 亜型の相同性の高い部位を認識して、該部分に結合するものと考えられる。

また上記 H A 結合性ペプチドのうち、特に配列番号 7 で示されるペプチドは、異なる 2 つの溶出用物質（シアリル Lewis X、 α (2 → 6) GM 3）で共に溶出され取得されることから、そのヘマグルチニンへの結合部位はシアリル Lewis X や α (2 → 6) GM 3 のヘマグルチニンへの結合部位と同一であって、また同じ結合様式を有するものと考えられる。

本発明のペプチドには、上記配列番号 1 から 6 に示されるいずれかのアミノ酸配列を有するペプチド、並びに配列番号 7 から 11 に示されるいずれかのアミノ酸配列を有するペプチドの他に、これらのアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失若しくは付加により改変されたアミノ酸配列からなり、且つインフルエンザウイルスのヘマグルチニン、特に A 型インフルエンザウイルスのヘマグルチニンに結合性を有するペプチド並びに蛋白質が包含される。

ここで配列番号 1 から 6 に示されるペプチドに関して、アミノ酸の「置換、欠失若しくは付加」の程度及びそれらの位置などは、改変されたペプチド若しくは蛋白質が、配列番号 1 から 6 で示されるアミノ酸配列のいずれかからなるペプチドと同様にインフルエンザウイルスのヘマグルチニン、特にヘマグルチニンの受容体結合ポケットに対して結合性を有するといった上記特徴を備えた同効物であれば特に制限されない。好ましい特徴としては、ヘマグルチニンの H 1 亜型に特異的に結合性を有することを挙げることができる。

また、ここで配列番号 7 から 11 に示されるペプチドに関して、アミノ酸の「置換、欠失若しくは付加」の程度及びそれらの位置などは、改変されたペプチド若しくは蛋白質が、配列番号 7 から 11 で示されるアミノ酸配列のいずれかからなるペプチドと同様にインフルエンザウイルスのヘマグルチニン、特にヘマグルチニンの受容体結合ポケットに対して結合性を有するといった特徴を備えた同効物であれば特に制限されないが、好ましくはヘマグルチニンの H 1 亜型及び H 3 亜型の双方に対して結合性を有するといった特徴を備えた同効物を挙げることができる。

このようなアミノ酸配列の改変（変異）は、例えば突

然変異や翻訳後の修飾などにより生じることもあるが、人為的に行うこともできる。本発明は、このような改変・変異の原因及び手段などを問わず、上記特性を有する全ての改変ペプチドを包含するものである。

- 5 本発明の H A 結合性ペプチドは、そのアミノ酸配列に従って、一般的な化学合成法により製造することができる。該方法には、通常の液相法及び固相法によるペプチド合成法が包含される。かかるペプチド合成法は、より詳しくは、本発明で提供するアミノ酸配列情報に基づいて、各アミノ酸を 1 個ずつ逐次結合させ鎖を延長させていくステップワイズエロゲーション法と、アミノ酸数個からなるフラグメントを予め合成し、次いで各フラグメントをカップリング反応させるフラグメント・コンデンセーション法とを包含する。本発明のペプチドの合成は、
- 10 そのいずれによることもできる。
- 15

- 上記ペプチド合成に採用される縮合法も、公知の各種方法に従うことができる。その具体例としては、例えばアジド法、混合酸無水物法、D C C 法、活性エステル法、酸化還元法、D P P A (ジフェニルホスホリルアジド)法、
- 20 D C C + 添加物 (1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシサクシンアミド、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド等)、ウッドワー

ド法等を例示できる。これら各方法に利用できる溶媒もこの種のペプチド縮合反応に使用されることがよく知られている一般的なもののから適宜選択することができる。

その例としては、例えば ジメチルホルムアミド(D M

5 F)、ジメチルスルホキシド(D M S O)、ヘキサホスホロアミド、ジオキサン、テトラヒドロフラン(T H F)、酢酸エチル等及びこれらの混合溶媒等を挙げることができる。

尚、上記ペプチド合成反応に際して、反応に関与しない
10 いアミノ酸及至ペプチドにおけるカルボキシル基は、一般にはエステル化により、例えばメチルエステル、エチルエステル、第三級ブチルエステル等の低級アルキルエステル、例えばベンジルエステル、p-メトキシベンジルエステル、p-ニトロベンジルエステルアルキルエ
15 ステル等として保護することができる。また、側鎖に官能基を有するアミノ酸、例えばTyrの水酸基は、アセチル基、ベンジル基、ベンジルオキシカルボニル基、第三級ブチル基等で保護されてもよいが、必ずしもかかる保護を行う必要はない。更に例えばArgのグアニジノ基は、ニ
20 トロ基、トシル基、2-メトキシベンゼンスルホニル基、メチレン-2-スルホニル基、ベンジルオキシカルボニル基、イソボルニルオキシカルボニル基、アダマンチル

オキシカルボニル基等の適当な保護基により保護することができる。上記保護基を有するアミノ酸、ペプチド及び最終的に得られる本発明のペプチドにおけるこれら保護基の脱保護反応もまた、慣用される方法、例えば接触還元法や、液体アンモニア／ナトリウム、フッ化水素、臭化水素、塩化水素、トリフルオロ酢酸、酢酸、蟻酸、メタンスルホン酸等を用いる方法等に従って、実施することができる。

かくして得られる本発明のH A結合性ポリペプチドは、通常の方法に従って、例えばイオン交換樹脂、分配クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(H P L C)、向流分配法等のペプチド化学の分野で汎用されている方法に従って、適宜その精製を行うことができる。

また、上記本発明のH A結合性ペプチドは、適宜に化学修飾することができ、例えばアルキル化や脂質化(リン脂質化)等による化学修飾により、H A結合性ペプチドの細胞親和性や組織親和性を増大させ、或いは血中半減期の延長等による薬理効果の増強を意図することができる。

H A結合性ペプチドのアルキル化は常法に従って実施

することができる。例えば、脂肪酸とH A結合性ペプチドのN末端アミノ基とのアミド結合形成反応（前記のペプチド合成と同様にして実施）により容易に実施される。

脂肪酸としては、直鎖や分枝鎖の別及び飽和や不飽和の別に特に制限されることなく、任意の脂肪酸を広く例示できる。一般的には、生体内に存在する脂肪酸が好適に採用でき、具体的にはラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキン酸等の飽和脂肪酸；オレイン酸、エライジン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキドン酸等の不飽和脂肪酸など、炭素数が12～20程度の脂肪酸が例示される。

またアルキル化は、アルキルアミンとH A結合性ペプチドのC末端カルボキシル基とのアミド結合形成反応（前記ペプチド合成と同様にして実施）によっても収得できる。アルキルとしては、上記脂肪酸と同様に各種のアルキルアミンが例示でき、一般的には生体内に存在する脂肪鎖（炭素数が12～20程度）を好適に採用することができる。

H A結合性ペプチドの脂質化も常法に従って実施できる（New Current, 11(3), 15-20 (2000); Biochimica et Biophysica Acta., 1128, 44-49 (1992); FEBS Letters, 413, 177-180 (1997); J. Biol. Chem., 257, 286-28

8 (1982)等)。例えば、各種リン脂質の2位水酸基或いは3位のリン酸基を利用して、任意のスペーサーを介してH A結合性ペプチドの脂質修飾体を調製することができる。反応には各種の縮合法が採用でき、必要によりH A結合性ペプチドのN端或いはC端に任意の長さ（通常数個）のシステインを含むアミノ酸配列を付加して、縮合に利用される反応性S H基を導入することもできる。

ここでリン脂質としても、特に制限はなく、上記した各種の脂肪酸からなる、ホスファチジン酸、ホスファチジルコリン（レシチン）、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール等が良好に使用できる。

なお、これらのアルキル化や脂質化された本発明のH A結合性ペプチド（リポペプチド）は、リポソーム調製の際の脂質成分としても作用し、また当該ペプチドがリポソーム上に提示されることにより、後述するリポソーム製剤に極めて好適に用いられる。

本発明のH A結合性ペプチドは、インフルエンザ感染の第1ステップに関与するインフルエンザウイルスのヘマグルチニンを特異的に認識してそれに結合するアミノ酸配列を有するものであり、それ自身、in vivoにおいて、

ヘマグルチニンを介して生じるインフルエンザウイルスと宿主細胞受容体との結合を競合的に妨げることのできるものとして、すなわちヘマグルチニン結合阻害剤として用いることができる。当該ヘマグルチニン結合阻害剤は、ヘマグルチニンを介して生じるインフルエンザウイルスの感染、並びにそれに伴う種々の細胞機能や生命現象を解明するためのツールとして用いることができ、また宿主細胞受容体へのヘマグルチニンの結合を介して生じるインフルエンザウイルスの感染を予防したり、インフルエンザを治療するのに用いられる抗インフルエンザ剤、具体的にはインフルエンザの感染予防薬又は治療薬の有効成分として有用であると期待される。

なお、本発明が対象とするインフルエンザウイルスは、前述するようにその型や由来を特に制限するものでなく、A型、B型またはC型乃至はヒト分離型、ブタやウマ等の他の哺乳動物分離型または鳥類分離型等のいずれであることができる。好ましくはA型インフルエンザウイルスである。また好適にはヒト分離型若しくはヒト感染型のウイルスである。

インフルエンザウイルス感染の予防又は治療薬の有効成分として用いられる場合、本発明のHA結合性ペプチド（HA結合性を有するその改変若しくは修飾ペプチド

を包含する。以下同じ。)は、そのままか、若しくは薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物として調製され、被験者に投与される。

5 ここで用いられる薬学的に許容される担体は、調製される薬学的組成物の形態に応じて、当該分野において慣用されている担体の中から適宜選択して用いることができる。

10 例えば、薬学的組成物が水溶液形態として調製される場合、上記の担体としては、精製水（滅菌水）または生理学的緩衝液を利用することができる。また、該組成物が適当な溶液形態に調製される場合、上記担体としては例えば、グリコール、グリセロール、オリーブ油のような注射投与可能な有機エステルなどを使用することができる。また、これらの組成物には、当該分野、特にペプチド製剤ないしは蛋白製剤の分野で慣用的に用いられる安定剤、賦形剤などを含むことができる。

15 また本発明のHA結合性ペプチドはリポソーム製剤として調製することができる。

20 リポソーム製剤は、酸性リン脂質を膜構成成分とするか或いは中性リン脂質と酸性リン脂質とを膜構成成分とするリポソームに、本発明のHA結合性ペプチドを保持させることによって調製できる。

ここで、膜構成成分としての酸性リン脂質としては、
通常の酸性リン脂質より狭義に定義され、より具体的には
ジラウロイルホスファチジルグリセロール（D L P
G）、ジミリストイルホスファチジルグリセロール（D
5 M P G）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール
（D P P G）、ジステアロイルホスファチジルグリセ
ロール（D S P G）、ジオレオイルホスファチジルグリセ
ロール（D O P G）、卵黄ホスファチジルグリセロール
（卵黄 P G）、水添卵黄ホスファチジルグリセロール等
10 の天然または合成ホスファチジルグリセロール類（P
G）およびジラウロイルホスファチジルイノシトール
（D L P I）；ジミリストイルホスファチジルイノシト
ール（D M P I）、ジパルミトイルホスファチジルイノ
シトール（D P P I）、ジステアロイルホスファチジル
15 イノシトール（D S P I）、ジオレオイルホスファチジ
ルイノシトール（D O P I）、大豆ホスファチジルイノ
シトール（大豆 P I）、水添大豆ホスファチジルイノシ
トール等の天然または合成ホスファチジルイノシトール
20 類（P I）を示す。これらは一種単独でまたは二種以上
混合して使用できる。

また、中性リン脂質としては、大豆ホスファチジルコ
リン、卵黄ホスファチジルコリン、水添大豆ホスファチ

ジルコリン、水添卵黄ホスファチジルコリン、ジミリスト
トイルホスファチジルコリン（D M P C）、ジパルミト
イルホスファチジルコリン（D P P C）、ジラウロイル
ホスファチジルコリン（D L P C）、ジステアロイルホ
5 スファチジルコリン（D S P C）、ミリストイルパルミ
トイルホスファチジルコリン（M P P C）、パルミトイ
ルステアロイルホスファチジルコリン（P S P C）、ジ
オレオイルホスファチジルコリン（D O P C）等の天然
または合成ホスファチジルコリン類（P C）、大豆ホス
10 ファチジルエタノールアミン、卵黄ホスファチジルエタ
ノールアミン、水添大豆ホスファチジルエタノールアミ
ン、水添卵黄ホスファチジルエタノールアミン、ジミリ
ストイルホスファチジルエタノールアミン（D M P E）、
ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（D P
15 P E）、ジラウロイルホスファチジルエタノールアミン
（D L P E）、ジステアロイルホスファチジルエタノー
ルアミン（D S P E）、ミリストイルパルミトイルホス
ファチジルエタノールアミン（M P P E）、パルミトイ
ルステアロイルホスファチジルエタノールアミン（P S
20 P E）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン
（D O P E）等の天然または合成ホスファチジルエタノ
ールアミン類（P E）等を例示できる。これらは一種単

独でまたは二種以上混合して使用することができる。

上記リポソーム膜は、上記酸性リン脂質を単独で構成成分として用いるかまたは上記中性リン脂質と酸性リン脂質とを併用して常法に従い形成される。ここで酸性リン脂質の併用割合は、リポソーム膜構成成分中に約 0.1 ~ 100 モル % 程度、好ましくは約 1 ~ 90 モル %、より好ましくは約 10 ~ 50 モル % 程度とするのがよい。

上記リポソームの調製に当たっては、更に例えばコレステロールなどを添加することができる。このコレステロールの添加によればリン脂質の流動性を調整して、リポソームの調製をより簡便なものとすることができる。該コレステロールは通常リン脂質に対して等量まで、好ましくは 0.5 ~ 1 倍等量の量で添加配合されるのが好ましい。

リポソーム分散液中の有効成分と酸性リン脂質との配合割合は、有効成分に対して酸性リン脂質が約 0.5 ~ 100 当量程度、好ましくは約 1 ~ 60 当量程度、より好ましくは約 1.5 ~ 20 当量程度とされるのがよい。

また、リポソームに含まれる本発明 H A 結合性ペプチドの割合は、全脂質中、数モル % から数十モル % 程度、好ましくは 5 ~ 10 モル % 程度であることができるが、通常は 5 モル % 程度でもあってもよい。

本発明のH A結合性ペプチドを薬物とするリポソームの製造には種々の公知の方法を用いることができ、また、リポペプチドである本発明ペプチドは、当該方法における脂質成分として利用することによっても所望のリポソームとすることができる。

例えば多重層リポソーム(M L V)は次のようにして調製される。まず、脂質を有機溶媒(クロロホルム、エーテル等)に溶解した後、丸底フラスコに入れ、窒素気流下または減圧下で有機溶媒を除去し、フラスコ底部に脂質の薄膜をつくる。この場合、さらに減圧下でデシケーター中に放置することによって有機溶媒を完全に除去することもできる。次いで、薬物溶液を脂質薄膜上に加えて脂質を水和させることによって乳濁色のリポソーム懸濁液が得られる。

また大きな一枚膜リポソーム(L U V)は、ホスファチジルセリンの小さな一枚膜リポソームに Ca^{2+} を添加し、融合させてシリンダー状のシートとした後、キレート剤であるE D T Aを添加し Ca^{2+} を除去する方法(Biochim. Biophys. Acta 394, 483-491, 1975)やエーテルに溶解した脂質を約60℃の水溶液中に注入し、エーテルを蒸発させる方法(Biochim. Biophys. Acta 443, 629-634, 1976)により作ることができる。

また、Szokaらの考案した逆相法によるリポソームの調製法 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 4194-4198, 1978) を用いることもできる。この方法によると、リン脂質のエーテル溶液に薬物溶液を加え、超音波処理するとW/O型エマルションが作成される。このW/O型エマルションを減圧下、エバポレーターによりエーテルを除去し、次いで緩衝液を加えボルテックスミキサーで攪拌すると、W/O型エマルションからO/W型エマルションに転相し、更に残留する有機溶媒を除くことによってリポソームが作成できる。

これらの調製法のほかに、フレンチプレス法により粒子径の小さなリポソームを調製することもできる (FEBS lett. 99, 210-214, 1979)。また大沢らによって報告されているリポソームへの保持効率の高い凍結乾燥法 (Chem. Pharm. Bull. 32, 2442-2445, 1984) と凍結融解法 (Chem. Pharm. Bull. 33, 2916-2923, 1985) を使用することもできる。

このように調製されたりポソームは、透析法 (J. Pharm. Sci. 71, 806-812, 1982) やポリカーボネート膜を用いたろ過法 (Biochim. Biophys. Acta 557, 9-23, 1979; Biochim. Biophys. Acta 601, 559-571, 1980) により、粒子径を一定にすることができる。また調製された

リポソーム溶液から、リポソーム内に保持されなかった薬物を除くためには、透析法、ゲルろ過法、遠心分離法を利用することができる（リポソーム．"脂質の化学"[日本生化学会編、生化学実験講座3]、東京化学同人、1974）。更にまた透析膜を用いてリポソームを濃縮することも可能である。

このようにして調製されるリポソーム分散液には、製剤設計上必要な添加剤として、防腐剤、等張化剤、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤、吸収促進剤等の各種の公知物質を適宜配合することができ、また必要に応じてこれらの添加物を含む液または水で希釈することもできる。上記添加剤の具体例としては、防腐剤としては塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、クロロヘキシジン、パラベン類（メチルパラベン、エチルパラベン等）、チメロサル等の真菌および細菌に有効な防腐剤を、等張化剤としてはD-マンニトール、D-ソルビトール、D-キシリトール、グリセリン、ブドウ糖、マルトース、蔗糖、プロピレングリコール等の多価アルコール類や塩化ナトリウム等の電解質類を、また安定化剤としてはトコフェロール、ブチルヒドロキシアニソール、ブチルヒドロキシトルエン、エチレンジアミン四酢酸塩（EDTA）、システイン等をそれぞれ例示できる。

また、本発明のH A結合性ペプチドからなる上記リポソームの内部には、例えば抗ウイルス剤等の他の薬剤を更に封入させることができ、同様にリポソーム製剤とすることができる。

5 リポソーム製剤の製造は、具体的には例えばウッドレ
ら (Long Circulating Liposomes: old drugs, New the
rapeutics., M.C. Woodle, G.Storm, Eds: Springer-Ver
lag Berlin (1998)) またはナンバラ (Liposomal appli
cations to cancer therapy, Y.Namba, N.Oku, J.Bioac
10 t.Compat.Polymers, 8, 158-177 (1993)) の文献に記載
される方法に従って調製することができる。また本発明
に関するリポソーム製剤の具体例は、例えば後記実施例
9 に示されている。

上記リポソーム製剤を含む本発明の薬学的組成物中の
15 H A結合性ペプチドの量としては、特に限定されず広範
囲に適宜選択されるが、通常組成物中0.0002~0.
2 (w/v%) 程度、好ましくは0.001~0.1
(w/v%) 程度とするのがよい。

本発明のインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結
20 合阻害剤並びに薬学的組成物は、有効成分としてのH A
結合性ペプチドと薬学的に許容される担体を含有する製
剤組成物として、インフルエンザウイルスに感染若しく

は感染前の被験者に投与される。

上記阻害剤並びに薬学的組成物の投与方法は特に制限はなく、各種製剤形態、患者の年齢、性別、その他の条件、疾病の重篤度等に応じて適宜決定される。製剤形態としては注射剤、点滴剤、点鼻剤及び吸入剤等の非経口投与形態を好適に挙げることができ、特に注射剤や点滴剤として調製される場合は、必要に応じてブドウ糖やアミノ酸等の通常の補液と混合して静脈内投与されるか、また筋肉内投与、皮内投与、皮下投与もしくは腹腔内投与される。

本発明のインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合阻害剤乃至は薬学的組成物の1日当りの投与量は、被験者の症状、体重、年齢、性別等によって異なり一概に決定できないが、HA結合性ペプチドの量に換算して通常成人1日当たり約0.001～100mg程度の範囲から選ぶことができる。当該製剤は1日1回投与に限らず、数回に分けて投与することができる。

発明を実施するための最良の形態

20

以下、本発明の説明のために実施例を記載するが、当該実施例はなんら本発明の技術的範囲を制限するもので

はない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾、変更を加えることができ、それらはいずれも本発明の技術的範囲に含まれる。

5 参考例 1 ファージディスプレイライブラリーの調製

西、佐谷らの報告 (Nishi T., Saya H., et al., FEB S Lett, 399, 237-240 (1996)) に従ってファージディスプレイライブラリーを作成した (2.5×10^8 クローン)。該ファージディスプレイライブラリーは、具体的には N
10 NK (N はアデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G)、チミン (T) のいずれかの核酸塩基を示し、K はグアニン (G) 又はチミン (T) を示す。) が 15 回繰り返された配列を含む DNA が遺伝子工学的に挿入された繊維状ファージ f d であって、更に外殻タンパク質 p
15 III 遺伝子の N 末端部分に 15 残基のランダムなアミノ酸配列からなるペプチドをコードする DNA が挿入されてファージ外殻表面にランダムな 15 残基のアミノ酸配列を有するペプチドが発現できるように構築されている。

上記のファージディスプレイライブラリーは、スコットら (Scott, J.K. and Smith, G.P., Science, 249, 386-390 (1990)) により報告されている特徴を有している。
20

参考例 2 インフルエンザウイルス・ヘマグルチニンの固定化

インフルエンザウイルス・ヘマグルチニンをバイオパ
ニングのターゲットとして用いるために、次のようにし
5 て固定化した。

なお、固定化するヘマグルチニン（HA）として、A
型のH1亜型であるA/PR/8/34(H1N1)（以下、単にH1
若しくはH1N1とも称する。）のエーテル抽出物、及
びA型のH3亜型であるA/武漢/359/95(H3N2)（以下、
10 単にH3若しくはH3N2とも称する。）のエーテル抽
出物を用いた。

まず、96穴カルボプレート（SUMILON社製）の各ウェル
に、EDC（1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbo
diimide）およびN-ヒドロキシスクシイミドの等量混合
15 液60 μ lを添加して、プレートに結合したカルボキシル基
を活性化させた。10分後に該プレートのウェルを50mM
TBS緩衝液（pH7.6）で6回洗浄し、H1N1の溶液
（70 μ l/ml）またはH3N2溶液（70 μ l/ml）を100 μ l
添加した。2時間放置した後、50mM TBS緩衝液
20 （pH7.6）で6回洗浄し、1mMエタノールアミン水溶液
を100 μ l添加した。10分放置した後、再度50mM TBS
緩衝液（pH7.6）で6回洗浄し、プレートにインフルエン

ザ H A を固定化した（図 1 参照）。

実施例 1 インフルエンザ H A （H 1）結合性ペプチド
の選別及びその同定

- 5 (1) H A 結合性ペプチドディスプレイファージの選別
 (i) バイオパニングー第 1 回目ー

 H A 固定化プレートとして参考例 2 で調製した H A
 (H1N1) 固定化プレートを使用し、該プレートに参考例
 1 で調製したファージディスプレイライブラリー溶液
10 (6.2×10^{10} T U、T B S 緩衝液中) を $100 \mu\text{l}$ インジェ
 クトし、室温で 4 時間放置した。その後、 $200 \mu\text{l}$ の溶出
 用緩衝液 (50mM Tris-HCl、150mM NaCl) を用いて、よく
 ピペッティングしながら 5 回洗浄し、結合していない非
 特異ファージを除去した。次いで、各ウェルに 10m M の
15 シアル酸誘導体 7-F-Neu5Ac2en 溶液または 10m M のガング
 リオシド G M 3 溶液を $100 \mu\text{l}$ 添加し、室温で 1 時間放置
 した。

 なお、シアル酸誘導体 7-F-Neu5Ac2en は、ヘマグルチニ
 ン、特に H 1 N 1 へのシアル酸含有糖鎖の結合を阻害す
20 る能力を有する H A 阻害剤であり、またガングリオシド
 G M 3 は、ヘマグルチニンの受容体結合ポケットに対し
 て特異的結合性を有する特異的な H A 受容体物質である

ことが、本発明者らによって確認されている (T. Saito, et al., Chem. Lett., 145 (1999))。このため、ファージを結合させたプレートのウェルに、上記のように H A 阻害剤または H A 受容体物質を添加することにより、
5 インフルエンザウイルスのヘマグルチニン受容体結合ポケットに特異的に結合しているファージを溶出することができる。

かくして、H A 結合性ファージを溶出し、該ファージを含む溶液を回収した。

10 得られたファージ溶液に調製済み大腸菌 K91-Kan 溶液 100 μ l を加え、15 分間室温で感染させた。15 分後、あらかじめ 37°C で保温しておいた、0.2 μ g/ml テトラサイクリン (シグマ社製) (以下、T C という) を含む N Z Y 培地 20 ml にこの感染溶液を加えて、37°C で 40 分間振盪培養
15 した。

40 分後、T C のストック溶液 (20 mg/ml) 20 μ l を加え (終濃度 20 μ g/ml)、37°C で一晩振盪培養した。得られた培養液を 3,000 rpm で 10 分間遠心して大腸菌を除去した。上清を再度 12,000 rpm で 10 分間遠心して更に大腸菌を除去
20 した。上清に P E G / N a C l 溶液 3 ml (0.15 v/v) を加え、100 回穏やかに攪拌した後、4°C で 4 時間以上静置した。12,000 rpm で 10 分間遠心して上清を除去し、沈殿し

たファージペレットに1 ml TBSを加えて完全に溶解した。得られたファージ溶液を1.5 ml容 エッペンドルフチューブ (Epチューブ) に移し、15,000rpmで10分間遠心して不溶物を除去した。この中に再びPEG/NaCl 5 1 溶液を150 μ l加え、数回穏やかに攪拌した後、4 $^{\circ}$ Cで1時間以上静置した。15,000rpmで10分間遠心してペレットを回収し、0.02% NaN₃/TBS (200 μ l) に溶解した。15,000rpmで10分間遠心して、不溶物を除去し、上清のファージ溶液 (200 μ l) を0.6 ml 容Epチューブに移した。10 こうして得られたファージ溶液の半分を2回以降のパニングに、また2 μ lをtiteringに使用し、残りを保存した。

(ii) バイオパニングー第2回目ー

参考例2で作成したHA (H1N1) 固定化プレートに、15 増幅したファージディスプレイライブラリー溶液を100 μ l インジェクトし、室温で4時間放置した。その後200 μ lの溶出用緩衝液 (50mM Tris-HCl、150mM NaCl) を用いて、よくピペッティングしながら10回洗浄し、結合していない非特異ファージを除去した。次いで、各ウェルに20 10mM シアル酸誘導体7-F-Neu5Ac2en溶液または10mM GM3 溶液を100 μ l添加し、室温で1時間放置し、インフルエンザHAの結合ポケットに特異的に結合している

ファージを溶出し、その溶液を回収した。

(iii) バイオパニングー第3回目ー

HA (H1N1) 固定化プレートに、増幅したファージディスプレイライブラリー溶液を100 μ l インジェクトし、
5 室温で1時間放置した。その後200 μ lの溶出用緩衝液
(50mM Tris-HCl、300mM NaCl) を用いて、よくピペッティングしながら10回洗浄し、結合していない非特異ファージを除去した。次いで、各ウェルに10mM シアル酸誘
導体7-F-Neu5Ac2en溶液または10mM GM3溶液を100 μ
10 l添加し、室温で1時間放置し、インフルエンザHAの結合ポケットに特異的に結合しているファージを溶出し、
その溶液を回収した。

(iv) バイオパニングー第4回目ー

HA (H1N1) 固定化プレートに、増幅したファージディスプレイライブラリー溶液を100 μ lインジェクトし、
15 室温で1時間放置した。その後200 μ lの溶出用緩衝液
(50mM Tris-HCl、300mM NaCl) を用いて、よくピペッティングしながら10回洗浄し、結合していない非特異ファージを除去した。次いで、各ウェルに10 μ Mシアル酸誘
導体7-F-Neu5Ac2en溶液または10 μ M GM3溶液を100 μ
20 l添加し、室温で30分間放置し、インフルエンザHAの結合ポケットに弱く結合しているファージを溶出した。次

いで、各ウェルに10mMシアル酸誘導体7-F-Neu5Ac2en溶液または10mM GM3溶液を100 μ l添加し、室温で1時間放置し、HAの結合ポケットに特異的に結合しているファージを溶出し、その溶液を回収した。

5 (v) バイオパニングー第5～7回目ー

(iv) に記載の操作を繰り返して、第5回目、第6回目及び第7回目のバイオパニングを行った。

上記パニング操作（第1～7回目）によって得られた結果（ファージの回収率）を、溶出用物質（7-F-Neu5Ac
10 2en、GM3）の種類別に表1及び2に示す。

【表1】

<H1-7F> 固定化ウイルス：A/PR/8/34(H1N1)

溶出用物質：シアル酸誘導体7-F-Neu5Ac2en

15

パニング回数	使用ファージ量 (TU)	回収ファージ量 (TU)	ファージ回収率 (%)
1回目	6.2×10^{10}	7.7×10^7	0.12
2回目	2.6×10^{12}	1.1×10^7	0.0044
3回目	2.6×10^{13}	2.9×10^8	0.0011
4回目	8.7×10^{13}	8.7×10^8	0.0010
5回目	1.7×10^{13}	2.5×10^9	0.015
6回目	5.1×10^{11}	2.8×10^9	0.55
7回目	1.5×10^{12}	8.2×10^8	0.055

20

【表 2】

<H1-GM3> 固定化ウイルス：A/PR/8/34(H1N1)

溶出用物質：ガソリオリト GM3

パニング回数	使用ファージ量 (TU)	回収ファージ量 (TU)	ファージ回収率 (%)
1回目	6.2×10^{10}	8.8×10^7	0.14
2回目	1.8×10^{12}	1.8×10^7	0.0010
3回目	3.6×10^{12}	1.1×10^8	0.0030
4回目	5.7×10^{13}	2.1×10^9	0.0037
5回目	2.9×10^{13}	2.1×10^{10}	0.072
6回目	5.0×10^{11}	7.1×10^9	0.14
7回目	1.6×10^{12}	7.4×10^8	0.046

いずれの場合も、1回目から4回目にかけてのパニングは、サイクル毎にパニングの条件を厳しくしているため高い回収率の増加は認められなかったが、同一条件でパニングを繰り返した4回目から6回目にかけて、ファージの増加がみられた。これにより、インフルエンザウイルス・ヘマグルチニン(H1N1)に特異的に結合するペプチドを発現しているファージが回収されていることが確認された。

(2) HA結合性ペプチドのアミノ酸配列の決定

上記各パニングにおいて第6回目のパニング操作で得られたファージを用いて、発現しているペプチドのアミノ酸配列を決定した。具体的には、固定化ヘマグルチニンH1N1に結合し7-F-Neu5Ac2enで溶出されたファージ
5 (以下、H1/7ファージという：19クローン)、及び固定化ヘマグルチニンH1N1に結合しガングリオシドGM3で溶出されたファージ(以下、H1/3ファージという：20クローン)の2種類のファージについて、発現ペプチドのアミノ酸配列をシーケンスによって決定
10 した。

まず、6回目のパニングの後のタイター測定で得られたプレート上のコロニーをそれぞれ50コロニーずつ、無作為に拾い上げ、新しいNZYプレートに、植菌し直し、一晩37℃にて培養し、これをマスタープレートとして4
15 ℃で保存した。マスタープレートのコロニーを各々20mlのNZY培地(20 μ g/ml TC含有)の入った50ml遠心チューブに懸濁し、37℃で一晩200rpmで振盪培養した。ついで3,000rpm、10分間遠心分離を行った後、上清をオーク・リッジ遠心チューブに移し、12,000rpmで10分間遠心
20 分離し、大腸菌を除菌した。更に上清をオーク・リッジ遠心チューブに移し、3mlのポリエチレングリコール(PEG 6000：ナカライテスク社製)/NaClを加え、よ

く撹拌した後、4℃に4時間静置した。12,000rpmで10分
間遠心分離し、ファージを沈殿させた。ついで上清を除
去し、沈殿したファージを1mlのTBS（トリス緩衝塩
溶液）に懸濁させた。1.5mlのEqチューブに移し、15,00
5 0rpmで10分間遠心分離し、不溶性物質を除去後、上清を
別のEqチューブに移し、150μlのポリエチレングリコー
ル／NaClを加え、よく撹拌した後、4℃で1時間静置し
た。次いで15,000rpmで10分間遠心分離し、ファージを再
沈殿させた。ついで上清を除去し、沈殿したファージを
10 200μlのTBSで再度懸濁した。15,000rpmで10分間遠心
分離し、不溶性物質を沈殿させた後、該沈澱物を0.5mlの
Eqチューブに移し、ファージクロンを4℃で保存した。

上記で得られたファージクロンからのDNAの抽出
は、1.5mlのEqチューブにファージクロン100μlに対
15 してTBS 100μl及びTE飽和フェノール（ニッポジ
ン社製）200μlを加えて、10分間激しく撹拌後、15,000
rpmで10分間遠心分離した。次いで、上清（水相）200μ
lに対してTE飽和フェノール200μl及びクロロホルム2
00μlを加えて、前記と同様10分間激しく撹拌後、15,00
20 0rpmで10分間遠心分離した。更に、上清（水相）150μl
に対してTE 250μl、3M酢酸ナトリウム40μl、20mg/
ml グリコーゲン（ベーリンガー・マインハイム社製）1

- μ l及びエタノール 1 mlを加えて、1.5 mlのEqチューブにて -20°C で、一時間放置した後、15,000rpmで10分間遠心分離した。上清を取り除き、1 mlの80%エタノール (-20°C) を緩やかに加えて、15,000rpmで10分間遠心分離し残存する塩を除いた。上清を除去後、チューブ内の水分を蒸発させ、沈殿しているDNAを10 μ lの滅菌蒸留水に溶解し、 4°C にて保存した。かくして得られた個々のファージDNAをペプチドの配列決定のために使用した。
- 10 ファージDNAによりコードされるペプチドの配列決定は、ジデオキシ法 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 74, 5463-5467(1977)) により、アマシャム社のTHERMO配列キット (Amersham Life Science, Code; US79765, Lot番号; 201503) を用いて機器の使用説明書に従い実施した。
- 15 DNAの伸長反応は、 96°C 、30秒、 45°C 、15秒、 60°C 、4分を1サイクルとしてこれを30サイクル行い、DNAの配列決定は、ABI社製のDNAシーケンサー (ABI PRISMTM377) を用いて行った。

- このようにして2種類のファージ (H1 / 7ファージ、
20 及びH1 / 3ファージ) の各クローンから決定された、ヘマグルチニンの受容体結合ポケットに結合性を有するペプチドのアミノ酸配列を1文字表記として表3に示す。

なお、下記表記載の各アミノ酸配列を後記配列表に、配列番号 1 (No.1及び5)、2 (No.2)、3 (No.3)、4 (No.4)、5 (No.6) 及び 6 (No.7) としてそれぞれ記載する。

5 【表 3】

10

ファージ	No	クローン数／ 全クローン数	配 列	対応する 配列番号
H1/7	1	5 / 19	GYCSWFPAWSGCSAG	1
	2	1 / 19	QGWRA LLFRSPVNR	2
	3	1 / 19	GWRVYLSNLWDERRG	3
	4	1 / 19	SRLVG YCTRSPAVCR	4
H1/3	5	4 / 20	GYCSWFPAWSGCSAG	1
	6	2 / 20	FHCVSDGFFSSRCYR	5
	7	1 / 20	GYGSWFPA LSGCSTG	6

15 なお、各ファージにおいて表に記載しなかった残りのクローンは、いずれもランダムに配列が欠損しているか、もしくは配列解読が不能なものであった。

表からわかるように、ファージ H 1 / 7 並びにファージ H 1 / 3 はいずれも、複数のクローン間で共通のアミノ酸配列が見られた。さらに、各ファージ間で比べると、
20 ファージ H 1 / 7 とファージ H 1 / 3 間で共通の配列 (No. 1 と No. 5) が見られた。

なお、H A 受容体物質であるガングリオシド G M 3 は

ヘマグルチニン H 1 に対して高い親和性を有し、また H A 阻害剤である 7F-Neu5Ac2en はヘマグルチニン H 1 に対して高い阻害能を有することが知られている。

5 実施例 2 H A 結合性ペプチドのインフルエンザ・ヘマグルチニンへの結合性

実施例 1 で得られたファージをクローニングし、得られた発現ペプチドについて、ヘマグルチニンに対する結合性 E L I S A を用いて評価した。

- 10 具体的には、まずヘマグルチニン (H1N1) を 96 穴カルボプレート (SUMILON 社製) に、参考例 2 に記載する方法に従って固定化した。固定化後、プレートの各ウェルに 1 % B S A (Alubumine Bovine, Fatty Acid Free: Sigma 製) を含有する T B S を 100 μ l 添加し、室温で 1 時間
- 15 放置した。ここに増幅させたファージの溶液 (H 1 / 7 ファージ : クローン No. 1 ~ 4 、 H 1 / 3 ファージ : クローン No. 5 ~ 7) を 50 μ l 添加し、室温で 1 時間放置した。各ウェルを T B S T (T B S / 5 % Tween20) で 5 回洗浄後、T B S / 5 % B S A を 150 μ l 添加し、室温で 1 晩放
- 20 置した。

次いで、各ウェルに抗 -fd Bacteriophage 抗体 / T B S 溶液 (1/1000 希釈) を 150 μ l 添加し、室温で 1 晩放置し

た後、T B S T で 5 回 洗 浄 した。次いで、各ウェルに、
抗-Rabbit IgG Peroxidase Conjugate 抗体 / T B S 溶 液
(1/1000 希 釈) を 100 μ l 添 加 し、室 温 で 1 晩 放 置 した 後、
T B S T で 5 回 洗 浄 した。

5 各ウェルに、基質溶液 (0.4mg/ml o-phenyldiamine
substrate in citrate-phosphate buffer (pH 5.0)) を
100 μ l 添 加 し、10 分 間 反 応 さ せ た 後、3 N H₂ S O₄ を 10
0 μ l ず つ 加 え て 反 応 を 停 止 さ せ、マ イ ク ロ プ レ ー ト ・ リ
ー ダ ー で 492nm の 吸 収 を 測 定 した。

10 ヘマグルチニン (H1N1) を タ ー ゲ ッ ト と し て パ ニ ン グ
さ れ た H 1 フ ェ ー ジ (H 1 / 7 フ ェ ー ジ 及 び H 1 / 3 フ
ェ ー ジ) に つ い て、ヘ マ グ ル チ ニ ン H 1 に 対 す る 結 合 性
を 調 べ た 結 果 を 図 2 に 示 す。

図 2 から わ か る よ う に、H 1 / 7 フ ェ ー ジ の ク ロ ー ン
15 No.1 (図 2 に お い て ○ で 表 示、以 下 「H1-1」と 称 す
る。) 及 び H 1 / 3 フ ェ ー ジ の ク ロ ー ン No.6 (図 2 に お
い て △ で 表 示、以 下 「H1-2」と 称 す る。) が、ヘ マ グ ル
チ ニ ン H 1 に 対 し て 高 い 結 合 性 を 示 した。

こ れ は、本 発 明 に お い て ヘ マ グ ル チ ニ ン の 認 識 部 位
20 (受 容 体 結 合 ポ ケ ッ ト) に 対 し て 特 異 的 に 結 合 す る ペ プ
チ ド を 発 現 す る フ ェ ー ジ が 選 択 さ れ た こ と を 示 す。

実施例 3 2 種の亜型を認識する H A 結合性ペプチドの 選択

実施例 1 に従って、インフルエンザウイルス・ヘマグルチニン H 1 (H1N1、A/PR/8/34) 及び H 3 (H3N2、A/武漢/359/95) の 2 種類をターゲットとして、バイオパニングを行った。具体的には、H A 固定化プレートとして参考例 2 に従って調製した H 1 固定化プレート及び H 3 固定化プレートを用いて、また溶出用物質として H A 受容体物質であるシアリルLewisX 及び α (2 → 6) G M 3 を用いて、実施例 1 と同様にしてバイオパニングを行い、H A 結合性ペプチドを発現するファージを選択した。かかるバイオパニング選択によって得られた代表的なファージのクローンについて、その発現ペプチドのアミノ酸配列をシーケンスした結果を表 4 に示す。

【表 4】

ファージクローン	発現ペプチドのアミノ酸配列	対応する 配列番号
「A-1」	ARLSPTMVHPNGAQP	7
「B-1」	GRVPVFGLSPLFKVE	8
「B-2」	GRPPDSVFRSRGWLS	9
「C-1」	IDIAFSSLALADISR	10
「C-2」	EPYGFIAFSRAAHSP	11

クローン「A-1」は、下記の表5に示す全てのパニング系で選択されたファージクローンに認められた。

【表5】

パニング系	ターゲットHA	溶出用物質	クローンA-1数/ 全クローン数
H1/X	H1N1	アリルLewisX	2/10
H1/GM	H1N1	$\alpha(2\rightarrow6)$ GM3	2/9
H3/X	H3N2	アリルLewisX	2/10
H3/GM	H3N2	$\alpha(2\rightarrow6)$ GM3	9/10

クローン「B-1」は、パニング系「H1/GM」で選択された9クローンのうち2クローンに認められた。

クローン「B-2」は、パニング系「H3/X」で選択された10クローンのうち1クローンに認められた。

クローン「C-1」は、パニング系「H1/GM」で選択された9クローンのうち1クローン、及びパニング系「H3/GM」で選択された10クローンのうち1クローンに認められた。

クローン「C-2」は、パニング系「H1/GM」で選択された9クローンのうち1クローン、及びパニング系「H3/X」で選択された10クローンのうち4クロ

ーンに認められた。

上記で示すように、クローン「A-1」は、ターゲット及び溶出用物質を種々異にした全てのパニング系から選択された。溶出用物質を異にしたパニングでこのよう
5 に同一の配列を有するペプチドを発現するクローンが得られたことから、当該クローン「A-1」の発現ペプチドは、HA受容体物質であるシアリルLewisX及び α (2 $\rightarrow$ 6) GM3が有するヘマグルチニンに対する結合サイト (NeuAcが関与しているサイト) と同一の結合サ
10 イトを有し、これらの受容体物質と同じ結合様式をもったペプチドであると考えられる。

また、クローン「B-1」及び「B-2」の発現ペプチドは共通のモチーフとしてGRxP (xは、V又はPを意味する) を有しており、またクローン「C-1」及
15 び「C-2」の発現ペプチドは共通のモチーフとしてIAFSxyA (xはS又はRを、またyはL又はAをそれぞれ意味する) を有していた。

実施例 4 HA結合性ペプチドのインフルエンザ・ヘマ 20 グルチニンへの結合性

実施例 1 及び実施例 3 で得られたフェージクローン「H1-1」、「H1-2」、「A-1」、「B-1」、

「B-2」、「C-1」及び「C-2」について、ヘマグルチニン（H1、H3）に対する結合性を、実施例2に準じてELISAを用いて評価した。

- 具体的には、ヘマグルチニンH1（H1N1）及びH3（H3N2）、並びにレクチンの1種である小麦胚アグルチニン（WGA：Wheat Germ Agglutinin）をそれぞれ96穴カルボプレート（SUMILON社製）に固定し、これらに各ファージクローン溶液 5×10^{10} virions/mlを添加することによって、ELISAを行った。
- 10 結果を図3に示す。図3からわかるように、実施例1で得られたクローン「H1-1」及び「H1-2」はヘマグルチニンH3に殆ど結合せず、ヘマグルチニンH1に対して特異的な結合性を示すのに対して、実施例3で得られたクローン「A-1」、「B-1」、「B-2」、
- 15 「C-1」及び「C-2」はいずれもヘマグルチニンH1及びH3の両方に共通して結合するという結果が得られた。

ヘマグルチニンH1とH3はアミノ酸配列において75%相違することが知られている。このことから、クローン「A-1」、「B-1」、「B-2」、「C-1」及び「C-2」の各発現ペプチドは、ヘマグルチニンH1とH3の両者間で相同性の高い部位を認識して、そこ

20

に特異的に結合するものと考えられる。

実施例 5 HA結合性ペプチドの抗GM3抗体への結合性

実施例 1 及び実施例 3 で得られたファージクローン

5 「H 1 - 1」、「H 1 - 2」、「A - 1」、「B - 1」、
「B - 2」、「C - 1」及び「C - 2」について、抗 G
M 3 抗体に対する結合性を実施例 4 に準じて E L I S A
を用いて評価した。具体的には、E L I S A は、抗 G M
3 抗体 (M2590、日本バイオテスト研究所) を 96 穴カルボ
10 プレート (SUMILON 社製) に固定し、これらに各ファージ
クローン溶液 5×10^{10} virions/ml を添加することによって
行った。

結果を図 4 に示す。図 4 (a) 及び (b) からわかる
ように、実施例 1 で得られたクローン「H 1 - 1」及び
15 「H 1 - 2」は抗 G M 3 抗体に殆ど結合しないのに対し
て、実施例 3 で得られたクローン「A - 1」、「B -
1」、「B - 2」、「C - 1」及び「C - 2」はいずれ
も抗 G M 3 抗体に対して特異的に結合することが認めら
れた。

20 このことから、クローン「A - 1」、「B - 1」、
「B - 2」、「C - 1」及び「C - 2」の各発現ペプチ
ドは、G M 3 のシアル酸を含む構造を模倣する配列を有

することが示唆された。

実施例 6 ファージクローンによる、ガングリオシド G M 3 に対するヘマグルチニンの結合阻害

- 5 実施例 1 及び実施例 3 で得られたファージクローン
（「H 1 - 1」、「H 1 - 2」、「A - 1」、「B -
1」、「B - 2」、「C - 1」、「C - 2」）によって、
ガングリオシド G M 3 に対するヘマグルチニンの結合が
阻害されるかどうかを常法に従って実験することによっ
10 て調べた（「ガングリオシド研究法 I」鈴木康夫・安藤
進、編著、学会出版センター、1995年）。なお、ヘマゲ
ルチニンとして H 1（H1N1）及び H 3（H3N2）を用いた。

具体的には、96穴マイクロタイタープレート上に10 μ
l の G M 3 溶液（8.5 μ g/ml メタノール溶液）を加えた
15 後、50 μ l の 0.08% ポリイソブチルメタクリレート溶液
を加えた。溶媒をドライヤーで蒸散させ、50 μ l の 1% B
S A / T B S を添加して 4℃で一晩放置した。T B S で
プレートを 3 回洗浄した後、所定濃度のファージクロ
ン（表 6 参照）とヘマグルチニン（系内のヘマグルチニ
20 ン濃度が 30 n M となる濃度）溶液 50 μ l を添加して、20℃
で 2 時間放置した。T B S でプレートを 5 回洗浄した後、
プレートに結合しているヘマグルチニン量を抗体で検出

してその減少量より阻害活性を求めた。結果（ IC_{50} 値）を表 6 に示す。なお、表中の“nd”は“not detected”を意味する。

【表 6】

ファージ クローン	IC_{50}/nM (virions/ml)	
	H 1 N 1	H 3 N 2
A - 1	5.0 (3.0×10^{12})	17 (1.0×10^{13})
B - 1	nd	nd
B - 2	9.9 (6.0×10^{12})	11 (6.8×10^{12})
C - 1	77.0 (4.7×10^{13})	73 (4.4×10^{13})
C - 2	270.0 (1.6×10^{14})	nd
H 1 - 1	12.0 (7.5×10^{12})	nd
H 1 - 2	24.0 (1.4×10^{13})	nd

表 6 からわかるように、ファージクローン「A - 1」、「C - 1」及び「B - 2」について、その発現ペプチドがヘマグルチニン H 1 及び H 3 の両方の結合を阻害することを示す結果が得られた。この結果はこれらファージクローンが有するヘマグルチニンに対する結合特異性と相関していた。

実施例 7 脂質によるファージのヘマグルチニンに対する結合阻害

実施例 3 で得られたファージクロン（「A-1」、
「B-1」、「B-2」、「C-1」、「C-2」）に
ついて、該ファージクロンがヘマグルチニン（HA）
の宿主受容体認識部位を実際に認識していることを確認
5 するために、実施例 6 に準じて E L I S A を用いて、H
A 受容体物質である GM 3 によって固定化 HA に対する
上記ファージクロンの結合が阻害されるかどうかを調
べた。なお、ヘマグルチニンとして H 1 N 1 及び H 3 N
2 をそれぞれ用いた。また比較実験として GM 3 に代え
10 て GM 1 及び GlcCer を用いて同様に実験を行った。

GM 3 による阻害実験の結果を図 5 に、GM 1 による
阻害実験の結果を図 6 に示す。なお、各図とも、a) はヘ
マグルチニンとして H 1 N 1 を、b) は H 3 N 2 を用いた
結果を示す。

15 図 5 からわかるように、試験したいずれのファージク
ロンも、ヘマグルチニンに対する特異的なリガンド
（HA 受容体物質）である GM 3 を添加した時にその結
合が阻害されるという挙動が観察された。これに対して、
ヘマグルチニンに特異結合性をもたない GM 1 （図 6 ）
20 及び GlcCer （結果省略）を添加しても、ファージクロ
ンのヘマグルチニンへの結合は阻害されなかった。

これらのことから、上記ファージクロンの発現ペプ

チドは、インフルエンザウイルス・ヘマグルチニンの受容体認識部位に対して特異的に相互作用することによって、インフルエンザウイルスの宿主受容体への結合（感染）を特異的に阻害するように働くことが示唆された。

5

実施例 8 フェージ上に発現しているペプチドの合成

実施例 1 及び 3 でそれぞれ得られたフェージクローン上に発現しているペプチドを下記のようにして合成した。

なお、ペプチドの合成は、全自動ペプチド合成機（AC
10 T357、アドバンストケムテック社製）を使用し、同社のプログラムに従い、Fmoc/NMP, HOBt法〔Fmoc：9 - フルオレニルメトキシカルボニル、NMP：N - メチルピロリドン、HOBt：1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール〕による固相合成により実施した。

15 具体的には、合成を所望するペプチドのアミノ酸配列に従って、C末端アミノ酸に相当するFmoc - アミノ酸 - Alko樹脂0.25mmolに、C末端より2番目以降の各アミノ酸に相当するFmoc - アミノ酸を順次、合成プログラムに従い伸長反応させた。尚、C末端アミドのペプチドは、
20 Fmoc - NH-FAL樹脂0.25mmolにC末端アミノ酸に相当するFmoc - アミノ酸を合成プログラムに従い縮合反応させ、その後、C末端より2番目以降の各アミノ酸に相当する

Fmoc - アミノ酸を順次縮合反応させて鎖伸長を行つた。

各反応終了後、プログラムに従って、N末端Fmoc基の脱保護反応を行った。かくして得られた各ペプチド樹脂をポリプロピレン製のミニカラム（アシスト社製）に回収し、メタノール洗浄後、真空で乾燥し、以下の操作に付してペプチドを樹脂から切り出し、側鎖の脱保護反応を行った。即ち、各樹脂にリージェントK（Reagent K, 82.5% TFA, 5% フェノール, 5% H₂O, 5% チオアニソール（Thioanisole）, 2.5% エタンジチオール）2 ml を加え、ミニカラム中で60分間反応させた。次いで、反応液を冷ジエチルエーテル 8 ml 中に滴下して反応を停止させ、同時にペプチドを沈殿させた。更に、ミニカラムをTFA 2 ml にて洗浄し、冷ジエチルエーテル 5 ml を追加し、遠心し、沈殿をジエチルエーテル 10 ml で 4 回洗浄後、約 5 ml の 50% アセトニトリルでペプチドを可溶化し、凍結乾燥した。更に可溶化と凍結乾燥操作を 2 回繰り返して、所望の粗凍結乾燥品を得た。

これをオクタデシルカラム（直径 20×250 mm, WC 社製）を用いた逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により分画し、所望のペプチドを単離した。尚、上記において用いた樹脂およびアミノ酸誘導体は、いずれも渡辺化学工業社製のものである。

かくして単離された各ペプチドの同定を、アミノ酸配列分析およびマススペクトロメトリーによる分子量測定により行った。

尚、システイン残基を有する合成ペプチドは所望により環化することができる。具体的には、クローン「H 1 - 1」の発現ペプチドを例示すると、当該ペプチドは次のようにして環化された。

まず、ペプチド 5.0 m g (3.2 μ l) を 200 m M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) / T F E (4 / 1) 5 m l に溶解した (0.64 m M) 。反応系を水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH 8.5 に調整した後、酸素雰囲気下、室温で激しく攪拌し、S H 基を酸化して分子内ジスルフィド結合を形成させた。反応は H P L C により追跡し、約 30 時間後、10% 水酸化ナトリウム水溶液を加えて p H を 7 以上として反応を停止させた。生成物はシングルピークとして検出される。反応溶液を電気透析装置 (マイクロアシライザー G 1 , 旭化成工業 (株) 製) を用いて脱塩処理を行った後、凍結乾燥し、環状ペプチドの白色粉末を得た (収量 : 401 m g (2.6 μ m o l) 、収率 : 82%) 。

20

実施例 9 リポペプチド及びこれを用いたペプチド修飾
リポソーム

ペプチドのN末端にステアリン酸を結合することによって、本発明のHA結合性ペプチドをリポソーム上に導入することができる。一例として、実施例3で得られたクローン「A-1」の発現ペプチドについて説明する。

- 5 まず、上記実施例8に従って、クローン「A-1」の発現ペプチド配列（配列番号7）を順次伸長反応させた。次いでこのペプチドのN末端に、同合成プログラムに従って、ステアリン酸を伸長させた後、樹脂から切り出し、脱保護反応を行った。以下、実施例8に従って所望のステアリン酸化ペプチド（「C₁₈A-1リポペプチド」）を得た。

- このリポペプチド（Mw：1840.73）、卵黄レシチン（Mw：773、日本油脂NC-10S）及びコレステロール（Mw：386.66、Nakarai Chemicals, lot M8A9926）を、0.75：2：1（20%リポペプチド）、0.3：2：1（10%リポペプチド）又は0.16：2：1（5%リポペプチド）のモル比にて、30mlナス型フラスコ中に、クロロホルム／メタノール（3／1）溶液2mlに溶解した。溶媒をロータリーエバポレーターで減圧条件下に除去して一晩真空乾燥した。これにダルベッコ（Dulbecco）のリン酸緩衝塩溶液（Ca, Mg不含）（pH7.4）を5ml加え、バス型ソニケーターで30分処理してリポソーム（small unilam

ellar liposome)を得た。ベシクルを形成していない脂質は、遠心型限外濾過 ($1,500 \times g$ 、15分：分画分子量30,000、Amicon centriprep-50) にて除去した。

かくして得られたリポソームについて、内部に存在するペプチド含量を市販キット (Bio-Rad Protein Assay Kit) により測定し、上記で調製したリポペプチドがリポソームに組み込まれていることを確認した。

実施例 10 ペプチド修飾リポソーム

10 D D P E (dipalmitoyl L- α -phosphatidylethanol amine:シグマ社) 6.7mg、N H S - P E G - M a l (poly (ethylene glycol- α -N- β -maleimide hydroxysuccinim idyl propionate:日油リポソーム社) 45mg、トリエチル

15 アミン980 μ lをクロロホルム10mlに溶解し、室温で攪拌した、反応をT L Cで追跡し、ニンヒドリン反応が陰性であることを確認した後、溶媒を留去した。得られた白色粘稠体に蒸留水2 mlを加え、バス型超音波で処理し、ミセルを形成した。この溶液を2倍体積のセロファンチューブ (分画分子量12,000、サイズ:20/30、三光純薬

20 製)に入れ、透析膜の外の蒸留水1 Lを適宜交換して、3日間透析を行い、ミセルを形成していない副反応物を除去した。さらにゲルろ過 (Sephadex G50 Fine, Amers

ham Pharmacia Biotech AB) により、ボイド近傍のフラクションを回収し、凍結乾燥して、TLC上で単一バンドを示す白色粉末として目的のDPPE-PEG-Malを得た。

- 5 実施例9と同様にして調製したリポソーム（卵黄レシチン/コレステロール=2/1）とこのDPPE-PEG-Malを混合し、5, 10, 20及び100% DPPE-PEG-Mal含有リポソームを調製した。このリポソーム溶液に1N NaOH水溶液を加えてpHを約8とし、「A-
10 1」ペプチドのC端にH-Gly-Cys-OHを付加してなる本発明のペプチドを所定濃度となるように混合して、室温で6時間穏やかに攪拌し、実施例9と同様に遠心型限外濾過してリポソーム溶液とした。得られたリポソーム上に導入されたペプチド含量は実施例9と同様にして測定し
15 た。

以上のようにして、DPPE-PEG-Malのマレイミドを介してHA結合性ペプチドがシステインのSH基で結合してなるペプチド修飾体をリポソーム上に導入し、ペプチド修飾リポソームとした。

20

実施例11 ヘマグルチニンのGM3キャスト膜への結合の阻害評価

実施例 8 に記載する方法によって、クローン「A-1」の発現ペプチドを合成し、該合成ペプチドについて、その、ガングリオシド GM 3 に対するヘマグルチニンの結合の阻害活性を調べた。具体的には、固定化 HA (H 1 N 1、H 3 N 2) に対するガングリオシド GM 3 の結合を、上記合成ペプチドが阻害するかどうかを E L I S A を用いて実験した。なお、比較対照実験として、上記合成ペプチドに代えて、ファージのコートタンパク質 p III の N 端 15 残基ペプチド、及びシアリルラクトースを用いて同様に実験を行った。

結果を図 7 に示す。

この結果から、A-1 ペプチドはヘマグルチニンと GM 3 との結合を用量依存的に阻害することが明らかとなった。これに対して p III 蛋白由来のペプチドは阻害を示さなかった。このことから、A-1 ペプチドが配列特異的にヘマグルチニンと結合することにより、GM 3 との結合を阻害することが示された。なお、シアリルラクトースは GM 3 のシアリル酸部分と競合することにより、ヘマグルチニンと GM 3 との結合を阻害することが示唆された。

実施例 12 インフルエンザウイルス感染阻害活性の評価

本発明のH A結合性ペプチドについて、インフルエンザウイルス感染阻害活性を評価した。

インフルエンザウイルス感染細胞として、M D C K細胞（Mardin-Darby canine kidney）を用いた。当該細胞
5 へのインフルエンザウイルス感染の評価は、市販キット（LDH-Cytotoxic Test, Wako）を用いてL D H（lactate dehydrogenase）活性を検出することにより行った（J. Virol. Meth., 51, 185-192（1995））。またインフルエンザウイルスとして、A型のH 1（A/PR/8/34（H1N1））及びH 3（A/Victoria/395（H3N2））を用いた。
10

具体的には、インフルエンザウイルスの感染力価は次のようにして測定した。

即ち、M E M / 10 % F B S の培地で培養した 3×10^5 cell/mlのM D C K細胞を96穴マイクロタイタープレート
15 に100mlずつ蒔き、5 % C O₂雰囲気下、37℃で一晩インキュベートした。全てのウエルの細胞が単層飽和になっていることを確認した後、血清を含まないM E M（M E M（-））で2回洗浄し、これに系列希釈したウイルス溶液（M E M（-））を100 μ lずつインジェクトした。
20 これを5 % C O₂雰囲気下37℃で2時間インキュベートした後、ウイルス溶液を除き、培地で2回洗浄後、同培地で20時間インキュベートした。ウエル内の上清15 μ lをと

り、これをPBSで4倍希釈して50 μ lとし、これを新しいプレートに移し、各ウェルに発色液 (nitrobluetetrazolium, diaphorase and NDA+ in lithiumlactate PBS) を50ml添加した。室温で20分放置した後、反応停止液

5 (0.5M HCl in PBS) を100ml添加し、発色反応を停止させ、マイクロプレートリーダーを用いて550nmの吸光度を測定した。得られた結果からID₅₀値を求めた。

HA結合性ペプチドによるインフルエンザウイルス感染阻害実験は、上記で得られたID₅₀値の50倍濃度 (50
10 LDH ID₅₀) のウイルス量を用いて試験した。HA結合性ペプチドとして実施例9で得られた「C₁₈A-1リポペプチド」及びこれを10%含むリポソームを用いて行ったインフルエンザウイルスの感染阻害試験の結果を図8及び図9に示す。図8は「C₁₈A-1リポペプチド」を用いた結果
15 を、また図9は「C₁₈A-1リポペプチド」により修飾されたりリポソーム (10%ペプチド) を用いた結果を示す。尚、いずれの図も、a) はA型インフルエンザウイルスH1 (A/PR/8/34 (H1N1)) に対する感染阻害を、b) はH3 (A/Victoria/359 (H3N2)) に対する感染阻害をみた結
20 果である。

図8及び図9からわかるように、「C₁₈A-1リポペプチド」は、効果的にインフルエンザウイルスの細胞への感

染を阻害し、この効果は該ペプチドをペプチド修飾リボソームにすることにより増強された。これらのことから本発明のH A結合性ペプチドがインフルエンザ感染の予防若しくは治療剤として有用であることが示唆された。

5

産業上の利用可能性

本発明によれば、インフルエンザウイルスのヘマグルチニンに特異的結合性を有するペプチドが提供される。

- 10 本発明のペプチドは、インフルエンザウイルス感染の第1ステップに關与するヘマグルチニンに特異的に結合することにより、宿主受容体へのウイルスの結合を妨げることができ、これによりインフルエンザウイルス感染
- 15 予防剤として、またインフルエンザ治療剤としての応用が可能である。特に、本発明の好適なペプチドは、亜型間で三次構造がよく保存されているヘマグルチニンの受容体結合ポケットに特異的に結合する性質を有している。また比較的短いペプチドゆえに安定であり、その側鎖の多様性から、ヘマグルチニンの結合部位と相互作用する。
- 20 このことから、本発明のペプチドは亜型の種類に関わらず、多種の亜型間にまたがってインフルエンザウイルス全般、特にA型全般に有効な広域感染予防剤及び治療剤

としての応用が期待される。

さらに従来抗インフルエンザ剤として開発検討されている糖鎖アナログに比べ、本発明はペプチドであるがゆえに、大量合成並びに修飾が容易であり、薬剤の生産ならびにさらなる薬剤の開発という面においても有用である。

10

15

20

請求の範囲

1. 下記(a)または(b)のいずれかである、インフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチド:

5 (a) 配列番号 1 ~ 11 で示されるアミノ酸配列のいずれかを有するペプチド、

(b) 上記(a)に示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失若しくは付加により改変されたアミノ酸配列からなり、且つインフルエンザウイルス・ヘマグルチニンに結合性を有するペプチド。

2. 配列番号 1 または 6 で示されるアミノ酸配列を有するインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチド。

3. 配列番号 7 ~ 11 で示されるアミノ酸配列のいずれかを有するインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチド。

4. インフルエンザウイルスが A 型ウイルスである、請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載のインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチド。

5. インフルエンザウイルスが H 1 亜型である、請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載のインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチド。

5

6. インフルエンザウイルスが H 3 亜型である、請求項 1 又は 3 に記載のインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチド。

10

7. アルキル化又は脂質化されてなる請求項 1 に記載のインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチド。

15

8. 請求項 7 記載のインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチドを含有するリボソーム。

9. 請求項 1 に記載のインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチドを有効成分として含有するインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合阻害剤。

20

10. 請求項 7 に記載のインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチドを有効成分として含有するイン

フルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合阻害剤。

11. 請求項 8 に記載のリボソームを有効成分として含有
5 するインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合阻害
剤。

12. 配列番号 1 または 6 で示されるアミノ酸配列を有す
るインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプ
チドを有効成分として含有するインフルエンザウイルス
10 ・ヘマグルチニン結合阻害剤。

13. 配列番号 7 ～ 11 で示されるアミノ酸配列のいずれ
かを有するインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結
合性ペプチドを有効成分として含有するインフルエンザ
15 ウイルス・ヘマグルチニン結合阻害剤。

14. 請求項 1 に記載のインフルエンザウイルス・ヘマグル
チニン結合性ペプチドを有効成分として、薬学的に許
容される担体とともに含有する薬学的組成物。

20

15. 請求項 7 に記載のインフルエンザウイルス・ヘマグル
チニン結合性ペプチドを有効成分として、薬学的に許

容される担体とともに含有する薬学的組成物。

16. 請求項 8 に記載のリポソームを有効成分として、薬学的に許容される担体とともに含有する薬学的組成物。

5

17. 配列番号 1 または 6 で示されるアミノ酸配列を有するインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチドを有効成分として、薬学的に許容される担体とともに含有する薬学的組成物。

10

18. 配列番号 7 ～ 11 で示されるアミノ酸配列のいずれかを有するインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチドを有効成分として、薬学的に許容される担体とともに含有する薬学的組成物。

15

19. 対象とするインフルエンザウイルスが A 型ウイルスである請求項 14 記載の薬学的組成物。

20

20. 抗インフルエンザ剤として用いられる請求項 14 ～ 16 のいずれかに記載の薬学的組成物。

21. 請求項 1 に記載のインフルエンザウイルス・ヘマグ

ルチニン結合性ペプチドを有効量、被験者に投与することからなるインフルエンザの感染予防方法若しくはインフルエンザの治療方法。

5 22. 請求項7に記載のインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチドを有効量、被験者に投与することからなるインフルエンザの感染予防方法若しくはインフルエンザの治療方法。

10 23. 請求項8に記載のリポソームを有効量、被験者に投与することからなるインフルエンザの感染予防方法若しくはインフルエンザの治療方法。

24. 請求項14乃至16のいずれかに記載の薬学的組成物を
15 被験者に投与することからなるインフルエンザの感染予防方法若しくはインフルエンザの治療方法。

25. 請求項1に記載のインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチドの、抗インフルエンザ剤としての
20 使用。

26. 請求項7に記載のインフルエンザウイルス・ヘマグル

チニン結合性ペプチドの、抗インフルエンザ剤としての使用。

27. 請求項 8 に記載のリポソームの抗インフルエンザ剤
5 としての使用。

28. 請求項 1 に記載のインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチドの、抗インフルエンザ剤として用いられる薬学的組成物の製造のための使用。

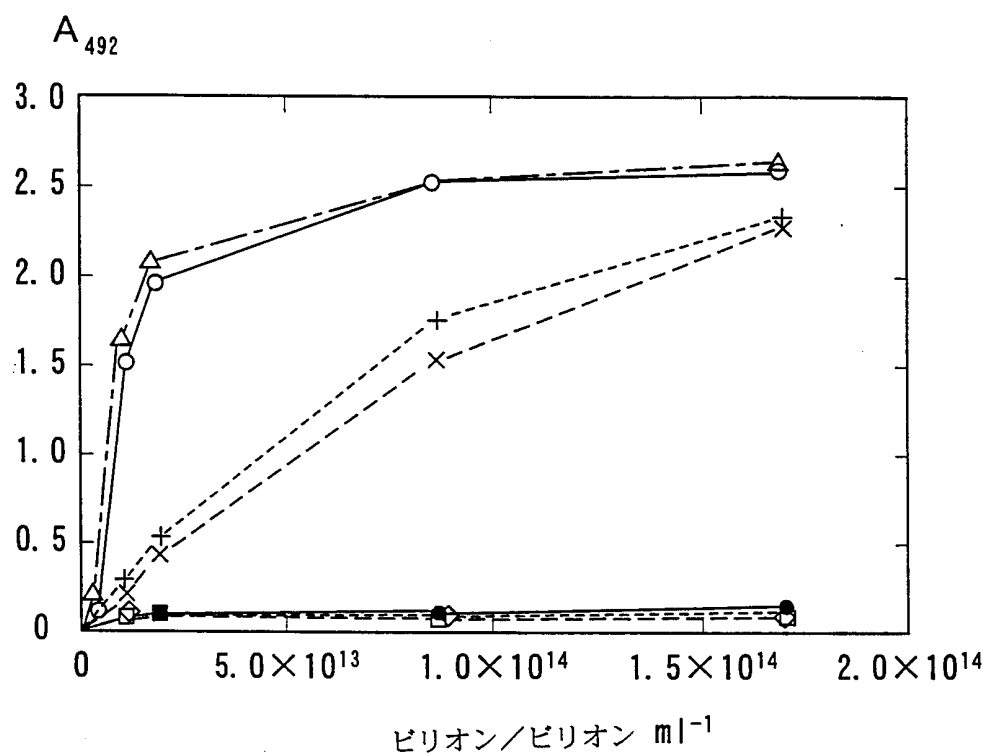
10

29. 請求項 7 に記載のインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン結合性ペプチドの、抗インフルエンザ剤として用いられる薬学的組成物の製造のための使用。

15 30. 請求項 8 に記載のリポソームの、抗インフルエンザ剤としての用いられる薬学的組成物の製造のための使用。

20

図2



- H1/7 (No. 1)
- × H1/7 (No. 2)
- H1/7 (No. 3)
- ◇ H1/7 (No. 4)
- △ H1/3 (No. 6)
- + H1/3 (No. 7)
- ランダム配列欠損 (ネガティブコントロール)

図 3

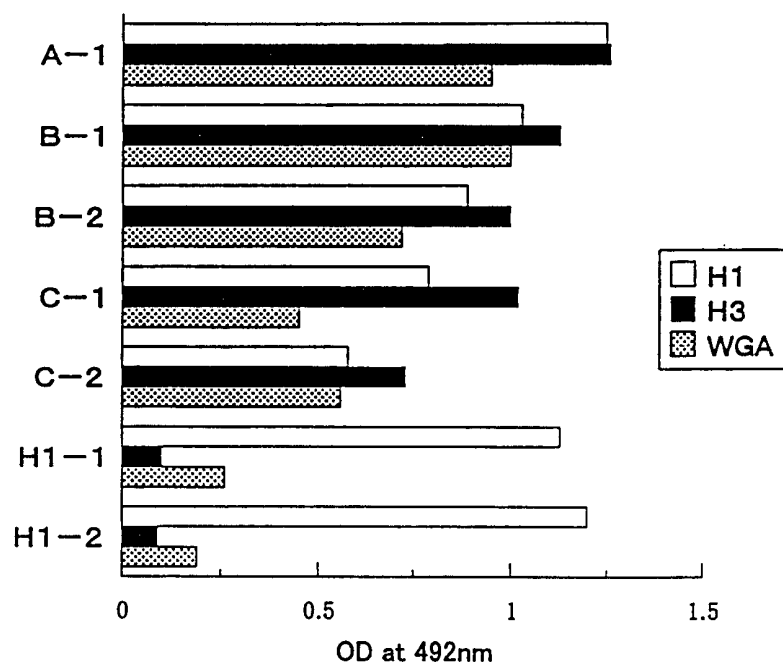


図 4

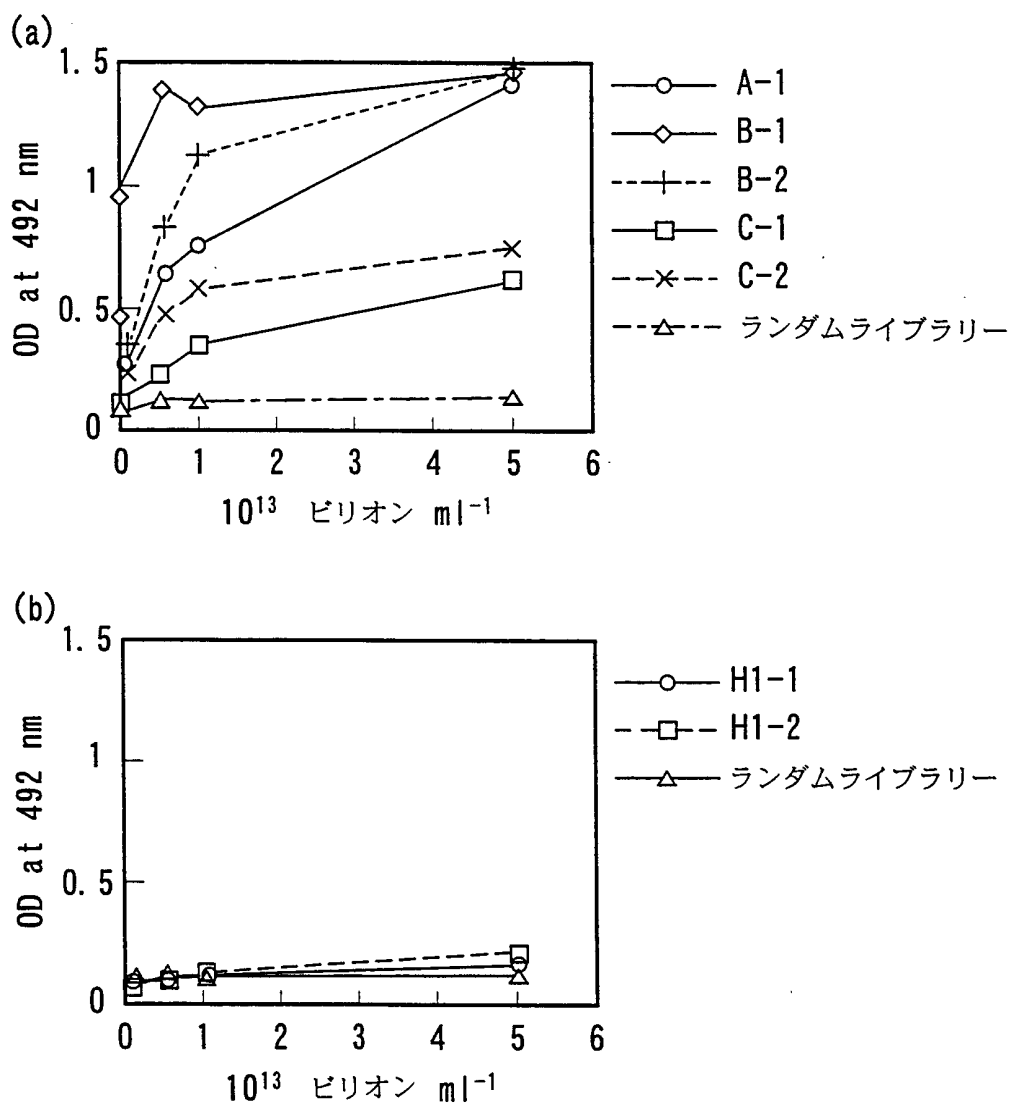
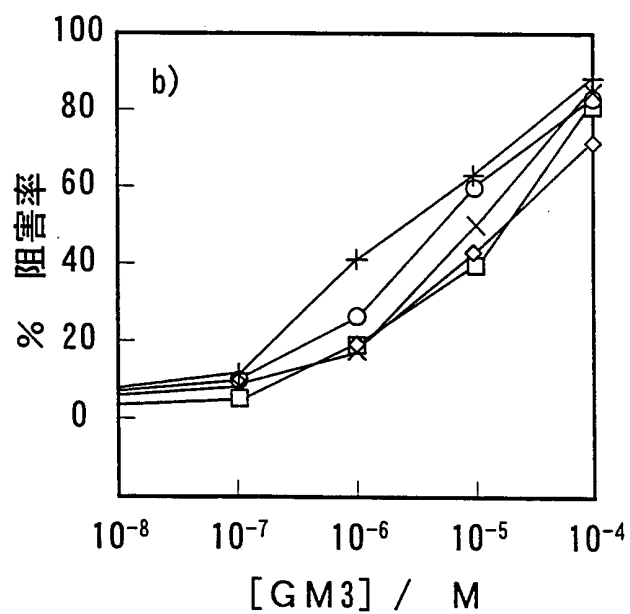
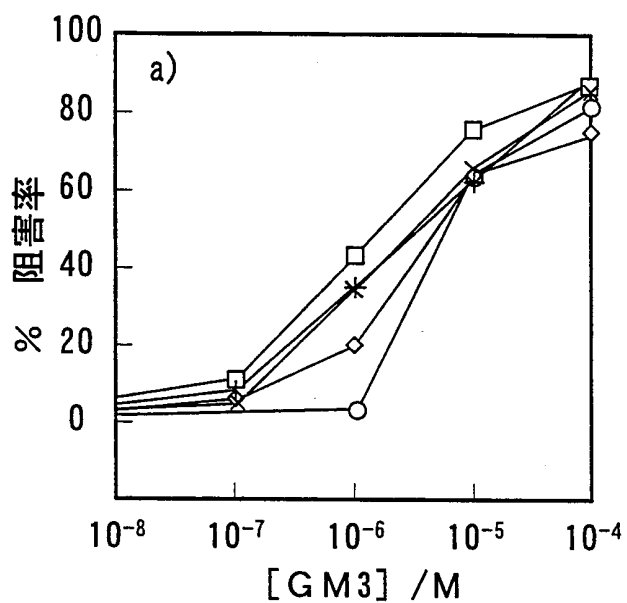


図5

HAに対するファージの結合のGM3による阻害

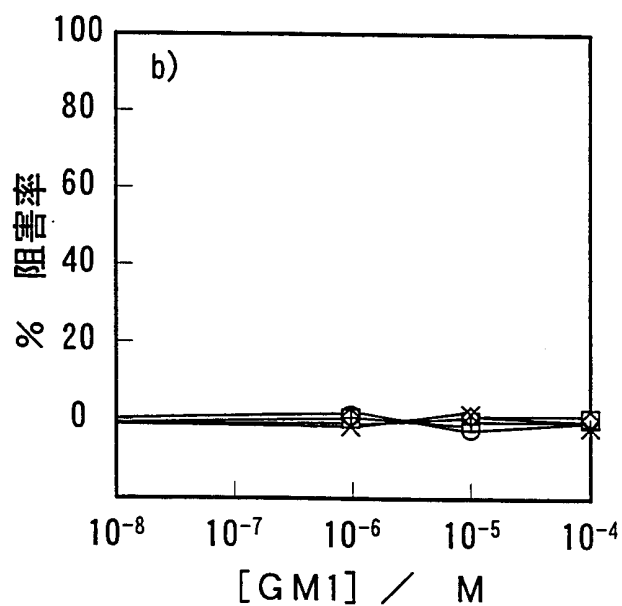
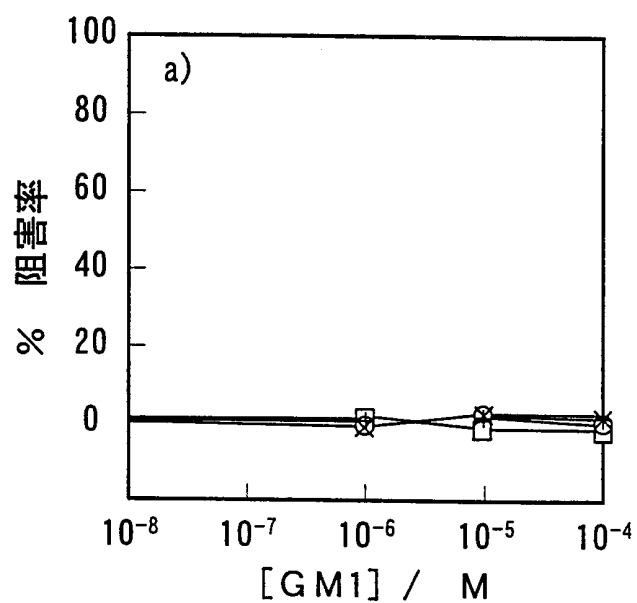


a) A/PR/8/34/H1/N1, b) A/武漢/359/95/H3/N2

—○— A-1 —□— B-1 —◇— B-2 —×— C-1 —+— C-2

図6

H A に対するファージの結合の G M 1 による阻害

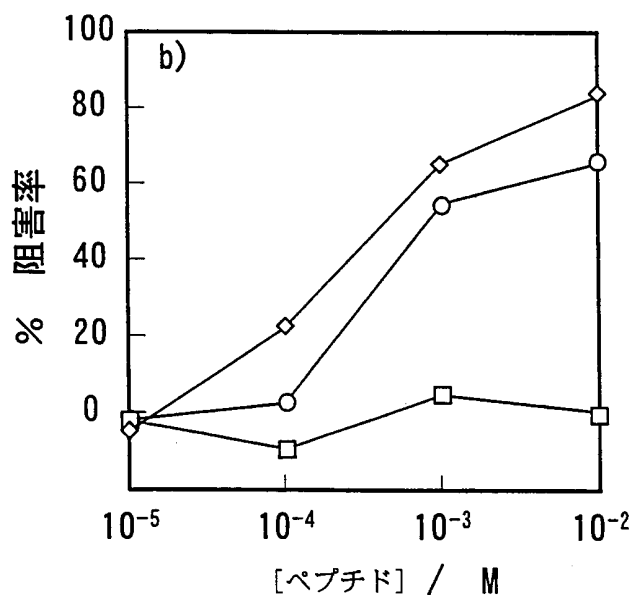
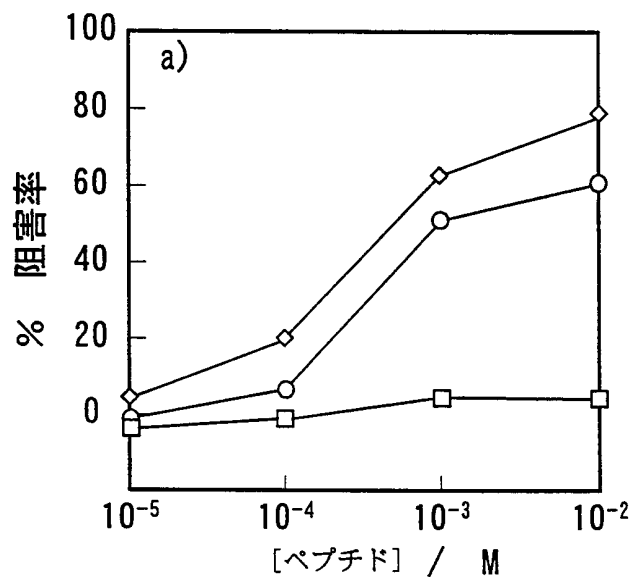


a) A/PR/8/34/H1/N1, b) A/武漢/359/95/H3/N2

—○— A-1 —□— B-1 —◇— B-2 —×— C-1 —+— C-2

図7

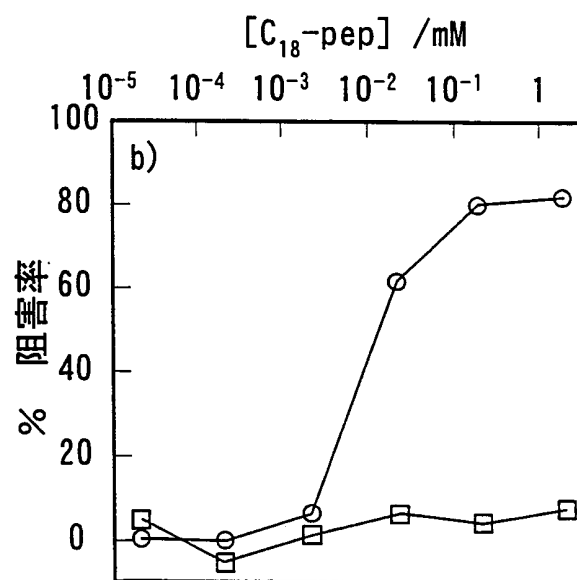
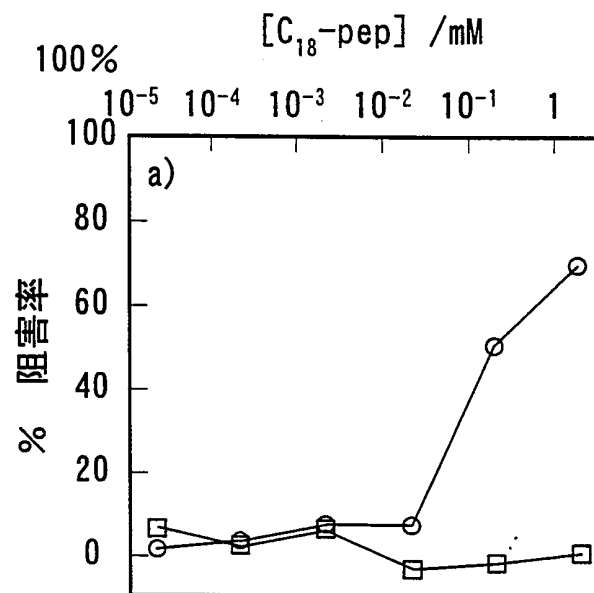
HAのGM3. キヤスト膜に対する結合のペプチドによる阻害



a) A/PR/8/34/H1/N1, b) A/武漢/359/95/H3/N2

—○— A-1 —□— p111 (コントロール) —◇— シアルラクトース (スタンダード)

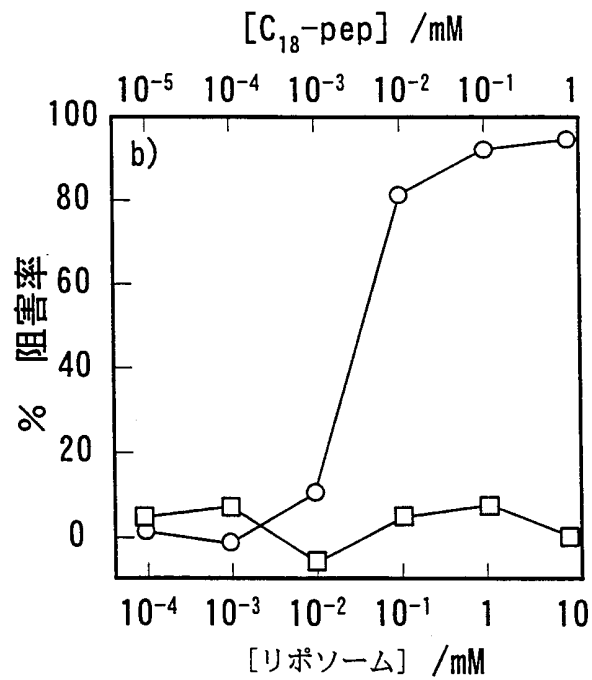
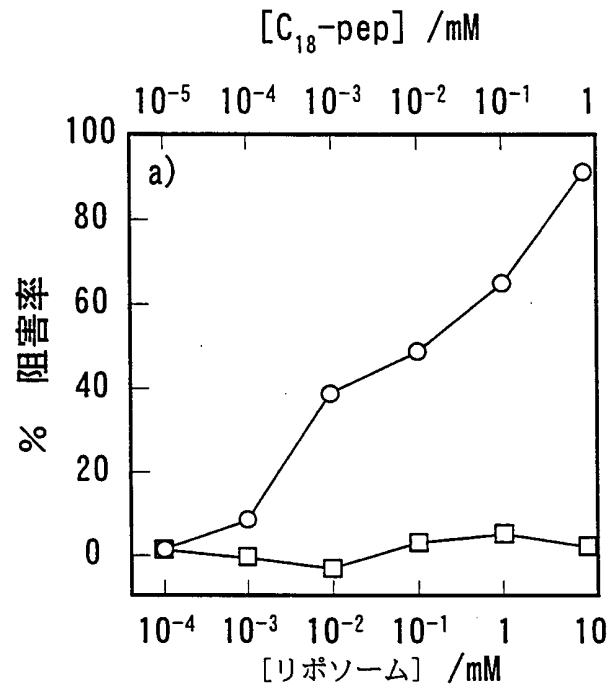
図 8



a) A/PR/8/34/H1/N1, b) A/Victoria/359/H3/N2

—○— A-1, リボペプチド —□— C₁₈pIII

図9



a) A/PR/8/34/H1/N1, b) A/Victoria/359/H3/N2

—○— A-1, リボペプチド —□— C₁₈pIII

SEQUENCE LISTING

<110> Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd.
<120> Affinity peptides to Hemagglutinin of Influenza
<130> P00-03
<140>
<141>
<150> JP H11-91962
<151> 1999-03-31
<160> 11
<170>

<210> 1
<211> 15
<212> PRT
<213> phage library
<220>
<400> 1
Gly Tyr Cys Ser Trp Phe Pro Ala Trp Ser Gly Cys Ser Ala Gly
1 5 10 15

<210> 2
<211> 14
<212> PRT
<213> phage library
<220>
<400> 2
Gln Gly Trp Arg Ala Leu Leu Phe Arg Ser Pro Val Asn Arg
1 5 10

<210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> phage library
<220>
<400> 3
Gly Trp Arg Val Tyr Leu Ser Asn Leu Trp Asp Glu Arg Arg Gly
1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> phage library

<220>

<400> 4

Ser Arg Leu Val Gly Tyr Cys Thr Arg Ser Pro Ala Val Cys Arg
1 5 10 15

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> phage library

<220>

<400> 5

Phe His Cys Val Ser Asp Gly Phe Phe Ser Ser Arg Cys Tyr Arg
1 5 10 15

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> phage library

<220>

<400> 6

Gly Tyr Gly Ser Trp Phe Pro Ala Leu Ser Gly Cys Ser Thr Gly
1 5 10 15

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> phage library

<220>

<400> 7

Ala Arg Leu Ser Pro Thr Met Val His Pro Asn Gly Ala Gln Pro
1 5 10 15

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> phage library

<220>

<400> 8

Gly Arg Val Pro Val Phe Gly Leu Ser Pro Leu Phe Lys Val Glu
1 5 10 15

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> phage library

<220>

<400> 9

Gly Arg Pro Pro Asp Ser Val Phe Arg Ser Arg Gly Trp Leu Ser
1 5 10 15

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> phage library

<220>

<400> 10

Ile Asp Ile Ala Phe Ser Ser Leu Ala Leu Ala Asp Ile Ser Arg
1 5 10 15

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> phage library

<220>

<400> 11

Glu Pro Tyr Gly Phe Ile Ala Phe Ser Arg Ala Ala His Ser Pro
1 5 10 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01867

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K 7/08, C07K 16/28, A61K 31/00, A61K 38/00

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)

Int.Cl⁷ C07K 7/08, C07K 16/28, A61K 31/00, A61K 38/00

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

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

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GeneSeq/DDBJ/GenBak

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 98/39469, A1 (BIO-TECHNOLOGY GENERAL CORP.), 11 September, 1998 (11.09.98), Claim 82 & EP, 975792, A1	1, 3-6
A	SUZUKI Y., et al., "Gangliosides as influenza virus receptors variation of influenza viruses and their recognition of the receptor sialo-sugar chains", Prog. Lipid. Res. (1994), Vol.33, No.4, pp.429-457	1-20, 28-30
A	ROY R., et al., "Solid-phase synthesis of dendritic sialoside inhibitors of influenza A virus haemagglutinin", J. Chem. Soc. Chem. Commun. (1993), No.24, pp.1869-1872	1-20, 28-30
A	MAMMEN M., et al., "Effective inhibitors of hemagglutination by influenza virus synthesized from polymers having active ester groups. Insight into mechanism of inhibition", J. Med. Chem. (1995), Vol.38, No.21, pp.4179-4190	1-20, 28-30
A	SATO T., et al., "Inhibition of 2,7-dideoxy-7-fluoro-2,3- didehydrosialic acid for binding of influenza virus H1	1-20, 28-30

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

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 24 May, 2000 (24.05.00)	Date of mailing of the international search report 06 June, 2000 (06.06.00)
--	--

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01867

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	hemagglutinin to GM3", Chmistry letters (Feb.1999), No.2, pp.145-146 SUZUKI Y., et al, "Viral infections and glycoconjugates", <i>Bessatsu Nikkei Science</i> , "Tousa to Saibou", No.11, pp.89-101	1-20,28-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01867

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 21-27
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The subject matter of claims 21-27 relates to a method for treatment of the human body by therapy, which does not require an international search report by this International Search Authority in accordance with PCT Article 17(2)(a)(i) Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/01867

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int.Cl ⁷ C07K 7/08, C07K16/28, A61K 31/00, A61K 38/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int.Cl ⁷ C07K 7/08, C07K16/28, A61K 31/00, A61K 38/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), GeneSeq/DDBJ/GenBak		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 98/39469, A1 (BIO-TECHNOLOGY GENERAL CORP.) 11.9月.1998 (11.09.98)、請求項 8 2 & EP, 975792, A1	1, 3-6
A	SUZUKI Y., et al. "Gangliosides as influenza virus receptors variation of influenza viruses and their recognition of the receptor sialo-sugar chains", Prog. Lipid. Res. (1994), Vol33, No. 4, p. 429-457	1-20, 28-30
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 24.05.00	国際調査報告の発送日 06.06.00	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 富永 みどり	4 N 9 1 5 2
	電話番号 03-3581-1101	内線 3448

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	ROY R., et al. "Solid-phase synthesis of dendritic sialoside inhibitors of influenza A virus haemagglutinin", J. Chem. Soc. Chem. Commun. (1993), No. 24, p. 1869-1872	1-20, 28-30
A	MAMMEN M., et al. "Effective inhibitors of hemagglutination by influenza virus synthesized from polymers having active ester groups. Insight into mechanism of inhibition", J. Med. Chem. (1995), Vol. 38, No. 21, p. 4179-4190	1-20, 28-30
A	SATO T., et al. "Inhibition of 2,7-dideoxy-7-fluoro-2,3-didehydrosialic acid for binding of influenza virus H1 hemagglutinin to GM3", Chemistry letters (Feb. 1999), No. 2, p. 145-146	1-20, 28-30
A	SUZUKI Y., et al. "Viral infections and glycoconjugates", 別冊日経サイエンス「糖鎖と細胞」 No. 11, p. 89-101	1-20, 28-30

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

- 次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみにについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。