(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7510181号
(P7510181)

(45)発行日　令和6年7月3日(2024.7.3)

(24)登録日　令和6年6月25日(2024.6.25)

(51)国際特許分類

		FI	
A61K	*47/54 (2017.01)*	A61K	47/54
A61K	*31/702 (2006.01)*	A61K	31/702
A61K	*47/40 (2006.01)*	A61K	47/40
A61P	*31/12 (2006.01)*	A61P	31/12
A61P	*31/16 (2006.01)*	A61P	31/16

請求項の数　17　（全41頁）

(21)出願番号　特願2021-510835(P2021-510835)
(86)(22)出願日　令和1年9月3日(2019.9.3)
(65)公表番号　特表2021-535150(P2021-535150A)
(43)公表日　令和3年12月16日(2021.12.16)
(86)国際出願番号　PCT/EP2019/073459
(87)国際公開番号　WO2020/048976
(87)国際公開日　令和2年3月12日(2020.3.12)
審査請求日　令和4年8月26日(2022.8.26)
(31)優先権主張番号　18192559.5
(32)優先日　平成30年9月4日(2018.9.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

(73)特許権者　512008613
エコール ポリテクニーク フェデラル デローザンヌ （イーピーエフエル）
スイス国，１０１５ ローザンヌ，イーピーエフエル イノベーション パークジェイ，イーピーエフエル－ティーティーオー
(74)代理人　100078282
弁理士　山本 秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下 夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田 貴敏
(74)代理人　100181641
弁理士　石川 大輔

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　殺ウイルス性ナノ粒子及びインフルエンザウイルスに対するその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

コアと、前記コアに共有結合された複数のリガンドとを含む殺ウイルス性ナノ粒子であって、前記リガンドの少なくとも一部分は三糖部分を含み、

前記コアはシクロデキストリンであり、

前記リガンドが同じであるか又は異なり、三糖部分を含む前記リガンドが疎水性であり、置換されていてもよいアルキルに基づくリガンドが少なくとも２個の炭素原子を有し、

各三糖部分は、３－シアリル－Ｎ－アセチルラクトースアミン（３’ＳＬＮ)、又は６－シアリル－Ｎ－アセチルラクトースアミン（６’ＳＬＮ)を含む、殺ウイルス性ナノ粒子。

【請求項２】

シクロデキストリンが、α－シクロデキストリン、β－シクロデキストリン、及びγ－シクロデキストリンを含む群から選択される請求項１に記載の殺ウイルス性ナノ粒子。

【請求項３】

前記リガンドが、置換されていてもよいＣ$_4$～Ｃ$_{30}$アルキルに基づくリガンドである請求項１又は請求項２に記載の殺ウイルス性ナノ粒子。

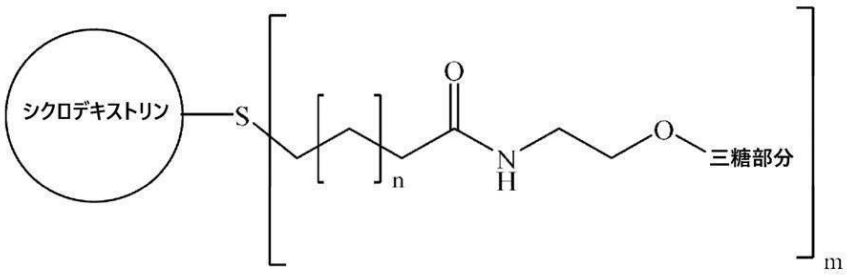
【請求項４】

前記リガンドが、置換されていてもよいＣ$_6$～Ｃ$_{15}$アルキルに基づくリガンドである請求項１から請求項３のいずれか１項に記載の殺ウイルス性ナノ粒子。

【請求項５】

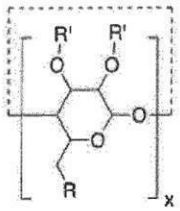
前記リガンドの一部又はすべてが３’ＳＬＮを含み、前記リガンドの一部又はすべてが６

’ＳＬＮを含み、前記リガンドのすべてではなく一部が三糖部分を含まない請求項１から請求項４のいずれか１項に記載の殺ウイルス性ナノ粒子。
【請求項６】
式（Ｉ）によって表される殺ウイルス性ナノ粒子であって、
【化１】



(I)

前記式（Ｉ）中、
ｍは２～８であり、
ｎは２～２８又は４～１３であり、
各三糖部分は、３－シアリル－Ｎ－アセチルラクトースアミン（３’ＳＬＮ）、又は６－シアリル－Ｎ－アセチルラクトースアミン（６’ＳＬＮ）を含む、殺ウイルス性ナノ粒子。
【請求項７】
シクロデキストリンが、α－シクロデキストリン、β－シクロデキストリン及びγ－シクロデキストリンを含む群から選択される請求項６に記載の殺ウイルス性ナノ粒子。
【請求項８】
ｍが３又は４である請求項６又は請求項７に記載の殺ウイルス性ナノ粒子。
【請求項９】
式（ＩＩ）によって表される殺ウイルス性ナノ粒子、又はその薬学的に許容できる塩である殺ウイルス性ナノ粒子であって、
【化２】



(II)

前記式（ＩＩ）中、
各Ｒは、独立に、少なくとも２個の炭素原子を有する、置換されていてもよいアルキルに基づくリガンドであり、前記リガンドのうちの少なくとも２つは、疎水性であり、３－シアリル－Ｎ－アセチルラクトースアミン（３’ＳＬＮ）及び６－シアリル－Ｎ－アセチルラクトースアミン（６’ＳＬＮ）を含む群から選択される三糖部分を有するか、又は前記リガンドのうちの少なくとも１つは３’ＳＬＮを有しかつ別のリガンドは６’ＳＬＮを有し、
各Ｒ’は、独立に、Ｈ、－（CH_2）$_y$－ＣＯＯＨ、－（CH_2）$_y$－SO_3^-、又はポリマーであり、
ｘは６、７又は８であり、
ｙは４～２０の整数である
殺ウイルス性ナノ粒子。
【請求項１０】
Ｒ’がＨである請求項９に記載の殺ウイルス性ナノ粒子。

【請求項１１】
前記アルキルに基づくリガンドが、置換されていてもよいＣ$_4$～Ｃ$_{30}$アルキルに基づくリガンドである請求項９又は請求項１０に記載の殺ウイルス性ナノ粒子。
【請求項１２】
前記少なくとも２つの疎水性であるアルキルに基づくリガンドが、６’ＳＬＮを含む置換されていてもよいＣ$_6$～Ｃ$_{15}$アルキルに基づくリガンドである請求項９から請求項１１のいずれか１項に記載の殺ウイルス性ナノ粒子。
【請求項１３】
有効量の１種以上の請求項１から請求項１２のいずれか１項に記載の殺ウイルス性ナノ粒子と、少なくとも１種の薬学的に許容できる賦形剤、担体及び／又は希釈剤とを含む医薬組成物。
【請求項１４】
インフルエンザウイルス感染症及び／若しくはインフルエンザウイルスと関連する疾患を治療並びに／又は予防することにおいて使用するための、請求項１から請求項１２のいずれか１項に記載の殺ウイルス性ナノ粒子。
【請求項１５】
有効量の１種以上の請求項１から請求項１２のいずれか１項に記載の殺ウイルス性ナノ粒子と、任意に少なくとも１種の好適なエアロゾル担体とを含む殺ウイルス性組成物。
【請求項１６】
請求項１３に記載の医薬組成物若しくは請求項１５に記載の殺ウイルス性組成物、若しくは請求項１から請求項１２のいずれか１項に記載の殺ウイルス性ナノ粒子を使用する工程を備える非生物の表面の消毒及び／又は殺菌の方法。
【請求項１７】
請求項１３に記載の医薬組成物、又は請求項１５に記載の殺ウイルス性組成物、又は１種以上の請求項１から請求項１２のいずれか１項に記載の殺ウイルス性ナノ粒子を含む装置であって、前記装置が、前記医薬組成物、前記殺ウイルス性組成物若しくは前記殺ウイルス性ナノ粒子を付与又は分注するための手段を含む、装置。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、三糖部分を含む殺ウイルス性ナノ粒子及びインフルエンザウイルスに対するその使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
インフルエンザウイルスは、最も感染力の強いウイルスの一つでである。毎年、様々なインフルエンザ株が動物の集団及び人間の集団ともにその大部分に感染し、乳幼児、高齢者、免疫力の低い人たちを危険にさらしており、これらの人々はすべてインフルエンザ関連の合併症による入院や死亡のリスクを抱えている。その結果、季節性インフルエンザは社会経済に大きな影響を与える。実際、呼吸器系疾患は、先進国や主に発展途上国の医療費総額のかなりの部分を占めている。インフルエンザは非常に急速に変異するため、ワクチンの開発はいまだに大きな課題となっている。毎年の流行ではなく時折発生するパンデミックに焦点を当てた場合、ワクチン開発はさらに大きな課題となる。このような場合、平均６ヶ月という新しいワクチンの開発期間は、深刻なリスクとなる。さらには、ワクチンがあったとしても、適切なワクチン接種率を達成することは、当然の結論とは言えない。それゆえ、スペイン風邪等の新たなパンデミックのリスクは依然として存在し、世界の健康に対する最大の脅威の１つとして認識されている。
【０００３】
当然のことながら、ワクチンに続く第２の防御策は、抗ウイルス薬である。現在、多くの抗インフルエンザ薬が承認されている。例えば、ザナミビルやオセルタミビル等のノイラミニダーゼ阻害剤、アマンタジン等のイオンチャネル阻害剤、ウミフェノビル等の融合

阻害剤（ロシアと中国のみ）、そして最近米国と日本で承認されたバロキサビル・マルボキシル等のポリメラーゼ阻害剤である。しかし、現在の薬剤の有効性は理想的なものとは程遠いことが認識されている。これらの薬剤には、重大な副作用から短期間の使用の後の薬剤耐性ウイルスの出現にわたる懸念がある。この問題の重要性に鑑み、他の多くの薬剤が臨床試験に入っている。これらの薬剤の大半は、ウイルスと宿主細胞の融合を阻害するモノクローナル抗体である。これらの薬剤は有望ではあるが、製造工程上、かなりのコストがかかることが予想される。

【０００４】

ウイルスの保存された部分を標的とした分子の開発については、かなり多くの研究ラインがある。さらに、毒性が限定された殺ウイルス性の（すなわち不可逆的な）薬剤の探索は非常に困難であり続けてきた。最近、カエルの皮膚から単離されたペプチドがそのような特性を持つことが見出されたが、そのＥＣ$_{50}$はマイクロモルに過ぎず、その毒性については議論の余地がある。

【０００５】

ウイルスのヘマグルチニン（ＨＡ）と宿主細胞上のシアル酸（ＳＡ）を持つ糖タンパク質との相互作用は、インフルエンザ感染の主要なステップである。ＳＡとＨＡの結合親和性は低く、多価の結合によって補われている。この自然現象にヒントを得て、ポリマー、デンドリマー、ナノ粒子等のＳＡをコーティングした多価材料を用いて、インフルエンザウイルスを阻害する試みがいくつかなされている。

【０００６】

Ｒｅｕｔｅｒらは、直鎖状ポリマー、　　状分岐ポリマー、デンドロン等の様々な構造のシアル酸修飾ポリマー材料を合成し、Ａ型インフルエンザウイルスの様々な株に対して試験を行った。高分子量（１００ｋＤａ超）の分岐した構造体のみが、マイクロモル濃度のシアル酸でインフルエンザウイルスの１株であるＸ－３１を阻害することが判明した。Ｐａｐｐらは、シアル酸で機能化した金ナノ粒子（ＮＰ）のインフルエンザウイルスＸ－３１株に対する阻害活性を調べ、コア径１４ｎｍのＮＰが２ｎｍのＮＰよりも優れた阻害活性を持つことを報告した。しかしながら、この研究では、Ｐａｐｐらはウイルスを阻害するためのＮＰの濃度については言及していない。同じグループは、シアル酸で修飾された様々なサイズの糖鎖構造も合成し、ミリモル濃度でＸ－３１株を阻害した。

【０００７】

ヒトインフルエンザウイルスは、糖タンパク質上のα２，６結合したＳＡと優先的に結合することが知られていた。より最近では、α２，６－シアリルラクトースを有する多価材料が、マイクロモルの低濃度でインフルエンザウイルスを阻害することが示された。Ｔａｎｇらは、α２，６－シアリルラクトースを有するブラシポリマーを合成した。このブラシポリマーは、シアル酸単位のマイクロモル濃度でインフルエンザＡ　ＰＲ８株を阻害した。Ｋｗｏｎらは、ＰＡＭＡＭデンドリマーをα２，６－シアリルラクトースで修飾し、インフルエンザＡ　ＰＲ８、ＣＡＬ　０９、ＮＷＳ　３３等の複数のインフルエンザ株を阻害した。

【０００８】

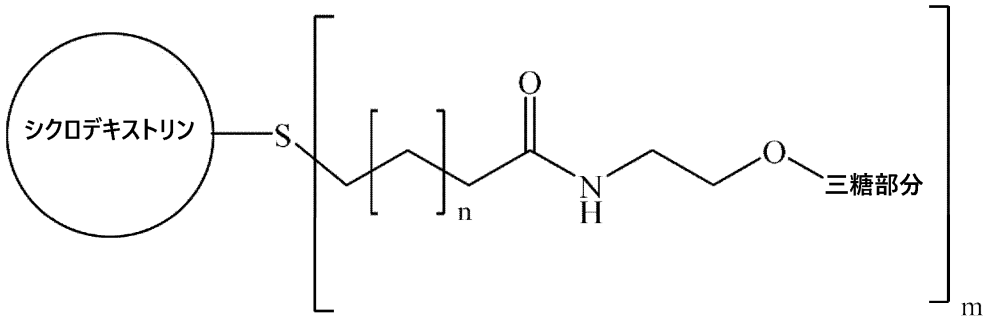
インフルエンザウイルスをインビトロで阻害するためのマイクロモルの物質濃度はまだ高すぎ、インビボでの濃度はさらに高くなる。また、侵入阻害剤の多くはウイルス増殖抑止性であり、インビトロでウイルスと物質の複合体を希釈すると、ウイルスは再び感染力を持つようになる。

【０００９】

広範囲で効果的なワクチンが存在しない現在、インフルエンザに対する治療薬を求めるニーズはまだ満たされていない。理想的な抗インフルエンザ薬は、広範囲に作用し、ウイルスの高度に保存された部分を標的とし、低濃度で、（体液中での希釈に起因する有効性の喪失を避けるために）不可逆的な効果、すなわち殺ウイルス性を有し、明らかに非毒性であることが必要である。

【先行技術文献】

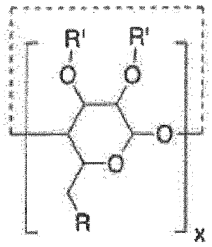
【非特許文献】
【００１０】
【文献】Ｒｅｕｔｅｒ，Ｊ．Ｄ．ら、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇ．Ｃｈｅｍ．　１０、２７１－２７８（１９９９）
【文献】Ｐａｐｐ，Ｉ．ら、Ｓｍａｌｌ　６、（２０１０）
【文献】Ｔａｎｇ，Ｓ．ら、ＡＣＳ　Ｍａｃｒｏ　Ｌｅｔｔ．　５、４１３－４１８（２０１６）
【文献】Ｋｗｏｎ，Ｓ．－Ｊ．ら、Ｎａｔ．Ｎａｎｏｔｅｃｈｎｏｌ．　１２、４８－５４（２０１７）
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１１】
この課題に対処するために、本発明は、ＨＡと強く相互作用し、インフルエンザウイルスの感染力を低濃度で不可逆的に阻害し、かつ極めて低い毒性を示すナノ粒子を提供する。
【課題を解決するための手段】
【００１２】
本発明の一態様は、コアと、このコアに共有結合された複数のリガンドとを含む殺ウイルス性ナノ粒子であって、上記リガンドの少なくとも一部分は三糖部分を含み、
上記コアはシクロデキストリンであり、
上記リガンドは、同じであるか又は異なり、置換されていてもよいアルキルに基づくリガンドであり、
各三糖部分は、３－シアリル－Ｎ－アセチルラクトースアミン（３’ＳＬＮ）及び６－シアリル－Ｎ－アセチルラクトースアミン（６’ＳＬＮ）から選択される殺ウイルス性ナノ粒子を提供する。
【００１３】
本発明の別の態様は、式（Ｉ）によって表される殺ウイルス性ナノ粒子であって、
【化１】



(I)

上記式（Ｉ）中、
ｍは２～８であり、
ｎは２～２８又は４～１３である
殺ウイルス性ナノ粒子を提供する。
【００１４】
本発明の別の態様は、式（ＩＩ）によって表される殺ウイルス性ナノ粒子又はその薬学的に許容できる塩である殺ウイルス性ナノ粒子であって、

【化２】



(II)

上記式（ＩＩ）中、
各Ｒは、独立に、置換されていてもよいアルキルに基づくリガンドであり、上記リガンドのうちの少なくとも２つは、３－シアリル－Ｎ－アセチルラクトースアミン（３’ＳＬＮ）及び６－シアリル－Ｎ－アセチルラクトースアミン（６’ＳＬＮ）を含む群から選択される三糖部分を有するか、又は上記リガンドのうちの少なくとも１つは３’ＳＬＮを有しかつ別のリガンドは６’ＳＬＮを有し、
各Ｒ’は、独立に、Ｈ、－（CH_2）$_y$－ＣＯＯＨ、－（CH_2）$_y$－SO_3^-、ポリマー又は水可溶化部分であり、
ｘは６、７又は８であり、
ｙは４～２０の整数である
殺ウイルス性ナノ粒子を提供する。

【００１５】
本発明のさらなる態様は、有効量の１種以上の本発明の殺ウイルス性ナノ粒子と、少なくとも１種の薬学的に許容できる賦形剤、担体及び／又は希釈剤とを含む医薬組成物を提供する。

【００１６】
本発明のさらなる態様は、インフルエンザウイルス感染症及び／若しくはインフルエンザウイルスと関連する疾患を治療並びに／又は予防することにおいて使用するための本発明の殺ウイルス性ナノ粒子を提供する。

【００１７】
本発明のさらなる態様は、有効量の１種以上の本発明の殺ウイルス性ナノ粒子と、任意に少なくとも１種の好適なエアロゾル担体とを含む殺ウイルス性組成物を提供する。

【００１８】
本発明のさらなる態様は、本発明の殺ウイルス性組成物、又は本発明の殺ウイルス性ナノ粒子を使用する工程を備える消毒及び／又は殺菌の方法を提供する。

【００１９】
本発明のさらなる態様は、本発明の殺ウイルス性組成物又は１種以上の本発明の殺ウイルス性ナノ粒子と、この殺ウイルス性組成物若しくは殺ウイルス性ナノ粒子を付与又は分注するための手段とを含む装置を提供する。

【００２０】
本発明のさらなる態様は、殺菌のため、及び／若しくは消毒のための、本発明の殺ウイルス性ナノ粒子又は本発明の殺ウイルス性組成物の使用を提供する。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

（項目１）

コアと、前記コアに共有結合された複数のリガンドとを含む殺ウイルス性ナノ粒子であって、前記リガンドの少なくとも一部分は三糖部分を含み、
前記コアはシクロデキストリンであり、
前記リガンドは、同じであるか又は異なり、置換されていてもよいアルキルに基づくリガンドであり、

各三糖部分は、３－シアリル－Ｎ－アセチルラクトースアミン（３’ＳＬＮ）及び６－シアリル－Ｎ－アセチルラクトースアミン（６’ＳＬＮ）から選択される殺ウイルス性ナノ粒子。

（項目２）

シクロデキストリンが、α－シクロデキストリン、β－シクロデキストリン、γ－シクロデキストリン又はこれらの組み合わせを含む群から選択される項目１に記載の殺ウイルス性ナノ粒子。

（項目３）

前記リガンドが、置換されていてもよいＣ$_{4}$～Ｃ$_{30}$アルキルに基づくリガンドである項目１又は項目２に記載の殺ウイルス性ナノ粒子。

（項目４）

前記リガンドが、置換されていてもよいＣ$_{6}$～Ｃ$_{15}$アルキルに基づくリガンド化合物である項目１から項目３のいずれか１項に記載の殺ウイルス性ナノ粒子。

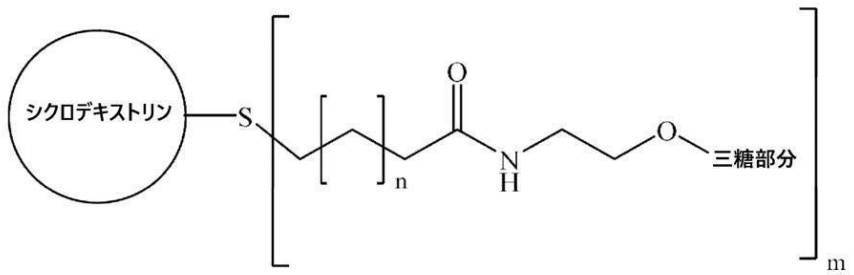
（項目５）

前記リガンドの一部又はすべてが３’ＳＬＮを含み、前記リガンドの一部又はすべてが６’ＳＬＮを含み、前記リガンドのすべてではなく一部が三糖部分を含まない項目１から項目４のいずれか１項に記載の殺ウイルス性ナノ粒子。

（項目６）

式（Ｉ）によって表される殺ウイルス性ナノ粒子であって、

【化１】



(I)

前記式（Ｉ）中、

ｍは２～８であり、

ｎは２～２８又は４～１３である

殺ウイルス性ナノ粒子。

（項目７）

シクロデキストリンが、α－シクロデキストリン、β－シクロデキストリン及びγ－シクロデキストリンを含む群から選択される項目６に記載の殺ウイルス性ナノ粒子。

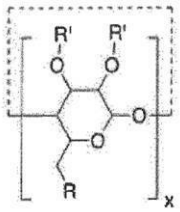
（項目８）

ｍが３又は４である項目６又は項目７に記載の殺ウイルス性ナノ粒子。

（項目９）

式（ＩＩ）によって表される殺ウイルス性ナノ粒子、又はその薬学的に許容できる塩である殺ウイルス性ナノ粒子であって、

【化２】



(II)

前記式（ＩＩ）中、
各Ｒは、独立に、置換されていてもよいアルキルに基づくリガンドであり、前記リガンドのうちの少なくとも２つは、３－シアリル－Ｎ－アセチルラクトースアミン（３’ＳＬＮ）及び６－シアリル－Ｎ－アセチルラクトースアミン（６’ＳＬＮ）を含む群から選択される三糖部分を有するか、又は前記リガンドのうちの少なくとも１つは３’ＳＬＮを有しかつ別のリガンドは６’ＳＬＮを有し、
各Ｒ’は、独立に、Ｈ、－（ＣＨ$_2$）$_y$－ＣＯＯＨ、－（ＣＨ$_2$）$_y$－ＳＯ$_3^-$、ポリマー又は水可溶化部分であり、
ｘは６、７又は８であり、
ｙは４～２０の整数である
殺ウイルス性ナノ粒子。
（項目１０）
Ｒ’がＨである項目９に記載の殺ウイルス性ナノ粒子。
（項目１１）
前記アルキルに基づくリガンドが、置換されていてもよいＣ$_4$～Ｃ$_{30}$アルキルに基づくリガンドである項目９又は項目１０に記載の殺ウイルス性ナノ粒子。
（項目１２）
前記アルキルに基づくリガンドが、６’ＳＬＮを含む置換されていてもよいＣ$_6$～Ｃ$_{15}$アルキルに基づくリガンドである項目９から項目１１のいずれか１項に記載の殺ウイルス性ナノ粒子。
（項目１３）
有効量の１種以上の項目１から項目１２のいずれか１項に記載の殺ウイルス性ナノ粒子と、少なくとも１種の薬学的に許容できる賦形剤、担体及び／又は希釈剤とを含む医薬組成物。
（項目１４）
インフルエンザウイルス感染症及び／若しくはインフルエンザウイルスと関連する疾患を治療並びに／又は予防することにおいて使用するための、項目１から項目１２のいずれか１項に記載の殺ウイルス性ナノ粒子。
（項目１５）
有効量の１種以上の項目１から項目１２のいずれか１項に記載の殺ウイルス性ナノ粒子と、任意に少なくとも１種の好適なエアロゾル担体とを含む殺ウイルス性組成物。
（項目１６）
項目１３若しくは項目１５に記載の殺ウイルス性組成物、若しくは項目１から項目１２のいずれか１項に記載の殺ウイルス性ナノ粒子を使用する工程を備える消毒及び／又は殺菌の方法。
（項目１７）
項目１３若しくは項目１５に記載の殺ウイルス性組成物、又は１種以上の項目１から項目１２のいずれか１項に記載の殺ウイルス性ナノ粒子と、前記殺ウイルス性組成物又は前記殺ウイルス性ナノ粒子を付与又は分注するための手段とを含む装置。
（項目１８）
殺菌のため、及び／若しくは消毒のための、項目１から項目１２のいずれか１項に記載

の殺ウイルス性ナノ粒子又は項目１３若しくは項目１５に記載の殺ウイルス性組成物の使用。

【図面の簡単な説明】

【００２１】

【図１】図１は、異なるリガンド組成を有するＮＰの化学構造を示す。ＮＰの平均直径：２．９±０．９ｎｍ。

【図２】図２は、Ｈ３Ｎ２ウイルスＶｉｃ／１１株のＴＥＭ画像を示す。ＮＰなしの場合（Ａ）、ＬＤ　６’ＳＬＮ　ＮＰと１時間インキュベートした後のウイルス（Ｂ）、ＰＥＧ（５）ＮＰとインキュベートした後のウイルス（Ｃ）。

【図３（１）】図３は、Ｃ１５－６’ＳＬＮ修飾β－ＣＤの化学構造を示す（Ａ）。異なるインフルエンザ株に対する修飾ＣＤのＥＣ$_{50}$濃度（Ｂ）、Ｎｅｔｈ／０９株に対する殺ウイルス活性（Ｃ）、ＭｕｃｉｌＡｉｒを用いたエキソビボ実験（Ｄ）。

【図３（２）】図３Ｅは、ＨＡの球状頭部と相互作用する修飾ＣＤの図を示す。

【図４（１）】図４は、例示的な修飾シクロデキストリンを示す。ＣＤβあたりの６’ＳＬＮ又は３’ＳＬＮの数は、^{1}Ｈ　ＮＭＲによって算出された平均数である。修飾シクロデキストリンの代表的な化学構造は、ＮＭＲの結果に基づいて構築した。ＥＣ$_{50}$は、Ａ／Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ／２００９（Ｈ１Ｎ１）に対する２４時間後（ｈｐｉ）のＭＤＣＫ細胞での半数阻害濃度を表す（図７）。Ｎ／Ａ：評価できない。これらの三次元構造の参照を容易にするために、後方のシクロデキストリン糖鎖、リガンド、三糖の一部は示されていない。

【図４（２）】図４の続きである。

【図５】図５は、図４に示された修飾シクロデキストリンの特徴を明らかにするために実施した^{1}Ｈ　ＮＭＲ研究を示す。β－シクロデキストリン１つあたりの６’ＳＬＮ又は３’ＳＬＮの平均数は、三糖由来の特徴的なピーク（◆）とβ－シクロデキストリンからのピーク（●）を比較することによって算出した。どちらのピークも１つの水素に対応している。

【図６】図６は、Ａ／Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ／２００９　Ｈ１Ｎ１に対するＣ６－６’（Ａ）、Ｃ１４－６’（Ｂ）、Ｃ１１－３’（Ｃ）及びＣ１－６’（Ｄ）の抗ウイルス活性を示す用量反応曲線を示す。結果は、二重に行った２回の独立した実験の平均値である。

【図７】図７は、Ｂ／Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ／２０１０（Ａ）、Ａ／Ｃｌｉｎｉｃａｌ／２０１８　Ｈ１Ｎ１（Ｂ）、Ａ／Ｓｉｎｇａｐｏｒｅ／２００４　Ｈ３Ｎ２（Ｃ）、及びＢ／Ｃｌｉｎｉｃａｌ／２０１８（Ｄ）に対するＣ１１－６’の抗ウイルス活性を示す用量反応曲線を示す。結果は、二重に行った２回の独立した実験の平均値である。

【図８】図８は、鳥類株Ａ／ｔｕｒｋｅｙ／Ｔｕｒｋｅｙ／２００５　Ｈ５Ｎ１（Ｃ１１－６’対照と一緒に）（Ａ）及びＡ／Ｔｕｒｋｅｙ／Ｉｔａｌｙ／９７７／１９９９　Ｈ７Ｎ１（Ｂ）に対するＣ１１－３’の抗ウイルス活性を示す用量反応曲線を示す。グラフＡの場合、ＦＡＣＳとＩＣＣの両方の方法で感染を定量化した。結果は、二重に行った２回の独立した実験の平均値である。

【図９】図９は、Ｃ１１－６’及びＰ８－６’のインビトロでの抗ウイルス活性比較を示す。パネル（ａ）と（ｂ）は、左のグラフに、Ａ／ＮＬ／０９に対する各化合物の阻害活性を、細胞生存率アッセイの結果と重ね合わせて示す。すべての化合物が非常に類似した挙動を示す。これらのパネルの右側のグラフには、殺ウイルス（すなわち希釈）試験の結果が示されている。なお、図の軸において、ｆｆｕはフォーカス形成単位を意味し、ＮＴは非処置を意味する。（ｃ）では、Ｃ１１－６’を以下のウイルス株に対して試験した。Ａ／Ｓｉｎｇａｐｏｒｅ／２００４（Ｈ３Ｎ２）、Ｂ／Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ／２０１０、及びＡ／Ｃｌｉｎｉｃａｌ／２０１８（Ｈ１Ｎ１）。結果は、二重に行った２回の独立した実験の平均値とＳＥＭである。

【図１０】図１０は、Ａ／Ｎｅｔｈｅｒｈａｎｄｓ／２００９（Ｈ１Ｎ１）に対するＣ１４－６’（Ａ）、Ｃ６－６’（Ｂ）及びＣ１１－３’（Ｃ）の殺ウイルス活性を示す。実験は、１００μｇ／ｍＬの化合物濃度を用いて行った。結果は、２回の独立した実験の平均とＳＥＭである。

【図１１】図１１は、Ｃ１１－６’及びＰ８－６’のエキソビボ阻害活性の比較を示す。Ｃ１１－６’は臨床的パンデミックであるＨ１Ｎ１　０９株に対して、共処理条件で完全な防御効果を発揮したのに対し、Ｐ８－６’は感染初期にわずかな防御効果しか発揮しなかった（ａ）。図１１（ｂ）では、感染後７日目（共処理条件）の免疫蛍光法により、Ｃ１１－６’による保護効果が確認された。赤：モノクローナル抗体インフルエンザＡ、青：ＤＡＰＩ、緑：β－ＩＶ－チューブリン（繊毛細胞のマーカー）。各組織の厚さは対応する画像の下部に示されている（ｂ）。また、Ｃ１１－６’は後処理の条件でも高い効果を示した（ｃ）。（ａ）及び（ｃ）の結果は、二重に行った２～４回の独立した実験の平均値及びＳＥＭである。（ｂ）の画像は、各条件で撮影した１０枚の画像の代表である。

【図１２】図１２は、感染した組織からのＬＤＨ放出を示す。組織は感染させられ、感染時にＣ１１－６’（５０μｇ）又はＰ８－６’で処理された。９６時間後及び２４時間後に行った頂部洗浄液（アピカル洗浄液）をＬＤＨ測定に供した。結果は、Ｈ１Ｎ１及びＨ１Ｎ１　Ｃ１１－６’については２回の独立した実験、Ｐ８－６’については二重に行った１回の実験の平均値及びＳＥＭである。

【図１３】図１３は、長時間の共処理実験を示す。組織は感染させられ、感染時にＣ１１－６’（５０μｇ）で処理された。最初の５日間は毎日の頂部洗浄液が採取され、続いて９日目、１７日目、２３日目にも洗浄液を採取して（その前日の洗浄液も採取）、日々のウイルス生成量を評価した。結果は、二重に行った１回の実験の平均値である。

【図１４】図１４は、エキソビボでの毒性を示す。組織は、毎日添加した異なる用量のＣ１１－６’又は同量の培地若しくはｔｒｉｔｏｎ　５％で処理した。処置後９６時間目に組織を、Ａ）ＭＴＴアッセイ、Ｂ）組織の生存率を評価するＬＤＨアッセイ、Ｃ）経上皮抵抗性評価、及びＤ）炎症促進性サイトカインの放出を評価するためのＥＬＩＳＡアッセイに供した。ＬＤＨとＥＬＩＳＡは採取した基礎培地で行った。実験は２回の独立した実験の平均及びＳＥＭである。

【図１５】図１５は、Ｃ１１－６’のインビボ抗ウイルス活性を示す。（ａ～ｃ）マウスは、Ａ／ＮＬ／０９の感染と同時に、及び感染後４８時間に、ＰＢＳ又はＣ１１－６’で鼻腔内処置された。感染後４８時間及び９６時間後にウイルス量が定量化され（ａ）、感染したマウスの罹患率（体温低下（ｂ）及び体重減少（ｃ））が毎日モニタリングされた。（ｄ～ｆ）感染後６時間後から３日間、毎日、マウスはＰＢＳ又はＣ１１－６’で鼻腔内処置された（１４μｇ／マウス）。感染したマウスの罹患率（ｄ～ｅ）と生存率（ｆ）が毎日モニタリングされた。結果は平均値±ＳＥＭで表されている。矢印は処置の時を示す。

【図１６】図１６は、β－シクロデキストリン、６’ＳＬＮ－β－エチルアミン、Ｃ１１－６’の^{1}Ｈ　ＮＭＲスペクトルを重ねて示す。

【図１７】図１７は、得られた化合物が結合していない三糖を含まないことを明らかにする、Ｃ１１－６’のＤＯＳＹスペクトルを示す。

【図１８】図１８は、ＦＡＣＳで行われたゲーティング戦略を示す。

【発明を実施するための形態】

【００２２】

本明細書で言及されているすべての刊行物、特許出願、特許、及びその他の参考文献は、参照によりその全体が組み込まれる。本明細書で論じられる刊行物及び出願は、本願の出願日より前に開示されていることのみを目的として提供されている。本明細書のいかなる部分も、本発明が先行発明のおかげでそのような公開に先立つ権利を有していないことを認めるものとは解釈されない。加えて、材料、方法及び例は例示に過ぎず、限定することを意図したものではない。

【００２３】

矛盾する場合、定義を含め、本明細書が優先する。特段の定義がない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本明細書の主題が属する技術分野の当業者が一般的に理解しているものと同じ意味を有する。本明細書で使用される以下の定義は、本発明の理解を容易にするために提供されるものである。

【００２４】

用語「ｃｏｍｐｒｉｓｅ」は、一般的に「ｉｎｃｌｕｄｅ（含む）」という意味で使用され、つまり、１つ以上の特徴又は構成要素の存在を許可する。加えて、本明細書及び特許請求の範囲で使用される場合、「ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ」という言葉は、「ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｏｆ（…からなる）」及び／又は「ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ（…から実質的になる）」の用語で記述された類似の実施形態を含むことができる。

【００２５】

本明細書及び特許請求の範囲で使用される場合、本明細書で「Ａ及び／又はＢ」等のフレーズで使用される用語「及び／又は」は、「Ａ及びＢ」、「Ａ又はＢ」、「Ａ」、及び「Ｂ」を含むことが意図されている。

【００２６】

本明細書及び特許請求の範囲で使用される場合、単数形の「ａ」、「ａｎ」及び「ｔｈｅ」は、文脈と明らかに矛盾する場合を除いて、複数の指示対象を含む。

【００２７】

本明細書及び特許請求の範囲で使用される場合、「少なくとも１つのＣ原子」等のフレーズで使用される「少なくとも１つ」という用語は、「１つのＣ原子」又は「２つのＣ原子」又はそれ以上のＣ原子を意味することができる。

【００２８】

本明細書で使用する場合、「ウイルス増殖抑止性」という用語は、抗ウイルス組成物との相互作用後にウイルスの感染性が可逆的に阻害されることを示す、インビトロ試験によって決定される抗ウイルス効果の特徴を指す。この相互作用は、例えば、ウイルスに結合すること、又は別の態様でウイルスの表面リガンドに干渉することにより、感染性を阻害する。しかしながら、（例えば希釈により）相互作用が終了すると、ウイルスの再構成を促進する材料又は条件が加えられていない場合には、ウイルスが感染力を回復する可能性がある。

【００２９】

本明細書で使用する場合、「殺ウイルス性」という用語は、抗ウイルス性の化合物又は組成物との相互作用後にウイルスの感染性が不可逆的に阻害されることを示す、インビトロ試験によって決定される抗ウイルス効果の特徴を指す。この相互作用は、例えば、ウイルスに結合すること、又は別の態様でウイルスの表面リガンドに干渉することにより、感染性を阻害する。しかしながら、（例えば希釈により）相互作用が終了した後であっても、ウイルスの再構成を促進する材料又は条件が加えられていない場合には、ウイルスが感染力を回復することは本質的に不可能である。

【００３０】

本明細書で使用する場合、「生体適合性」という用語は、生きている細胞、組織、臓器、又は系との適合性であり、損傷、毒性、又は免疫系による拒絶の重大なリスクがないことを指す。

【００３１】

本明細書で使用する場合、「ナノ粒子」で用いられるような「ナノ」は、ナノメートルサイズを有する粒子等、ナノメートルサイズを指し、特定の形状の限定を伝えることを意図していない。特に、「ナノ粒子」には、ナノスフェア、ナノチューブ、ナノボックス、ナノクラスター、ナノロッドなどが包含される。特定の実施形態では、本明細書で企図されているナノ粒子及び／又はナノ粒子コアは、概して多面体又は球形の幾何学的形状を有する。

【００３２】

本明細書で使用する場合、「インフルエンザ」は、シアル酸を求めて空気中を伝搬する（ヒト又は動物の）ＲＮＡウイルス、例えばＡ型インフルエンザウイルス、Ｂ型インフルエンザウイルス、Ｃ型インフルエンザウイルス、Ｄ型インフルエンザウイルスを指す。Ａ型インフルエンザウイルスには、以下の血清型が包含される：Ｈ１Ｎ１、Ｈ２Ｎ２、Ｈ３Ｎ２、Ｈ５Ｎ１、Ｈ７Ｎ７、Ｈ１Ｎ２、Ｈ９Ｎ２、Ｈ７Ｎ２、Ｈ７Ｎ３、Ｈ１０Ｎ７、Ｈ

７Ｎ９、及びＨ６Ｎ１。
【００３３】
本明細書で使用する場合、用語「アルキル」は、１～５０個の炭素原子、好ましくは４～３０個の炭素原子を含む直鎖状の炭化水素鎖を指す。アルキルの代表例としては、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル等が挙げられるが、これらに限定されない。
【００３４】
本明細書で使用する場合、「カルボキシアルキル」という用語は、本明細書で定義されたアルキル基を介して親分子部分に付加されたカルボキシ基を指す。
【００３５】
α２，６結合シアル酸は、ヒトインフルエンザウイルスと相互作用することが知られているが、高親和性の結合をもたらす正確な糖鎖配列は、文献上不明であった。本発明者らは、大多数のヒトインフルエンザウイルスが、２つ以上の、好ましくは３つ又は４つの三糖部分で終わる糖鎖、具体的には６－シアリル－Ｎ－アセチルラクトースアミン（６’ＳＬＮ）又は３－シアリル－Ｎ－アセチルラクトースアミン（３’ＳＬＮ）に高親和性で結合することを明らかにした。
【００３６】
本発明の一態様は、コアと、このコアに共有結合された複数のリガンドとを含む殺ウイルス性ナノ粒子であって、このリガンドの少なくとも一部分は三糖部分を含み、
上記コアは、金属ナノ粒子又は有機材料であり、好ましくは、この金属ナノ粒子は、金ナノ粒子、酸化鉄ナノ粒子、銀ナノ粒子、白金ナノ粒子、コバルトナノ粒子、亜鉛ナノ粒子、シリカナノ粒子、セレン化カドミウムナノ粒子、金銀合金ナノ粒子、酸化アルミニウムナノ粒子、酸化銅ナノ粒子、酸化マグネシウムナノ粒子、酸化ニッケルナノ粒子、二酸化チタンナノ粒子、酸化亜鉛ナノ粒子を含む群から選択され、より好ましくは、この金属ナノ粒子は、金ナノ粒子であり、上記有機材料は、シクロデキストリン、ポリマー、デンドリマー、及びデンドロンを含む群から選択され、好ましくはこの有機材料はシクロデキストリンであり、
上記リガンドは、同じであるか又は異なり、置換されていてもよいアルキルに基づくリガンド又はポリエチレングリコール（ＰＥＧ）に基づくリガンドであり、好ましくは、この置換されていてもよいアルキルに基づくリガンドは、置換されていてもよいＣ$_4$～Ｃ$_{30}$アルキルに基づくリガンドであり、より好ましくは、この置換されていてもよいアルキルに基づくリガンドは、置換されていてもよいＣ$_4$～Ｃ$_{30}$カルボキシアルキルであり、好ましくは、ＰＥＧに基づくリガンドは、ＰＥＧ$_3$、ＰＥＧ$_4$、ＰＥＧ$_5$、ＰＥＧ$_6$、ＰＥＧ$_7$、ＰＥＧ$_8$を含む群から選択され、より好ましくは、このリガンドは、ポリエチレングリコール５（ＰＥＧ$_5$）、１６－メルカプトヘキサデコン酸（Ｃ１５）、及び１１－メルカプトウンデカン酸を含む基から誘導され、
上記三糖部分は、３－シアリル－Ｎ－アセチルラクトースアミン（３’ＳＬＮ）及び／又は６－シアリル－Ｎ－アセチルラクトースアミン（６’ＳＬＮ）である
殺ウイルス性ナノ粒子を提供する。
【００３７】
本発明に関しては、三糖部分は、他のリガンドが三糖部分とインフルエンザウイルスとの間の相互作用を妨げないような方法で、ナノ粒子（ＮＰ）の外側表面に共有結合されたリガンド上に露出している。
【００３８】
上記コアの平均直径は、約１．０ｎｍ～約２００ｎｍ、好ましくは１ｎｍ～５ｎｍ、最も好ましくは１．５ｎｍ～３ｎｍの範囲である。全体のナノ粒子サイズは、平均粒子径が３ｎｍ～２５０ｎｍ、又は３ｎｍ～２００ｎｍ、好ましくは３ｎｍ～１０ｎｍ、より好ましくは４．５ｎｍ～６ｎｍである。
【００３９】
いくつかの実施形態では、本発明の殺ウイルス性ナノ粒子におけるコアは、有機材料、

好ましくはポリマーであり、ポリマーは、ポリアクリル酸（ＰＡＡ）、ポリビニルアルコール（ＰＶＡ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリ乳酸（ＰＬＡ）、ポリグリコリド（ＰＧＡ）、ポリジオキサノン（ＰＤＯ）、及びポリ（乳酸－ｃｏ－グリコール酸）を含む群から選択される。

【００４０】

いくつかの実施形態では、本発明の殺ウイルス性ナノ粒子におけるコアは、有機材料であり、好ましくは、ポリ（アミドアミン）（ＰＡＭＡＭ）及びビス－ＭＰＡを含む群から選択されるデンドリマーである。

【００４１】

いくつかの実施形態では、本発明の殺ウイルス性ナノ粒子におけるコアは、有機材料であり、好ましくは、ポリ（アミドアミン）（ＰＡＭＡＭ）及びビス－ＭＰＡを含む群から選択されるデンドロンである。

【００４２】

好ましい実施形態では、本発明の殺ウイルス性ナノ粒子におけるコアは、シクロデキストリンである有機材料である。

【００４３】

シクロデキストリン（ＣＤ）は、α（１４）－結合したグルコピラノシド単位からなる、天然に存在する環状グルコース誘導体である。その環状構造は、グルコース単位の一級ヒドロキシルが狭い面に、二級ヒドロキシルが広い側の面にある、円錐台形を形成している。各面は、容易に、かつ独立して官能基を持つことができる。最も一般的に使用される天然のＣＤは、６、７、８つのグルコピラノシド単位を持ち、それぞれα、β、γシクロデキストリンと呼ばれている。好ましいシクロデキストリンはβである。ＣＤの環状構造のため、ＣＤは、ゲスト分子と超分子包接錯体を形成することができる空洞を有する。ＣＤは天然に存在し、容易に官能化され、ゲストを包摂するための空洞を有し、生体適合性があるため、薬物送達や芳香剤などを含む多くの商業的用途に使用されている。ＣＤの各面の反応性の違いを利用して、様々な修飾されたシクロデキストリンが合成されてきた。ＣＤの一級側の面はより容易に修飾され、置換の程度と位置を制御することが可能である。ハロゲン化されたＣＤ等の優れた脱離基を持つＣＤ誘導体は、ＣＤの官能化において重要な中間体である。ＣＤの一級ヒドロキシル単位をすべてヨード単位で置き換えることで、二級ヒドロキシルと剛直な円錐台形状をそのまま残したまま、一級側の面を完全に官能化できる中間体が得られる。１つの実施形態では、ヘプタキス－６－ヨード－６－デオキシ－β－シクロデキストリンを合成し、続いてメルカプトウンデカオスルホン酸（ＭＵＳ）と反応させることで、ウンデカナオスルホン酸基で一級側の面が官能化されたＣＤが得られた。その後、シクロデキストリンの二級側の面を独立して修飾し、さらなる可溶化基、色素分子、ポリマー等を導入することが可能である。さらに、β－ＣＤのサイズ（ｄ約１．５ｎｍ）は、本発明のコアにとって好ましいナノサイズに含まれ、ＨＡ球状頭部（約５ｎｍ）とよく一致する。β－シクロデキストリンは、殺ウイルス活性に寄与すると考えられている剛直な化学構造を有しており、狭い面に応じて最大７つの三糖結合リガンドを持つことができ、好ましくは３～４つの三糖結合リガンドを持つことができ、３はインフルエンザウイルスＨＡ球状頭部にあるシアル酸結合点の数である。

【００４４】

また、本発明の殺ウイルス性ナノ粒子は、精製された単一の分子又は化合物であることも可能であり、これらも本発明の範囲に包含されることが意図されている。

【００４５】

本発明の一実施形態は、コアと、このコアに共有結合された複数のリガンドとを含む殺ウイルス性ナノ粒子であって、上記リガンドの少なくとも一部分は三糖部分を含み、

上記コアはシクロデキストリンであり、好ましくはα－シクロデキストリン、β－シクロデキストリン、γ－シクロデキストリン又はこれらの組み合わせを含む群から選択され、

上記リガンドは、同じであるか又は異なり、置換されていてもよいアルキルに基づくリガンド、好ましくは置換されていてもよいC_4～C_{30}アルキルに基づくリガンド、より好

ましくは置換されていてもよいＣ６～Ｃ１５アルキルに基づくリガンドであり、
各三糖部分は、３－シアリル－Ｎ－アセチルラクトースアミン（３’ＳＬＮ）及び６－シアリル－Ｎ－アセチルラクトースアミン（６’ＳＬＮ）から選択される
殺ウイルス性ナノ粒子を提供する。

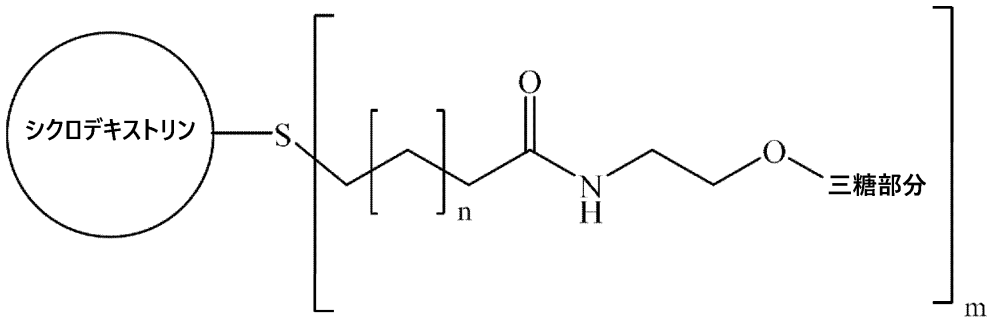
【００４６】

本発明の殺ウイルス性ナノ粒子のいくつかの実施形態では、上記リガンドの一部又はすべてが３’ＳＬＮを含み、上記リガンドの一部又はすべてが６’ＳＬＮを含み、上記リガンドのすべてではなく一部が三糖部分を含まない。

【００４７】

上記コアがシクロデキストリンである本発明の殺ウイルス性ナノ粒子は、式（Ｉ）によって表すことができる。

【化３】



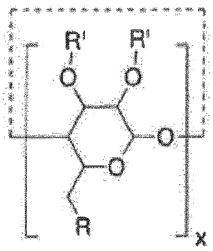
(I)

上記式（Ｉ）中、
ｍは２～８であり、好ましくはｍは２～７又は２～６であり、より好ましくはｍは３又は４であり、
ｎは２～２８又は４～１３又は４～３０又は６～１５であり、好ましくは２～２８又は４～１３であり、いくつかの実施形態ではｎは２又は４又は６～１３又は２８又は３０であり、
好ましくは、シクロデキストリンは、α－シクロデキストリン、β－シクロデキストリン、γ－シクロデキストリン又はこれらの組み合わせを含む群から選択される。

【００４８】

本発明の別の態様は、式（ＩＩ）によって表される殺ウイルス性ナノ粒子、又はその薬学的に許容できる塩である殺ウイルス性ナノ粒子を提供する。

【化４】



(II)

上記式（ＩＩ）中、
各Ｒは、独立に、置換されていてもよいアルキルに基づくリガンドであり、このリガンドのうちの少なくとも２つは、３－シアリル－Ｎ－アセチルラクトースアミン（３’ＳＬＮ）及び６－シアリル－Ｎ－アセチルラクトースアミン（６’ＳＬＮ）を含む群から選択される三糖部分を有するか、又は上記リガンドのうちの少なくとも１つは３’ＳＬＮを有しかつ

別のリガンドは６’ＳＬＮを有し、好ましくは、置換されていてもよいアルキルに基づくリガンドは、置換されていてもよいＣ４～Ｃ３０アルキルに基づくリガンド、より好ましくは置換されていてもよいＣ６～Ｃ１５アルキルに基づくリガンド、又は６’ＳＬＮを含む置換されていてもよいＣ６～Ｃ１５アルキルに基づくリガンドであり、

各Ｒ’は、独立に、Ｈ、－（ＣＨ２）ｙ－ＣＯＯＨ、－（ＣＨ２）ｙ－ＳＯ３－、ポリマー又は水可溶化部分であり、好ましくは、Ｒ’はＨであり、好ましくは、Ｒ’は、独立に、Ｈ、－（ＣＨ２）ｙ－ＣＯＯＨ、－（ＣＨ２）ｙ－ＳＯ３－、又はポリマーであり、好ましくは、Ｒ’は、独立に、－（ＣＨ２）ｙ－ＣＯＯＨ、－（ＣＨ２）ｙ－ＳＯ３－、又はポリマーであり、好ましくは、Ｒ’は、独立に、Ｈ、－（ＣＨ２）ｙ－ＣＯＯＨ、又は－（ＣＨ２）ｙ－ＳＯ３－であり、好ましくは、Ｒ’は、独立に、－（ＣＨ２）ｙ－ＣＯＯＨ、又は－（ＣＨ２）ｙ－ＳＯ３－であり、

ｘは６、７又は８であり、

ｙは、少なくとも４～約２０の整数であり、好ましくは、ｙは少なくとも４であり、好ましくは、ｙは４～２０であり、好ましくは、ｙは７～１１であり、最も好ましくは、ｙは１０であり、他の実施形態では、ｙは少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１であり、他の実施形態では、ｙは、最大１００、最大７０、最大５０、最大２５、最大２０、最大１５である。

【００４９】

本発明の殺ウイルス性ナノ粒子に含まれるポリマーは、合成ポリマー及び天然ポリマーの両方から選択することができる。本発明の一実施形態では、合成ポリマーは、ポリ（エチレングリコール）（ＰＥＧ）、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）、ポリ（アクリルアミド）（ＰＡＡｍ）、ポリ（ｎ－ブチルアクリレート）、ポリ（α－エステル）、（ＰＥＧ－ｂ－ＰＰＯ－ｂ－ＰＥＧ）、ポリ（Ｎ－イソプロピルアクリルアミド）（ｐＮＩＰＡＡＭ）、ポリ乳酸グリコール酸共重合体（ＰＬＧＡ）及び／又はこれらの組み合わせを含む群から選択されるが、これらに限定されない。本発明の別の実施形態では、天然ポリマーは、デキストラン、デキストリン、グルコース、セルロース及び／又はこれらの組み合わせを含む群から選択される。

【００５０】

本発明の殺ウイルス性ナノ粒子のいくつかの実施形態では、三糖部分は、好ましくは６’ＳＬＮであり、これはヒトインフルエンザ株に特異的である。本発明の殺ウイルス性ナノ粒子の他の実施形態では、三糖部分は、好ましくは３’ＳＬＮであり、これは鳥インフルエンザ株に特異的である。

【００５１】

本発明の殺ウイルス性ナノ粒子のリガンド（又はリガンド化合物）は、通常は十分に長く（少なくとも２つ、又は少なくとも４つ、又は少なくとも６つの炭素原子）、疎水性である。

【００５２】

典型的には、本発明に関しては、置換されていてもよいアルキルに基づくリガンドは、ヘキサン、ペンタン、オクタン、ウンデカン、ヘキサデカンに基づくリガンドを含む群から選択される。

【００５３】

本発明の殺ウイルス性ナノ粒子の置換されたアルキルに基づくリガンド、置換されたＣ４～Ｃ３０アルキルに基づくリガンド、及び置換されたＣ４～Ｃ３０カルボキシアルキルは、アルケニル、アルケニルチオ、アルケニルオキシ、アルコキシ、アルコキシアルコキシ、アルコキシアルコキシアルコキシ、アルコキシアルコキシアルキル、アルコキシアルキル、アルコキシルカルボニル、アルコキシカルボニルアルコキシ、アルコキシカルボニルアルキル、アルコキシスルホニル、アルキル、アルキルアミドアルキル、アルキルカルボニル、アルキルカルボニルアルコキシ、アルキルカルボニルアルキル、アルキルカルボニルアルキルチオ、アルキルカルボニルオキシ、アルキルカルボニルチオ、アルキルスルフィニル、アルキルスルフィニルアルキル、アルキルスルホニル、アルキルスルホニルアル

キル、アルキルチオ、アルキルチオアルキル、アルキルチオアルコキシ、アルキニル、アルキニルオキシ、アルキニルチオ、アリール、アリールカルボニル、アリールオキシ、アリールスルホニル、カルボキシ、カルボキシアルコキシ、カルボキシアルキル、シアノ、シアノアルコキシ、シアノアルキル、シアノアルキルチオ、１，３－ジオキソラニル、ジオキサニル、ジチアニル、エチレンジオキシ、ホルミル、ホルミルアルコキシ、ホルミルアルキル、ハロアルケニル、ハロアルケニルオキシ、ハロアルコキシ、ハロアルキル、ハロアルキニル、ハロアルキニルオキシ、ハロゲン、複素環、ヘテロシクロカルボニル、ヘテロシクロキシ、ヘテロシクロスルホニル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルコキシ、ヒドロキシアルキル、メルカプト、メルカプトアルコキシ、メルカプトアルキル、メチレンジオキシ、及びニトロを含む群から独立に選択される１つ、２つ、３つ、４つ又は５つの置換基で置換されている。好ましくは、置換されたアルキルに基づくリガンド、置換Ｃ$_4$～Ｃ$_{30}$アルキルに基づくリガンド、及び置換されたＣ$_4$～Ｃ$_{30}$カルボキシアルキルは、１つのメルカプト基（未修飾シクロデキストリンの対応する酸素を置換）で置換されている。好ましい置換されたアルキルに基づくリガンドは、アルキルアミドアルキル置換されたＣ$_4$～Ｃ$_{30}$又はＣ$_2$～Ｃ$_{28}$又はＣ$_4$～Ｃ$_{13}$のアルキルに基づくリガンドである。

【００５４】

上記リガンドと三糖部分を含むリガンドの割合（百分率）は、７５％：２５％～９５％：５％、好ましくは８８％：１２％である。

【００５５】

本開示に関しては、「複数のリガンド」は、本発明の複数のリガンドによって部分的又は完全にコーティングされた殺ウイルス性ナノ粒子コアを指し、それらのリガンドの少なくとも一部分は、本発明の三糖部分を含む。このコーティングは、均質であってもよく、構造化されていなくてもよく、又は構造化されていてもよい。いくつかの実施形態では、当該殺ウイルス性ナノ粒子は、本発明の三糖部分を含むリガンドの非常に高い密度（ＨＤ）、例えば全リガンドの２５％を含む。いくつかの実施形態では、当該殺ウイルス性ナノ粒子は、１ｎｍ^{2}あたり約２～約５つの本発明のリガンドを含み、このリガンドの少なくとも一部分は三糖部分を含む。他の実施形態では、当該殺ウイルス性ナノ粒子は、１ｎｍ^{2}あたり４つの本発明のリガンドを含んでおり、このようなリガンドの少なくとも一部分は三糖部分を含む。

【００５６】

本発明のいくつかの実施形態では、本発明の複数のリガンドは、ポリエチレングリコール５（ＰＥＧ（５））及び１６－メルカプトヘキサデコン酸（Ｃ１５）等の、少なくとも２種の構造的に異なるリガンドの混合物を含む。本明細書で使用する用語「少なくとも２種の構造的に異なるリガンドの混合物」は、上で定義された本発明の２種以上のリガンドの組み合わせであって、それらのリガンドは少なくとも１つの位置で化学組成が互いに異なる組み合わせを指す。この混合物は、有利には、三糖部分を持たないリガンドが、三糖部分を持つリガンドに対して最適な間隔を提供し、三糖部分とインフルエンザウイルスＨＡとの間の相互作用を妨げないように編成することができる。従って、三糖部分を持たないリガンドと三糖部分を持つリガンドの間には、約７５：２５～約９５：５、好ましくは約８８：１２の範囲の百分率比が存在することになる。

【００５７】

本発明の一実施形態によれば、ＰＥＧ（５）と１６－メルカプトヘキサデコン酸（Ｃ１５）との混合リガンドの金ナノ粒子（ＮＰ）が合成された。ＰＥＧ（５）はＮＰの水溶性を高めるのに対し、Ｃ１５は三糖をグラフトさせるためのリガンドである。リガンドの選択は、１）Ｃ１５は、ＨＡ上の約４ｎｍ離れた３つのシアル酸結合点をターゲットにするのに十分な長さであること、２）炭素に基づく剛直なリガンドは殺ウイルス活性を高めること、という２つの理由に基づいている。

【００５８】

上記リガンドは、一般的に、三糖部分とインフルエンザヘマグルチニンとの結合を最適化する量でコアの表面に存在する。上記コアは、典型的には１ｎｍ^{2}あたり４つのリガン

ドを有する。いくつかの実施形態では、コアは、１ｎｍ^{2}あたり約２～約５つのリガンドを有する。

【００５９】

本発明の殺ウイルス性ナノ粒子の重要な利点は、詳細な毒性分析により、組織構造の変化や炎症促進性サイトカインの放出が見られなかったことである。インビボ試験では、本発明の殺ウイルス性ナノ粒子による処置は、感染前又は感染後の薬剤の添加とは無関係に、感染したマウスの健康状態を著しく改善し、肺のウイルス量を減少させるということが示された。

【００６０】

本発明の別の態様は、有効量の１種以上の本発明の殺ウイルス性ナノ粒子と、少なくとも１種の薬学的に許容できる賦形剤、担体及び／又は希釈剤とを含む医薬組成物を開示する。

【００６１】

適切な賦形剤、担体、希釈剤については、それらを記載する「Ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ」（Ｐｅｒｇａｍｏｎ Ｐｒｅｓｓ １９９０）の第５巻２５．２章や、「Ｌｅｘｉｋｏｎ ｄｅｒ Ｈｉｌｆｓｓｔｏｆｆｅ ｆｕｅｒ Ｐｈａｒｍａｚｉｅ，Ｋｏｓｍｅｔｉｋ ｕｎｄ ａｎｇｒｅｎｚｅｎｄｅ Ｇｅｂｉｅｔｅ」（Ｈ．Ｐ．Ｆｉｅｄｌｅｒによる、Ｅｄｉｔｉｏ Ｃａｎｔｏｒ、２００２）等の標準的な文献が参照されてもよい。用語「薬学的に許容できる担体、賦形剤及び／又は希釈剤」は、一般的に安全で、許容される毒性を有する医薬組成物の調製に有用な担体、賦形剤又は希釈剤を意味する。許容できる担体、賦形剤、希釈剤には、ヒトの医薬用だけでなく、獣医用として許容できるものも含まれる。本明細書及び特許請求の範囲で使用される「薬学的に許容できる担体、賦形剤及び／又は希釈剤」には、そのような担体、賦形剤及び／又は希釈剤の１つと２つ以上の両方が含まれる。

【００６２】

任意に、本発明の医薬組成物は、１つ又は複数の追加の活性剤、好ましくは抗ウイルス剤をさらに含む。

【００６３】

本発明の方法で使用される本発明の殺ウイルス性ナノ粒子は、治療的投与のための様々な製剤及び医薬品に組み込むことができる。より詳細には、本明細書で提供される殺ウイルス性ナノ粒子は、適切な、薬学的に許容できる担体、賦形剤及び／又は希釈剤と組み合わせて医薬組成物に配合することができ、固体、半固体、液体又は気体の形態の製剤、例えば、錠剤、カプセル、丸薬、粉末、顆粒、ドラジェ、ゲル、スラリー、軟膏、溶液、坐剤、注射剤、吸入剤及びエアロゾルへと配合することができる。このように、当該殺ウイルス性ナノ粒子の投与は、経口、口腔内、吸入（肺、鼻）、直腸、非経口、腹腔内、皮内、経皮、頭蓋内及び／又は気管内の投与等、様々な方法で達成することができる。さらに、当該殺ウイルス性ナノ粒子は、デポ剤や徐放性製剤として、全身性ではなく局所的に投与することが可能である。当該殺ウイルス性ナノ粒子は、一般的な賦形剤、希釈剤、担体と一緒に製剤化し、錠剤に圧縮したり、経口投与に便利なエリキシル剤や溶液として製剤化したり、筋肉内や静脈内の経路によって投与したりすることができる。当該殺ウイルス性ナノ粒子は、経皮的に投与することも可能であり、徐放性製剤等として製剤化することもできる。当該殺ウイルス性ナノ粒子は、単独で投与することも、互いに組み合わせて投与することも、あるいは他の公知の化合物と組み合わせて使用することもできる。本発明で使用するのに好適な製剤は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ（１９８５）、フィラデルフィア、ペンシルベニア州、第１７版）に見出され、この文献は参照により本明細書に組み込まれる。さらに、薬物送達のための方法の簡単な総説については、参照により本明細書に組み込まれる、Ｌａｎｇｅｒ、Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９９０） ２４９：１５２７－１５３３を参照されたい。

【００６４】

徐放性製剤が調製されてもよい。徐放性製剤の好適な例としては、本発明の殺ウイルス性ナノ粒子を含む固体疎水性ポリマーの半透過性マトリクスが挙げられ、このマトリクスは、成形品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形態にある。徐放性マトリクスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（２－ヒドロキシエチルメタクリレート）、又はポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第３，７７３，９１９号明細書）、Ｌ－グルタミン酸と［γ］エチル－Ｌ－グルタメートとの共重合体、非分解性のエチレン－酢酸ビニル、ＬＵＰＲＯＮ　ＤＥＰＯＴ（商標）（乳酸－グリコール酸共重合体と酢酸ロイプロリドからなる注射用微小球（ミクロスフェア））等の分解性乳酸－グリコール酸共重合体、及びポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシ酪酸が挙げられる。

【００６５】

また、本発明の殺ウイルス性ナノ粒子は、例えば、コアセルベーション技術や界面重合によって調製されたマイクロカプセルに封入されてもよく、例えば、それぞれコロイド薬物送達システム（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）又はマクロエマルジョンにおいて、ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン－マイクロカプセル及びポリ－（メチルメタクリレート）マイクロカプセルに封入することができる。このような技術は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　第１６版、Ｏｓｏｌ，Ａ．編（１９８０）に開示されている。

【００６６】

本明細書に記載されている医薬組成物は、当業者にとって公知である方法、すなわち、従来の混合、溶解、造粒、ドラギー化、湿式粉砕（浮遊）、乳化、カプセル化、封入、又は凍結乾燥のプロセスによって製造することができる。以下の方法及び賦形剤は単なる例示であり、決して限定するものではない。注射のために、殺ウイルス性ナノ粒子（及び任意に別の活性剤）は、それらを水性又は非水性の溶媒、例えば、植物性又は他の類似の油、合成脂肪族酸グリセリド、高級脂肪族酸のエステル、又はプロピレングリコールに溶解、懸濁、又は乳化することにより製剤へと配合することができ、必要に応じて、可溶化剤、等張剤、懸濁剤、乳化剤、安定剤、及び防腐剤等の従来の添加剤を用いることができる。好ましくは、本発明の殺ウイルス性ナノ粒子は、水溶液、好ましくはハンクス液、リンゲル液、生理食塩水バッファ等の生理学的に適合したバッファ中で製剤化することができる。経粘膜投与の場合は、浸透させるべきバリアーに適した浸透剤が製剤中に用いられる。このような浸透剤は、当該技術分野で一般的に公知である。

【００６７】

好ましくは、非経口投与のための医薬製剤は、水溶性の形態の当該殺ウイルス性ナノ粒子の水溶液を含む。加えて、当該殺ウイルス性ナノ粒子の懸濁液は、適切な油性注射用懸濁液として調製することができる。適切な親油性の溶媒又はビヒクルには、ゴマ油などの脂肪油、又はオレイン酸エチルやトリグリセリドなどの合成脂肪酸エステル、又はリポソームが含まれる。水性注射用懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、デキストラン等の、懸濁液の粘度を高める物質を含むことができる。任意に、懸濁液は、高濃度溶液の調製を可能にするために、当該殺ウイルス性ナノ粒子の溶解度を増加させる適切な安定剤又は薬剤を含むこともできる。

【００６８】

単一の剤形とするために担体物質と組み合わせることができる本発明の殺ウイルス性ナノ粒子の量は、治療するウイルス疾患、哺乳類の種、及び特定の投与方法によって変わることになる。また、特定の患者に対する具体的な投与量は、当業者にはよく理解されているとおり、採用する特定の化合物の活性、治療を受ける個体の年齢、体重、一般的な健康状態、性別及び食生活、投与の時間と経路、排泄率、以前に投与された他の薬剤、治療を受ける特定のウイルス疾患の重症度を含めた様々な要因に依存する。

【００６９】

本発明のさらなる態様は、インフルエンザウイルス感染症及び／若しくはインフルエンザウイルスと関連する疾患を治療並びに／又は予防する方法であって、必要とする対象に

、治療上有効な量の１種以上の本発明の殺ウイルス性ナノ粒子を投与する工程を備える方法を提供する。

【００７０】

本発明の別の態様は、インフルエンザウイルス感染症及び／若しくはインフルエンザウイルスと関連する疾患を治療並びに／又は予防することにおいて使用するための本発明の殺ウイルス性ナノ粒子を提供する。

【００７１】

本明細書で使用する「対象」又は「患者」という用語は当該技術分野でよく知られており、本明細書中では、イヌ、ネコ、ラット、マウス、サル、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ラクダ等の哺乳動物、最も好ましくはヒトを指すために互換的に使用される。ニワトリなどの他の動物も、これらの用語に包含される。好ましい実施形態では、「対象」又は「患者」という用語は、ヒト及び動物、例えば、イヌ、ネコ、ラット、マウス、サル、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ラクダ、ニワトリを指す。いくつかの実施形態では、この対象は、治療を必要としている対象、又はインフルエンザウイルスに感染している対象である。他の実施形態では、対象は、ニワトリ等の鳥インフルエンザに感染した動物であることができる。しかしながら、他の実施形態では、対象は、健康な対象又は既に治療を受けた対象であることが可能である。この用語は、特定の年齢又は性別を示すものではない。従って、男性か女性かにかかわらず、成人、子供、及び新生児（新生仔）の対象が包含されることが意図されている。

【００７２】

「治療」は、治療的な処置及び予防的又は防止的な措置の両方を指す。治療を必要とするものには、すでにインフルエンザウイルスに感染しているものだけでなく、インフルエンザウイルスの感染を予防したいものも含まれる。従って、本発明で治療すべき哺乳動物、好ましくはヒト、は、インフルエンザウイルスに感染していると診断されていてもよいし、インフルエンザウイルスに感染する素因又は感受性を有していてもよい。治療には、インフルエンザウイルス感染に起因する疾患若しくは状態の少なくとも１つの症状を改善すること、そのような疾患若しくは状態を治癒すること、及び／又はそのような疾患若しくは状態の発症を予防することが含まれる。予防することとは、例えば、侵入後のウイルスイベントに影響を与えることによって、インフルエンザウイルスが感染又は疾患を引き起こす能力を減弱又は低下させることを意味する。

【００７３】

治療を目的とした「哺乳動物」とは、ヒト、家畜や農場の動物、又はペット動物、例えばイヌ、ウマ、ネコ、ウシ、サル等を含む、哺乳動物に分類されるあらゆる動物を指す。好ましくは、この哺乳動物はヒトである。

【００７４】

用語「治療上有効な量」は、本発明の殺ウイルス性ナノ粒子が、受容対象においてインフルエンザウイルスを変化させ、それを不活性化するのに有効な量、及び／又は、その存在が受容対象の生理的状態に検出可能な変化をもたらす場合、例えば、ウイルス感染に関連する少なくとも１つの症状を改善し、少なくとも１つのウイルス剤の伝播速度を防止又は低下させる量を指す。

【００７５】

本発明の別の態様は、有効量の１種以上の本発明の殺ウイルス性ナノ粒子と、任意に少なくとも１種の好適な担体又はエアロゾル担体とを含む殺ウイルス性組成物を提供する。「有効量」は、インフルエンザウイルスを不可逆的に阻害するのに十分な量、すなわち、殺ウイルス効果を得るのに十分な量を指す。一実施形態では、好適な担体は、安定剤、香料、着色料、乳化剤、増粘剤、湿潤剤、又はそれらの混合物を含む群から選択される。別の実施形態では、当該殺ウイルス性組成物は、液体、ゲル、フォーム（泡沫）、スプレー又はエマルションの形態であることができる。さらなる実施形態では、当該殺ウイルス性組成物は、芳香剤、殺菌液、又は消毒液とすることができる。

【００７６】

本発明の別の態様は、本発明の殺ウイルス性組成物又は１種以上の本発明の殺ウイルス性ナノ粒子と、本発明の殺ウイルス性ナノ粒子を付与及び／又は分注するための手段とを含む装置（又は製品）を提供する。別の実施形態では、上記手段は、ディスペンサー、スプレーアプリケーター、又は本発明の殺ウイルス性ナノ粒子に浸した固体支持体を含む。別の実施形態では、この支持体は、織布又は不織布、織物、ペーパータオル、コットンウール、吸収性ポリマーシート、又はスポンジである。

【００７７】

本発明の別の態様は、本発明の殺ウイルス性ナノ粒子又は本発明の殺ウイルス性組成物又は本発明の医薬組成物を用いた消毒及び／又は殺菌の方法を提供する。

【００７８】

好ましい実施形態では、当該消毒及び／又は殺菌の方法は、（ｉ）少なくとも１種の本発明の殺ウイルス性ナノ粒子、又は本発明の殺ウイルス性組成物、又は本発明の医薬組成物を準備する工程と、（ｉｉ）インフルエンザウイルスに汚染された表面、又はインフルエンザウイルスに汚染されたと疑われる表面を、少なくとも１種の本発明の殺ウイルス性ナノ粒子、又は本発明の殺ウイルス性組成物、又は本発明の医薬組成物と、殺ウイルス効果を得るのに十分な時間接触させる工程とを備える。いくつかの実施形態では、インフルエンザウイルスに汚染された表面は、ヒト又は動物の皮膚である。他の実施形態では、インフルエンザウイルスに汚染された表面は、医療機器、衣類、マスク、家具、部屋等の非生物の表面である。

【００７９】

本発明の別の態様は、殺菌のため、及び／若しくは消毒のための、本発明の殺ウイルス性ナノ粒子又は本発明の殺ウイルス性組成物又は本発明の医薬組成物の使用を提供する。いくつかの実施形態では、殺菌及び消毒は、インフルエンザウイルスに汚染された表面又はインフルエンザウイルスに汚染されたと疑われる表面のためのものである。いくつかの好ましい実施形態では、この表面は、ヒト又は動物の皮膚である。他の好ましい実施形態では、上記表面は、医療機器、衣類、マスク、家具、部屋等の非生物の表面である。一実施形態では、本発明の殺ウイルス性組成物又は本発明の医薬組成物は、頻繁に使用する殺ウイルス性手指消毒剤として使用される。別の実施形態では、本発明の殺ウイルス性組成物又は本発明の医薬組成物は、噴霧によって付与される。さらなる実施形態では、本発明の殺ウイルス性組成物又は本発明の医薬組成物は、保護マスク上に塗布される。

【００８０】

当業者であれば、本明細書に記載された発明は、具体的に記載されたもの以外にも変形及び変更が可能であることを理解できるであろう。本発明は、その趣旨又は本質的な特性から逸脱しない範囲で、そのようなすべての変形及び変更を含むことを理解されたい。また、本発明は、本明細書で言及又は示されているすべての工程、特徴、組成物及び化合物を、個別に又はまとめて、並びに上記工程又は特徴の任意及びすべての組み合わせ又は任意の２つ以上を含む。それゆえ、本開示は、すべての態様において例示されただけであり、制限的ではないと考えられ、本発明の範囲は添付の請求項によって示され、均等の意味及び範囲内に入るすべての変更は、本発明に包含されることが意図されている。

【００８１】

前述の説明は、以下の実施例を参照することにより、より完全に理解されるであろう。しかしながら、このような実施例は、本発明を実施する方法を例示するものであり、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

【実施例】

【００８２】

実験データ

密度アッセイ

最適な６’ＳＬＮ密度を明らかにするために、３つの異なる６－シアリル－Ｎ－アセチルラクトースアミン（６’ＳＬＮ）密度のＮＰを合成した（図１）。また、ＰＥＧ（５）及び３－シアリル－Ｎ－アセチルラクトースアミン（３’ＳＬＮ）でコーティングした金ナノ粒

子を用いた対照実験も行った。

【００８３】

２種のＡ型インフルエンザ株Ｈ１Ｎ１（Ｎｅｔｈ／０９）及びＨ３Ｎ２（Ｓｉｎｇ／０４）、並びに１種のＢ型インフルエンザ株Ｙａｍａｇａｔａについて、用量反応性の比較試験を行った。ＬＤ－６’ＳＬＮ　ＮＰは、試験したすべてのウイルスに対して最も低い半数阻害濃度（ＥＣ$_{50}$）を有する。一般的に、ＮＰはＢ型よりもＡ型をよく阻害した。

【００８４】

【表１】

表 1: H1N1 Neth/09 株に対する異なる NP のインビトロ半数阻害濃度(EC50)及び細胞毒性濃度 (CC50). モル濃度は、NP 及び三糖/NP に基づき別々に算出した.

	インフルエンザ株	EC_{50} (μg/mL)	EC_{50} NP (nM)	EC_{50} 6'SLN (nM)	CC_{50} (μg/ml)
LD 6'SLN NP (18 6'SLN/NP)	H1N1 Neth/09	0.13	0.64	11.5	>500
HD 6'SLN NP (38 6'SLN/NP)	H1N1 Neth/09	0.45	2.2	83	> 500
LD(-) 6'SLN NP (8 6'SLN/NP)	H1N1 Neth/09	1.1	5.4	43	> 500
LD 3'SLN NP (18 3'SLN/NP)	H1N1 Neth/09	5.3	27.2	489	>500
PEG5 NP	H1N1Neth/09	N/A	N/A	N/A	> 500

【００８５】

【表２】

表 2: H3N2 Sing/04 株に対する異なる NP の EC_{50} 及び CC_{50}.

	インフルエンザ株	EC_{50} (μg/mL)	EC_{50} NP (nM)	EC_{50} 6'SLN (nM)	CC_{50} (μg/ml)
LD 6'SLN NP (18 6'SLN/NP)	H3N2 SING/04	0.58	2.8	50.4	>500
HD 6'SLN NP (38 6'SLN/NP)	H3N2 SING/04	1.12	5.9	224.4	> 500
LD(-) 6'SLN NP (8 6'SLN/NP)	H3N2 SING/04	1.9	9.4	75.2	> 500
LD 3'SLN NP (18 3'SLN/NP)	H3N2 SING/04	4.5	22	396	>500
PEG5 NP	H3N2 SING/04	N/A	N/A	N/A	> 500

【００８６】

【表３】

表 3: インフルエンザ B/Yamagata に対する異なる NP の EC_{50} 及び CC_{50}.

	インフルエンザ株	EC_{50} (μg/mL)	EC_{50} NP (nM)	EC_{50} 6'SLN (nM)	CC_{50} (μg/ml)
LD 6'SLN NP (18 6'SLN/NP)	B/Yamagata	13.7	67	1206	>500
HD 6'SLN NP (38 6'SLN/NP)	B/Yamagata	17.25	85	3230	> 500
LD(-) 6'SLN NP (8 6'SLN/NP)	B/Yamagata	53.3	260	2080	> 500
LD 3'SLN NP (18 3'SLN/NP)	B/Yamagata	>100	>100	>1000	>500
PEG5 NP	B/Yamagata	N/A	N/A	N/A	> 500

【００８７】

次に、阻害のメカニズムが不可逆的であるか否かを調べるために、殺ウイルス性アッセイを行った。殺ウイルス性アッセイでは、ＮＰを対応するＩＣ９９濃度のウイルスと一定時間インキュベートした。その後、接種物の連続希釈を行い、ウイルスの残存感染力を測定した。Ｎｅｔｈ／０９株及びＳｉｎｇ／０４株に対するＬＤ　６’ＳＬＮ　ＮＰの殺ウイ

ルス活性は、用量反応実験に比べてウイルス濃度を１０倍に高めて試験した。Ｎｅｔｈ／０９株の力価は２ログ（対数）低下したのに対し、Ｓｉｎｇ／０４株は１．５ログ低下した。ウイルスの力価が１～２ログ低下するということは、ウイルスが不可逆的に阻害されていることを示す。

【００８８】

ウイルスとＮＰとの相互作用を明らかにするＴＥＭ研究

ウイルスとＮＰとの相互作用は、電子顕微鏡観察（ＴＥＭ）でも示された。Ｈ３Ｎ２Ｖｉｃ／１１ウイルスをＬＤ　６’ＳＬＮ　ＮＰと１時間インキュベートした。ＴＥＭのグリッドを調製した後、メチルタングステン染色を行った。ウイルスの大部分はＬＤ　６’ＳＬＮ　ＮＰで完全に覆われていた（図２Ｂ）。ＰＥＧ（５）ＮＰを用いた対照実験では、ＮＰは全周に渡っていたが、ウイルスのエンベロープには付着していなかった（図２Ｃ）。

【００８９】

鳥インフルエンザウイルスを阻害するＮＰの可能性

インフルエンザのパンデミックは、通常、動物のインフルエンザ株とヒトのインフルエンザ株が混じり合うときに現れる。それゆえ、次の目標は、本発明のＮＰで鳥インフルエンザ株を不可逆的に阻害することである。予備的な研究を、卵馴化ウイルス株であるＣＡＬ／０９を用いて行った。Ｎｅｔｈ／０９とＣＡＬ／０９は非常によく似た２種のヒトＨ１Ｎ１株である。ＬＤ－６’ＳＬＮ　ＮＰはＮｅｔｈ／０９株に対して強い活性を有する。しかしながら、鶏卵を用いて複製されたＣＡＬ／０９株は、ＬＤ　３’ＳＬＮ　ＮＰとより高い親和性で結合する（表４）。この結果は、ＬＤ－３’ＳＬＮ　ＮＰが鳥インフルエンザ株を阻害することを示す。

【００９０】

【表４】

表 4: 卵馴化ウイルス株は-2,3 結合を好むのに対して、マウス馴化株は-2,6 結合を好む.

	Neth/09 マウス馴化 EC_{50} (μg/mL)	CAL/09 卵馴化 EC_{50} (μg/mL)
LD-6’SLN	0.13	34.9
LD-3’SLN	5.13	1.18

【００９１】

金のコアからシクロデキストリンのコアへ

ヒトインフルエンザウイルスは、Ｃ１５－６’ＳＬＮをグラフトした金ＮＰで不可逆的に阻害された。しかしながら、医薬品への応用には、金コアを有機材料に変えることが重要である。ポリマー、デンドリマー、デンドロン等の異なる有機材料の中でも、シクロデキストリン（ＣＤ）は、ＨＡを標的にするために６’ＳＬＮを持つリガンドをグラフトするのに好ましいコアである。

【００９２】

ＣＤのサイズ（ｄ　約１．５ｎｍ）は、本発明の金（金属）ＮＰ（約３ｎｍ）に匹敵し、ＨＡの球状頭部（約５ｎｍ）とよく一致する。金（金属）ＮＰと同様、シクロデキストリンは剛直な化学構造を持っており、これはリガンドとともに殺ウイルス活性に寄与する。また、β－シクロデキストリンは最大で７つの三糖（より好ましくは３又は４つの三糖）を持つことができ、３はＨＡ球状頭部のシアル酸結合点の正確な数である（図３Ａ）。それゆえ、金ナノ粒子と非常によく似た方法で、β－ＣＤをＣ１５－６’ＳＬＮで修飾した。

【００９３】

シアル酸を持つ従来の有機材料と比較して、異なるヒトインフルエンザウイルスに対して有意に低いＥＣ$_{50}$値が得られた（図３Ｂ）。修飾シクロデキストリンの殺ウイルス活

性はインビボ及びエキソビボの実験の両方で証明され、これらの実験でウイルスの力価は数ログ低下した（図３Ｃ及び図３Ｄ）。エキソビボでの成功裏の結果は、修飾シクロデキストリンがインビボでウイルスを不可逆的に阻害することを示す。

【００９４】

ナノ材料を用いてヒトインフルエンザウイルスを不可逆的に阻害するためには、リガンドと同様に三糖の選択が非常に重要であることがここで示される。金ナノ粒子とシクロデキストリンの２つの異なるコアにあるＣ１５－６’ＳＬＮリガンドは、非常に低いナノ材料濃度でいくつかの株のヒトインフルエンザウイルスを阻害した。三糖単位では低ｎＭ範囲（１～１００ｎＭ）のＥＣ$_{50}$濃度が達成されたが、同様の材料についての文献のＥＣ$_{50}$値は５０～５００倍高かった。

【００９５】

修飾シクロデキストリンのインビトロ抗ウイルス活性

化学構造と抗ウイルス活性の関係を調べるために、β－シクロデキストリン（β－ＣＤ）を、三糖を用いて及び用いずに、異なるリガンドで修飾した。例示的な修飾シクロデキストリンを図４に示す。これらは、^{1}Ｈ核磁気共鳴分光法（ＮＭＲ）で測定したところ、同等の数の三糖を有する（図５及び表５参照）。インフルエンザＡ／Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ／２００９（Ｈ１Ｎ１）株（Ａ／ＮＬ／０９）に対する用量反応アッセイを行い、これらのＮＰの阻害活性を比較した（図６）。感染は、感染後２４時間（感染後の時間、ｈｐｉ）に、免疫細胞化学的なアッセイで定量化した。十分に長い疎水性リガンドと６’ＳＬＮ末端基を持つβ－ＣＤ（Ｃ６－６’ＳＬＮ、Ｃ１１－６’ＳＬＮ及びＣ１４－６’ＳＬＮ）は、インフルエンザＡ／ＮＬ／０９による細胞への感染に対して強い阻害活性を示し、ＥＣ$_{50}$値はナノモル範囲であった。他方、より短いリガンドＣ１－６’ＳＬＮを有するβ－ＣＤは、感染をほとんど阻害しなかった。十分に長いリガンドを導入することで、末端基の柔軟性が明らかに高まり、その結果、阻害濃度が減少した。疎水性のリガンドを親水性のＰＥＧ８リガンドに置き換えた場合（ＰＥＧ８－６’ＳＬＮ）、ＥＣ$_{50}$は同等であった（ただし若干高かった）。

【００９６】

【表５】

表 5: ^{1}H NMR によって決定した ß-シクロデキストリン１分子あたりの 6’SLN 又は 3’SLN の平均数、及び対応する分子量.

	スペーサの数/CD	6’SLN の数/CD	分子量 (kDa)
P8-6’	4	3.5	5.7
C14-6’	3.1	3	4.1
C11-6’	3.6	3.1	4.1
C6-6’	2.8	2.7	3.4
C11-3’	3	2.7	3.9
C1-6’	-	3	3.5

【００９７】

Ａ／ＮＬ／０９に対して最も良好な阻害活性を示したナノ粒子であるＣ１１－６’ＳＬＮは、Ａ型及びＢ型の両方のヒトインフルエンザ株に対して強い抗ウイルス活性を示した（表６及び図７）。重要なのは、Ｃ１１－６’ＳＬＮが、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｈｏｓｐｉｔａｌ ｏｆ Ｇｅｎｅｖａ（ジュネーブ大学病院）の患者から分離され、細胞内で１回だ

け継代された、ごく最近のＡ（Ｈ１Ｎ１）型及びＢ型の臨床株（２０１７／２０１８年のインフルエンザシーズンのもの）を阻害したことである。Ｃ１１－６’ＳＬＮは、ＨＳＰＧ結合ウイルスであるＨＳＶ－２に対しては抗ウイルス活性を示さず、これは、この化合物のシアル酸依存性ウイルスに対する特異性を示す。

【００９８】

６’ＳＬＮはヒトのインフルエンザ株に特異的であることが知られているが、３’ＳＬＮは鳥インフルエンザ株に一次付着点として好まれる。このアプローチの汎用性、とりわけ種の壁を越える能力を持つことが知られているインフルエンザ株に対する汎用性を証明するために、Ｃ１１－３’ＳＬＮを合成し、鳥インフルエンザ株に対して試験した（図４）。Ｃ１１－３’ＳＬＮは、Ｈ５Ｎ１及びＨ７Ｎ１の２つの鳥インフルエンザ株を、それぞれ４．１μｇ／ｍｌ及び８．８μｇ／ｍｌの濃度で阻害することに成功した（表６参照）。事実上、これらの結果は、ヒト株に対して採用した上記戦略を裏付けるものである。重要なのは、これらの鳥類株の１つであるＨ５Ｎ１は、次のインフルエンザ・パンデミックを引き起こす可能性が高いということである。Ｃ１１－３’ＳＬＮがヒト株であるＡ／ＮＬ／０９を阻害することができるかどうか、及びＣ１１－６’ＳＬＮが鳥類株であるＨ５Ｎ１に対しても活性を示すかどうかをさらに試験した。Ｃ１１－３’ＳＬＮはＡ／ＮＬ／０９に対して良好な阻害活性を示したが（図４及び表６）、Ｃ１１－６’ＳＬＮはＨ５Ｎ１に対して活性を示さなかった（表６及び図８）。これらの結果は、異なるタイプのシアル酸に対する鳥類株とヒト株の結合親和性を比較した過去の文献と一致している。鳥インフルエンザ株（特にＨ５Ｎ１株）は、薄くて直線的なトランス構造を持つα－２，３結合シアル酸に優先的に結合する。他方、ヒト株のより広いシアル酸結合部位は、嵩高いシス構造を持つα－２，６結合シアル酸及びより幅の狭い－２，３結合シアル酸の両方に対応できる。

【００９９】

【表６】

表 6: 異なるインフルエンザ株に対する C11-6'SLN 及び C11-3'SLN の阻害活性.

	化合物	CC_{50} (μg/mL)	EC_{50} (μg/mL)	EC_{50}† (nM)
A/Netherlands/2009 (H1N1)	C11-6'	>100	0.18 (0.14 - 0.24)	42
	C11-3'	>100	6.5 (4.1-10.1)	>1000
A/Clinical/2018 (H1N1)	C11-6'	>100	0.5 (0.4 - 0.67)	125
Singapore/2004 (H3N2)	C11-6'	>100	0.23 (0.16 － 0.34)	56.5
B/Wisconsin/2010*	C11-6'	>100	2.2 (1.49 － 3.42)	500
B/Clinical/2018	C11-6'	>100	20 (10.5 － 28.7)	>1000
A/turkey/Turkey/2005 (H5N1)	C11-3'	>100	4.1 (2.55-6.7)	931
	C11-6'	>100	N/A	N/A
A/turkey/Italy/1999 (H7N1)	C11-3'	>100	8.8 (3.2-26)	>1000
HSV-2 (対照)	C11-6'	>100	N/A	N/A

* B Yamagata 亜型

† モル濃度は、シクロデキストリンコアの数に基づいて決定した.

CC_{50}: 半数細胞毒性濃度.

【０１００】

続いて、阻害メカニズム、すなわち殺ウイルス性（不可逆的）であるか又はウイルス増殖抑止性（可逆的）であるかを明らかにするために、殺ウイルス性アッセイを行った。β－シロデキストリンのコア及び６’ＳＬＮの部分を共通にするが、異なるリガンドを持つ類似のナノ粒子を合成することで、殺ウイルス作用をもたらす構造的特徴が浮き彫りになる（図９及び図１０）。不可逆的なウイルス阻害の重要な要素の１つは、結合部分（ここでは６’ＳＬＮ）が疎水性のリガンドによって担われることであるという仮説を立てた。この仮説を検証するために、Ｃ１１－６’ＳＬＮとＰ８－６’ＳＬＮを比較した。簡単に説明すると、完全に保護する量の化合物（１０μｇのＣ１１－６’と５０μｇのＰ８－６’）をＡ／ＮＬ／０９と１時間インキュベートした。接種物の連続希釈を行い、その後、感染性を評価した。Ｃ１１－６’の場合、（ａ）のグラフは希釈しても完全に保護されていることを示し、（ｃ）のグラフはこの特性が多くの異なる株に対して見られることを示す。これを不可逆的（すなわち、希釈に強い）阻害活性といい、殺ウイルスメカニズムと呼ぶ。Ｐ８－６’の場合、（ｂ）のグラフは、初期濃度では完全に保護されていたが、希釈すると対照サンプル（ウイルスのみ）の感染力との差がなくなったことを示す。つまり、阻害効果は可逆的である（ウイルス増殖抑止性である）ことが判明した。この２つのナノ粒子は、リガンドの疎水性のみが異なり、同等の阻害活性を示す。殺ウイルス性アッセイでは、Ｃ１１－６’ＳＬＮはウイルスの力価を１０００倍に低下させたが（図９ｂ）、Ｐ８－６’ＳＬＮの場合は感染が完全に回復した（図９ａ）。従って、Ｃ１１－６’ＳＬＮはウイルスに対して不可逆的な阻害効果を持つのに対し、Ｐ８－６’ＳＬＮの効果は可逆的である。注目す

べきは、どちらのナノ粒子も細胞に対して無毒性であることである（図９ａ及び図９ｂ）。他のインフルエンザ株に対するＣ１１－６’ＳＬＮの殺ウイルス活性をさらに調べたところ、株によらず不可逆的な活性が確認された（図９ｃ）。

【０１０１】

修飾シクロデキストリンのエキソビボ活性

ヒトの気道上皮を再構成した３ＤモデルであるＭｕｃｉｌＡｉｒ（登録商標）を用いて、エキソビボ実験を行った。この気液界面培養物は、ヒトにおけるインフルエンザウイルス複製の主要な部位であるヒトの上気道上皮の偽重層構造（基底細胞、繊毛細胞、杯細胞）とバリアー防御機構（すなわち、粘膜繊毛クリアランス及び上皮細胞免疫）の両方を完全に模倣する。エキソビボ実験は、適応バイアスを排除するため、細胞内で継代培養されていない臨床Ｈ１Ｎ１パンデミック０９株を用いて行った。Ｃ１１－６’ＳＬＮ又はＰ８－６’ＳＬＮ（５０μｇ／組織）とウイルス（10^4 ＲＮＡコピー／組織）を、事前にインキュベートすることなく、組織の頂部（アピカル）表面に最初に同時に添加した。４時間後、接種物を除去し、組織を洗浄し、ナノ粒子を再添加することなく、組織の頂部洗浄液からｑＰＣＲを用いて感染の進行を毎日モニタリングした。Ｃ１１－６’ＳＬＮは、実験の全過程を通じてウイルスの複製を完全に阻止したのに対して、Ｐ８－６’ＳＬＮは、感染後最初の２日間（感染後の日数、ｄｐｉ）はウイルスの複製をわずかに低下させたが、それ以降は阻止しなかった（図１１ａ）。

【０１０２】

さらに、Ｃ１１－６’ＳＬＮで処理した組織では、ウイルスの複製が阻害されていることは、感染細胞が存在しないことや、処理した組織の形態が乱れていないことからも明らかであり、未処理の組織やＰ８－６’ＳＬＮで処理した組織とは明らかに異なっていた（図１１ｂ）。免疫蛍光画像と頂部洗浄液中の乳酸脱水素酵素（ＬＤＨ）の放出がないこととから、繊毛細胞層と生理的な繊毛の運動及び組織の完全性とが保たれていることが明らかになった（図１１ｂ及び図１２）。これとは対照的に、未処理の組織又はＰ８－６’ＳＬＮで処理した対照組織では、繊毛細胞層の変化と感染細胞の存在により、厚みが減少していた（図１１ｂ）。処理した組織でｑＰＣＲにより検出された残留ウイルスレベルが感染性であることを除外するために、組織を２３日間培養下で保ったが、経時的なウイルス力価の上昇は観察されず、一方で未処理の組織では持続的にウイルスが排出されていた（図１３）。重要なのは、Ｃ１１－６’ＳＬＮ（３０μｇ／組織）を治療目的での投与を模して１ｄｐｉから２４時間ごとに４日間投与したより厳しい後処理条件でも、エキソビボ実験を行ったことである。また、この条件では、上記ナノ粒子は顕著な阻害活性を示し、治療薬としての可能性が証明された（図１１ｃ）。同じエキソビボモデルで、高用量のＣ１１－６’ＳＬＮを毎日投与した場合の生体適合性を評価した。Ｃ１１－６’ＳＬＮは、上述の条件において、細胞毒性や炎症促進活性を示さなかった（図１４）。

【０１０３】

修飾シクロデキストリンのインビボ活性

ＢＡＬＢ／ｃマウスを用いて、共処置と後処置の両方の条件でインビボ実験を行った。共処置実験では、マウスにＣ１１－６’ＳＬＮ（２５μｇ／マウス）とＡ／ＮＬ／０９（１００感染粒子／マウス）を同時に経鼻経路で投与した。Ｃ１１－６’ＳＬＮの投与が感染動物の生理的状態に与える影響を推定するために、マウスの体温と体重を毎日測定した。２ｄｐｉにおいて、マウスの半分を無作為に安楽死させ、残りのマウスをＣ１１－６’ＳＬＮで再処置した。第２群のマウスは４ｄｐｉで安楽死させた。気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬ）からウイルスの力価を定量した（図１５ａ）。処置を受けたマウスでは、感染後２日目及び４日目にウイルス力価の有意な低下が観察された（図１５ａ）。また、Ｃ１１－６’ＳＬＮの抗ウイルス作用により、無処置のマウスに比べて体重と体温の両方が有意に維持され、罹患率が著しく低下した（図１５ｂ及び図１５ｃ）。総合すると、これらの結果は、Ｃ１１－６’ＳＬＮナノ粒子は、インビボでの肺におけるウイルスの感染と拡散を防ぐ能力があることを実証する。

【０１０４】

Ｃ１１－６’ＳＬＮのインビボでの治療潜在能力は、後処置の条件でも評価した。マウスをＡ／ＮＬ／０９（１００感染粒子／マウス）に感染させ、６ｈｐｉでＣ１１－６’ＳＬＮ（１４μｇ／マウス）で処置し、その後３日間毎日、同じ用量のナノ粒子で処置した（図１５ｄ～ｆ）。毎日、マウスの体重と体温を測定した。後処置の条件ではＣ１１－６’ＳＬＮの効力は低下していたが、それでも感染の進行を遅らせた。処置したマウスは、罹患徴候の減少（図１５ｄ及び１５ｅ）及び臨床スコアの改善を示した。これらの感染動物の生理状態の改善は、生存期間の延長にもつながった（図１５ｆ）。

【０１０５】

方法

修飾シクロデキストリンの合成

化学物質：Ｎｅｕ５Ａｃα（２，６）－Ｇａｌβ（１－４）－ＧｌｃＮＡｃ－β－エチルアミン及びＮｅｕ５Ａｃα（２，３）－Ｇａｌβ（１－４）－ＧｌｃＮＡｃ－β－エチルアミンはＴＣＩ　ｃｈｅｍｉｃａｌｓ（ティーシーアイ・ケミカルズ）から購入した。ヘプタキス－（６－デオキシ－６－メルカプト）－β－シクロデキストリン及びカルボキシメチル－β－シクロデキストリンナトリウム塩は、Ｃｙｃｌｏｄｅｘｔｒｉｎ－Ｓｈｏｐ（シクロデキストリンショップ）から購入した。１１－ドデセン酸はａｂｃｒ　ＧｍｂＨ（アーベーツェーエル）から購入した。１４－ペンタデセン酸はＬａｒｏｄａｎ　ＡＢ（ラロダン）から購入した。マレイミド－ＰＥＧ$_8$－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＯＯＨはＰｕｒｅＰＥＧ（ピュアーペグ）から購入した。その他の化学物質及び溶媒はすべてＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（シグマ・アルドリッチ）から購入した。

【０１０６】

方法：インフルエンザウイルスを標的としたシクロデキストリン誘導体を３工程で合成した。第１の工程は、シクロデキストリンへのリガンドの結合であった。第２の工程は、リガンドの－ＣＯＯＨ末端基をＮ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）で活性化することであった。第３の工程は、リガンドへのＳＬＮのグラフトであった。

【０１０７】

工程１：リガンドによるβ－シクロデキストリンの修飾

５ｍＬのＤＭＳＯ中で、０．０４ｍｍｏｌのヘプタキス－（６－デオキシ－６－メルカプト）－β－シクロデキストリンを、ＵＶランプ（２５０Ｗ）の存在下で、０．２８ｍｍｏｌのアリル末端基とカルボン酸末端基を持つ２官能分子（リガンド）（６－ヘプテン酸、１１－ドデセン酸又は１４－ペンタデセン酸等）と一晩撹拌した。得られたヘプタキス－（６－デオキシ－６－アルカン酸チオン）－β－シクロデキストリン誘導体を、ＤＣＭ－ジエチルエーテル混合物から遠心分離により沈殿させ、真空下で乾燥させた。

【０１０８】

ＰＥＧ$_8$スペーサーでβ－シクロデキストリンを修飾するために、０．０４ｍｍｏｌのヘプタキス－（６－デオキシ－６－メルカプト）－β－シクロデキストリンを、０．２８ｍｍｏｌのマレイミド－ＰＥＧ$_8$－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＯＯＨとともに、５ｍＬのリン酸バッファ（ｐＨ：６．８）中で一晩撹拌した。この修飾β－シクロデキストリンを透析で精製し、凍結乾燥した。

【０１０９】

工程２：ＮＨＳ活性化反応

それぞれ工程１で得られたシクロデキストリン誘導体０．０４ｍｍｏｌを、１．１２ｍｍｏｌのＮ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）、０．５６ｍｍｏｌのエチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（ＥＤＣ－ｈｃｌ）、及び０．０２ｍｍｏｌの４－ジメチルアミノピリジン（ＤＭＡＰ）とともに、５ｍＬのＤＭＳＯ中で一晩撹拌した。得られたＮＨＳ活性化シクロデキストリン誘導体を、まず氷冷した水で沈殿させ、アセトニトリル及びジエチルエーテルで洗浄した。生成物を真空下で乾燥させた。

【０１１０】

Ｃ１－６’を得るために、工程１を省略し、ＮＨＳ活性化反応を直接行った。カルボキシメチル－β－シクロデキストリンナトリウム塩（０．０４ｍｍｏｌ）を、１．１２ｍｍｏ

ｌのＮＨＳ、０．５６ｍｍｏｌのＥＤＣ－ｈｃｌ及び０．０２ｍｍｏｌのＤＭＡＰを加えることで直接活性化した。活性化反応を一晩行った。得られたシクロデキストリン誘導体を、まずＤＣＭ－ジエチルエーテル混合液から沈殿させ、さらに３回洗浄した。この生成物を真空下で乾燥させた。６’ＳＬＮグラフト化は工程３と同様に行った。

【０１１１】

工程３：三糖グラフト化

５．６μｍｏｌのＮｅｕ５Ａｃα（２，６）－Ｇａｌβ（１－４）－ＧｌｃＮＡｃ－β－エチルアミン（Ｃ１１－３’の場合はＮｅｕ５Ａｃα（２，３）－Ｇａｌβ（１－４）－ＧｌｃＮＡｃ－β－エチルアミン）を、工程２で得られたシクロデキストリン誘導体１．６μｍｏｌと混合した。１５μｍｏｌのトリエチルアミン（ＴＥＡ）を加え、１ｍＬのＤＭＳＯ中で一晩反応させた。反応生成物を０．０１Ｍリン酸バッファ（ｐＨ：７．５）で希釈し、アミコンフィルター（ＭＷＣＯ：３ｋ）を用いて濃縮した。得られたヘプタキス－（６－デオキシ－６－ＳＬＮ－エチルカルボキサミド－アルキルチオ）－β－シクロデキストリン誘導体をさらに蒸留水で洗浄し、凍結乾燥によって乾燥した。リガンド修飾シクロデキストリンへの三糖のグラフト化は、^{1}Ｈ及びＤＯＳＹ　ＮＭＲ研究で確認した（図１６及び図１７）。

【０１１２】

Ｃ１５－６’ＳＬＮ修飾シクロデキストリンの合成

β－ＣＤのＣ１５修飾：５５ｍｇのチオール修飾β－ＣＤと７０ｍｇの１４－ペンタデセン酸を５ｍＬのＤＭＳＯ中で、紫外線下で一晩撹拌した。

【０１１３】

Ｃ１５－β－ＣＤのＮＨＳ活性化：得られた材料を、ＤＭＦ中で、１００ｍｇのＮＨＳ、７５ｍｇのＥＤＣ、２．５ｍｇのＤＭＡＰを用いて一晩かけて活性化した。ＮＨＳで活性化したＣ１５－β－ＣＤを氷冷した水で沈殿させ、さらに３回洗浄した。最後の沈殿はアセトニトリルで行った。

【０１１４】

Ｃ１５－β－ＣＤへの６’ＳＬＮのグラフト化：５ｍｇのＣ１５－β－ＣＤ及び５ｍｇのアミン官能化６’ＳＬＮ及び３ｍｇのＴＥＡをＤＭＳＯ中で一晩撹拌した。得られた材料を、アミコンフィルターを用いて洗浄した。

【０１１５】

ＰＥＧナノ粒子の合成

ＰＥＧ（５）ＮＰの合成：１５ｍＬのＥｔＯＨ中の８８．６ｍｇのテトラクロロ金（３）酸三水和物（$HAuCl_4 \cdot 3H_2O$）を、５ｍＬのＥｔＯＨ中の５６ｍｇのＨＳ－ＰＥＧ（５）と１０分かけて混合した。この混合物に、３７．５ｍＬのＥｔＯＨ中の９４．６ｍｇの水素化ホウ素ナトリウム（ＮａＢＨ４）を滴下して加えた。完全なＮＰ形成のために、一晩反応させた。結果として得られたＮＰは、ＥｔＯＨ－H_2O溶媒混合物を使用してアミコンフィルターを用いて洗浄した。

【０１１６】

ＰＥＧ（５）－Ｃ１５混合リガンドＮＰ：１．５ｍｇの１６－メルカプトヘキサデカン酸（ＨＳ－Ｃ１５－ＣＯＯＨ）及び２０ｍｇのＰＥＧ（５）ＮＰを用いて、ＤＭＦ中で一晩、リガンド交換反応を行った。ＤＭＦ－ジエチルエーテル混合液からＮＰを沈殿させ、さらに３回洗浄した。

【０１１７】

ＮＰのＮＨＳ活性化：１５ｍｇのＮＰを、１０ｍｇのＮ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＮＨＳ）、２ｍｇのエチルカルボジイミド塩酸塩（ＥＤＣ）、０．１ｍｇの４－（ジメチルアミノ）ピリジン（ＤＭＡＰ）を用いて、ＤＭＦ中で一晩、活性化した。得られたＮＰをＤＭＦ－ジエチルエーテル混合液から析出させ、さらに３回洗浄した。

【０１１８】

ＮＰへの６’ＳＬＮのグラフト化：１ｍＬのＤＭＳＯ中の５ｍｇのＮＨＳ活性化ＮＰを、３ｍＬの０．１Ｍリン酸バッファ（ｐＨ：７．５）中の１．７ｍｇのアミン官能化６’ＳＬ

Ｎと混合した。５時間反応させた後、６’ＳＬＮグラフトＮＰをアミコンフィルターで洗浄した。

【０１１９】

生物学的アッセイ

材料：ＤＭＥＭ－Ｇｌｕｔａｍａｘ培地はＴｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｃｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ（サーモフィッシャーサイエンティフィック）から購入した。洗浄バッファ用のＴｗｅｅｎ ２０（登録商標）及び３，３’－ジアミノベンジジン（ＤＡＢ）錠剤はＳｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈから購入した。一次抗体（Ａ型インフルエンザモノクローナル抗体）は、Ｌｉｇｈｔ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ（ライト・ダイアグノスティクス）から購入した。二次抗体（抗マウスＩｇＧ、ＨＲＰ結合抗体）はＣｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（登録商標）から購入した。テトラゾリウム化合物［３－（４，５－ジメチルチアゾール－２－イル）－５－（３－カルボキシメトキシフェニル）－２－（４－スルホフェニル）－２Ｈ－テトラゾリウム、分子内塩；ＭＴＳ］と電子結合試薬（フェナジン・エトスルフェート；ＰＥＳ）を含むＣｅｌｌＴｉｔｅｒ ９６（登録商標） ＡＱｕｅｏｕｓ Ｏｎｅ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ Ｃｅｌｌ Ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ ＡｓｓａｙはＰｒｏｍｅｇａ（プロメガ）から購入した。

【０１２０】

細胞培養：

ＭＤＣＫ（メイディン・ダービー・イヌ腎臓細胞、Ｍａｄｉｎ－Ｄａｒｂｙ Ｃａｎｉｎｅ Ｋｉｄｎｅｙ Ｃｅｌｌｓ）細胞株は、ＡＴＣＣ（アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）、ロックビル（Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ）、メリーランド州）から購入した。この細胞は、１０％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）及び１％ペニシリン／ストレプトマイシンを含むグルコース添加ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ＋ＧｌｕｔａＭＡＸ（商標））中で培養した。ＭＤＣＫ細胞株は、CO_2（５％）を含む加湿空気中で３７℃で培養した。

【０１２１】

ウイルス株：

ＨＳＶ－２の臨床分離株は、もともとはＭ．Ｐｉｓｔｅｌｌｏ教授（ピサ大学（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｐｉｓａ）、イタリア）から提供されたもので、Ｖｅｒｏ細胞でのプラークアッセイにより増殖させ、滴定した。Ｈ１Ｎ１ Ｎｅｔｈ０９及びＢ Ｙａｍａｇａｔａは、Ｍ．Ｓｃｈｍｏｌｋｅ教授（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｇｅｎｅｖａ（ジュネーブ大学））からの寄贈品である。鳥類株ＮＩＢＲＧ－２３（Ａ／ｔｕｒｋｅｙ／Ｔｕｒｋｅｙ／１／２００５ Ｈ５Ｎ１表面タンパク質及びＡ／ＰＲ／８／３４（Ｈ１Ｎ１）バックボーンを用いて逆遺伝学的に調製したもの）は、イギリス国立生物学的製剤研究所（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｆｏｒ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｓｔａｎｄａｒｄｓ ａｎｄ Ｃｏｎｔｒｏｌｓ）、ポッターズ・バー（Ｐｏｔｔｅｒｓ Ｂａｒ）、英国から入手し、１０日齢の胚化鶏卵でさらに増殖させた後、ウイルスの精製と特性評価を行った。臨床サンプルは、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｈｏｓｐｉｔａｌ ｏｆ Ｇｅｎｅｖａ（ジュネーブ大学病院）から匿名の患者から提供された。すべてのインフルエンザ株は、ＴＰＣＫ処理したトリプシン（０．２ｍｇ／ｍｌ）の存在下、ＭＤＣＫ細胞上でＩＣＣにより増殖、滴定した。

【０１２２】

細胞生存率アッセイ

細胞生存率は、ＭＴＳ［３－（４，５－ジメチルチアゾール－２－イル）－５－（３－カルボキシメトキシフェニル）－２－（４－スルホフェニル）－２Ｈ－テトラゾリウム］アッセイにより測定した。９６ウェルプレートに播種したコンフルエントな細胞培養物を、抗ウイルスアッセイについて記載したのと同じ実験条件で、異なる濃度のナノ粒子又はリガンドと三重にインキュベートした。ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ ９６ Ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ Ａｓｓａｙ Ｋｉｔ（Ｐｒｏｍｅｇａ、マディソン（Ｍａｄｉｓｏｎ）、ウィスコンシン州、米国）によって、製造者の使用説明書に従って細胞生存率を測定した。吸光度

は、マイクロプレートリーダー（Ｍｏｄｅｌ ６８０、ＢＩＯＲＡＤ（バイオ・ラッド））を用いて４９０ｎｍで測定した。ナノ粒子又はシクロデキストリンの異なる濃度における細胞生存率への影響は、処理した細胞の吸光度を培養液のみでインキュベートした細胞の吸光度と比較することにより、パーセントで表した。５０％細胞毒性濃度（CC_{50}）及び９５％信頼区間（ＣＩ）は、Ｐｒｉｓｍソフトウェア（Ｇｒａｐｈ－Ｐａｄ Ｓｏｆｔｗａｒｅ（グラフパッド・ソフトウェア）、サンディエゴ、カリフォルニア州）を用いて求めた。

【０１２３】

阻害アッセイ

ＭＤＣＫ細胞を９６ウェルプレートに２４時間前にプレプレーティングした。濃度を上げた材料をインフルエンザウイルス（ＭＯＩ：Ｈ５Ｎ１では０．０２又は０．０１、その他のウイルスでは０．１）と３７℃で１時間インキュベートした後、この混合物を細胞に添加した。ウイルスの吸着（３７℃で１時間）後、接種したウイルスを除去し、細胞を洗浄して新鮮な培地を加えた。３７℃で２４時間インキュベートした後、免疫細胞化学（ＩＣＣ）アッセイで感染を分析した。細胞を固定し、メタノールで透過処理した。その後、一次抗体（１：１００希釈）を加え、３７℃で１時間インキュベートした。細胞を洗浄バッファ（ＤＰＢＳ＋Ｔｗｅｅｎ ０．０５％）で3回洗浄した後、２次抗体（１：７５０希釈）を加えた。１時間後、細胞を洗浄し、ＤＡＢ溶液を加えた。感染細胞を数え、処理した条件と未処理の条件での感染細胞の数を比較して感染率を算出した。

【０１２４】

Ｈ５Ｎ１の場合は、フローサイトメトリーを用いた阻害アッセイを追加で行った。ＭＤＣＫ細胞を２４時間前に２４ウェルプレートにプレプレーティングした（７５，０００細胞／ウェル）。濃度を上げた材料をインフルエンザウイルス（ＭＯＩ：０．０４）とともに３７℃で１時間インキュベートした後、この混合物を細胞に添加した。ウイルスの吸着（３７℃で１時間）後、接種したウイルスを除去し、細胞を洗浄して新鮮な培地を加えた。３７℃で５時間インキュベートした後、フローサイトメトリーで感染を分析した。簡単に説明すると、細胞をトリプシン処理し、ＩＣ固定バッファ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、オランダ）を用いて室温で１５分間固定した後、１×ＩＣ透過処理バッファ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、オランダ）を用いて4℃で１５分間透過処理を行った。Ａｎｔｉ－Ｉｎｆｌｕｅｎｚａ Ａ Ｖｉｒｕｓ Ｎｕｃｌｅｏｐｒｏｔｅｉｎマウスモノクローナル抗体［Ｄ６７Ｊ］（ＦＩＴＣ）（Ａｂｃａｍ ａｂ２１０５２６、オランダ）を用いて、４℃で３０分間、細胞を染色した。抗体の希釈率は透過処理バッファで１：８０とし、チューブあたり５０μｌを加えた。ＦＡＣＳ解析は、ＦＡＣＳ Ｃａｌｉｂｕｒ ３ソフトウェアを用いて行った。感染細胞数の５０％減少をもたらす濃度（有効濃度（EC_{50}））をＰｒｉｓｍソフトウェアを用いて決定した。図１８に示すように、ＦＡＣＳのゲーティング戦略を行った。ＦＳＣ／ＳＳＣに基づいて最初のゲーティングを行い、次にＦＩＴＣのネガティブゲートを行った。このゲーティングを残りのサンプルに適用した。

【０１２５】

Ｈ７Ｎ１の感染力はルシフェラーゼ活性で評価した。ＭＤＣＫ細胞を９６ウェルプレートに5×10^4個で播種した。２４時間後、培地を無血清培地に交換した。濃度を上げたＣ１１－３’を、ナノルシフェラーゼ（ＮａｎｏＬｕｃｉｆｅｒａｓｅ）をコードするＨ７Ｎ１ Ａ／Ｔｕｒｋｅｙ／Ｉｔａｌｙ／９７７／１９９９の１００ｐｆｕとインキュベートした。この混合物を３７℃で１時間インキュベートした後、細胞に加えて３７℃でさらに１時間インキュベートした（１ウェルあたり１００μＬ）。細胞を洗浄し、培地を１μｇ／ｍＬのＴＰＣＫ－トリプシンを含む無血清培地に交換した。感染から２４時間後、細胞を洗浄した後、ＰＢＳで１／２に希釈したＮａｎｏ Ｇｌｏ（登録商標）Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ Ａｓｓａｙ Ｂｕｆｆｅｒ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を1ウェルあたり４０μＬ用いて溶解した。Ｔｅｃａｎ Ｉｎｆｉｎｉｔｅ Ｍ２００ＰＲＯプレートリーダーを用いて、細胞溶解液中のルシフェラーゼ活性を測定した。ＰＢＳで１／５０００に希釈したＮａｎｏ

Ｇｌｏ（登録商標）Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ　Ａｓｓａｙ　Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（Ｐｒｏｍｅｇａ）１５μｌを各ウェルの細胞溶解液１５μｌに加えた。

【０１２６】

殺ウイルス性アッセイ

ウイルス（フォーカス形成単位（ｆｆｕ）：10^5／ｍＬ）と試験材料（EC_{99}濃度、表７）を３７℃で１時間インキュベートした。ウイルス－材料複合体の連続希釈を、未処理の対照とともに行い、細胞上に移した。１時間後、上記混合物を除去し、新鮮な培地を加えた。翌日、ウイルスの力価をＩＣＣアッセイで評価した。ＩＣＣアッセイでは、上述の同じ手順に従った。

【０１２７】

【表７】

表 7: インビトロ殺ウイルス性アッセイを行った材料濃度.

	材料	濃度 (μg/mL)
A/Netherlands/2009 H1N1	C6-6’	100
	C11-6’	100
	C14-6’	100
	P8-6’	500
	C11-3’	500
	NPC15-6’SLN	100
	NP PEG4-6’SLN	500
A/Singapore/2004 H3N2	C11-6’	100
B/Wisconsin/2010	C11-6’	200

【０１２８】

データ解析

すべての結果は、二重に行った３回の独立した実験の平均値として提示されている。阻害曲線のEC_{50}値は、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍバージョン５．０（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ、サンディエゴ、カリフォルニア州、米国）というプログラムを用いて回帰分析を行い、可変勾配－シグモイド用量反応曲線に当てはめて算出した。

【０１２９】

エキソビボ

共処理番号１：Ｈ１Ｎ１　Ｎｅｔｈ／０９株（ｐｆｕ：10^4～10^5）及びＣＤ－Ｃ１５－６’ＳＬＮ（４００μｇ／ｍＬ）をＭｕｃｉｌＡｉｒ（ヒト気道上皮の再構築物）に同時に添加した。４時間後、上清を除去し、新鮮な培地を加えた。上清のウイルス力価を２４時間ごとにｑＰＣＲで追跡した。

共処理番号２：インビトロで再構築したヒト気道上皮、ＭｕｃｉｌＡｉｒ組織（Ｅｐｉｔｈｅｌｉｘ　Ｓａｒｌ（エピセリクス）、ジュネーブ、スイス）を、健康なドナーに由来する鼻ポリープ上皮細胞の混合物から気液界面で培養した。インフルエンザＨ１Ｎ１ｐｄｍ　２００９臨床株（10^4ｒｎａコピー／組織）及びＣ１１－６’（５０μｇ／組織）を、未処理の対照とともに、事前にインキュベートすることなく組織に移した。４時間のインキュベーション後、組織を２回洗浄した。１日ごとに基礎培地を交換した。毎日ｑＰＣＲ測定を行うために、２００μＬの培地を組織に加え、２０分後に回収した。ＥＺＮＡウイルス抽出キット（Ｏｍｅｇａ　Ｂｉｏｔｅｋ（オメガ・バイオテック））で抽出したＲＮＡを、ＳｔｅｐＯｎｅ　ＡＢＩ　Ｔｈｅｒｍｏｃｙｃｌｅｒ中でＱｕａｎｔｉＴｅｃｔキット（番号２０４４４３；Ｑｉａｇｅｎ（キアゲン）、ヒルデン（Ｈｉｌｄｅｎ）、ドイツ）を用いてｑＰＣＲを使用することにより定量した。

【０１３０】
後処理：ＭｕｃｉｌＡｉｒの組織をＨ１Ｎ１　ｐｄｍ　２００９に感染させた（１０^{4}コピー／組織）。４時間後に接種物を除去し、組織を洗浄した。２０時間後、２０分間（’）の頂部洗浄を行い、続いてＣ１１－６’（３０μｇ／組織）、又は未処理組織では同量の培地を頂部に加えた。毎日、２０分間（’）の頂部洗浄の後、Ｃ１１－６’の新たな添加を行った。その後、ＲＮＡを抽出し、上述の方法でｑＰＣＲを行った。毒性研究のために、ウイルスのない状態で同様の手順を行った。
【０１３１】
免疫蛍光
インフルエンザ感染細胞は、Ａ型インフルエンザ抗体（Ｌｉｇｈｔ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ）を用いて直接検出し、βチューブリン一次ウサギ抗体（Ａｂｃａｍ（アブカム））を繊毛細胞のマーカーとして使用した。二次抗体としてＡｌｅｘａ　４８８－ヤギ抗ウサギ抗体及びＡｌｅｘａ　５９４－ヤギ抗マウス抗体（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（ライフ・テクノロジーズ））を使用し、核をＤＡＰＩで染色した。画像は、Ｚｅｉｓｓ　ＬＳＭ　７００　Ｍｅｔａ共焦点顕微鏡で取得し、Ｉｍａｒｉｓで処理した。
【０１３２】
乳酸脱水素酵素アッセイ（ＬＤＨ）
基礎培地中のＬＤＨ放出は、Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｒｏｃｈｅ（ロシュ）　０４７４４９２６００１）を用いて測定した。
【０１３３】
ＭＴＴアッセイ
ＭＴＴ溶液をＭｕｃｉｌＡｉｒ培地（１ｍｇ／ｍｌ）で希釈し、３００μｌを２４ウェルプレートに基礎培地として加えた。３７℃で４時間培養した後、組織を新しいプレートに移し、１ｍｌのＤＭＳＯで溶解した。上清を５７０ｎｍで読み取った。処理した組織と未処理の組織を比較して、生存率を算出した。
【０１３４】
ＥＬＩＳＡ
インターロイキン－６（ＩＬ－６）、ＣＸＣモチーフケモカイン１０（ＣＸＣＬ１０又はＩＰ－１０）、ＣＣモチーフケモカイン５（ＣＣＬ５又はＲＡＮＴＥＳ）、インターロイキン－８（ＩＬ－８又はＣＸＣＬ－８）、及びインターフェロンλ（ＩＬ－２９／ＩＬ－２８Ｂ）を、異なる濃度のＣＤで毎日処理した後に、ＥＬＩＳＡ法（Ｒ＆Ｄ　ＤＹ２０６－０５、ＤＹ２６６－０５、ＤＹ２７８－０５、ＤＹ２０８－０５、ＤＹ１５９８Ｂ－０５）により基礎培地中で測定した。
【０１３５】
インビボ
前処置：５匹のＢＡＬＢ／ｃマウスの４群を、０日目に５０μｌのＰＢＳ又はＣ１１－６’（５０μｌ中２５μｇ）で処置し、直ちにＡ／ＮＬ／０９（１０^{6}ｆｆｕ）を接種した。毎日マウスの体温と体重を測定した。感染後２日目に２群のマウスを犠牲にした（１群はｐｂｓ、もう１群はＣ１１－６’処置）。肺ホモジネートと鼻粘膜、及び気管支肺胞洗浄液を採取し、ｑＰＣＲ測定によりウイルスの力価を定量した。Ｃ１１－６’処置群は、同量のナノ粒子で再処置した。２日後、残ったすべてのマウスを犠牲にし、肺ホモジネートと鼻粘膜を採取した。組織を破壊した後、ＲＮＡをＴｒｉｚｏｌで抽出し、ｑＰＣＲを用いて定量し、ＢＡＬはプラークアッセイに供した。２回の独立した実験を行った。
【０１３６】
後処置：１０匹のＢＡＬＢ／ｃマウスの２群を、Ａ／ＮＬ／０９（１０^{2}ｆｆｕ）に感染させ、感染後６時間目に処置し、その後７日間毎日処置した。マウスの体温と体重を毎日測定した。生存試験では人道的なエンドポイントを用い、体重が開始時の体重の７５％に減少した時点で頸椎脱臼によりマウスを安楽死させた。加えて、（刺激に反応せず、気づかないような）瀕死の状態になった動物も安楽死させた。
【０１３７】

用量反応アッセイ

一定ウイルス濃度（ｆｆｕ：10^3）を、用量の異なるナノ粒子と一緒に、３７℃で１時間インキュベートした。その後、この混合物を細胞に移した。１時間後、混合物を除去し、細胞を洗浄した。翌日、免疫細胞化学（ＩＣＣ）アッセイで感染を分析した。

【０１３８】

参考文献

１．Ｍａｍｍｅｎ，Ｍ．、Ｃｈｏｉ，Ｓ．－Ｋ．及びＷｈｉｔｅｓｉｄｅｓ，Ｇ．Ｍ．Ｐｏｌｙｖａｌｅｎｔ Ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎｓ ｉｎ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｓｙｓｔｅｍｓ：Ｉｍｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｆｏｒ Ｄｅｓｉｇｎ ａｎｄ Ｕｓｅ ｏｆ Ｍｕｌｔｉｖａｌｅｎｔ Ｌｉｇａｎｄｓ ａｎｄ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ．Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．３７、２７５４－２７９４（１９９８）．

２．Ｒｅｕｔｅｒ，Ｊ．Ｄ．ら、Ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ ｏｆ Ｖｉｒａｌ Ａｄｈｅｓｉｏｎ ａｎｄ Ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ ｂｙ Ｓｉａｌｉｃ－Ａｃｉｄ－Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ Ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ Ｐｏｌｙｍｅｒｓ．Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇ．Ｃｈｅｍ．１０、２７１－２７８（１９９９）．

３．Ｐａｐｐ，Ｉ．ら、Ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ ｏｆ Ｉｎｆｌｕｅｎｚａ Ｖｉｒｕｓ Ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ ｂｙ Ｍｕｌｔｉｖａｌｅｎｔ Ｓｉａｌｉｃ－Ａｃｉｄ－Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌｉｚｅｄ Ｇｏｌｄ Ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ．Ｓｍａｌｌ ６、（２０１０）．

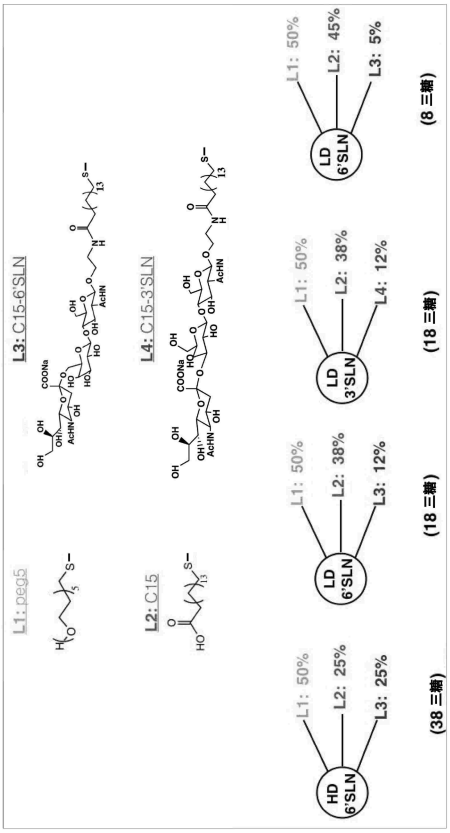
４．Ｐａｐｐ，Ｉ．ら、Ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ ｏｆ Ｉｎｆｌｕｅｎｚａ Ｖｉｒｕｓ Ａｃｔｉｖｉｔｙ ｂｙ Ｍｕｌｔｉｖａｌｅｎｔ Ｇｌｙｃｏａｒｃｈｉｔｅｃｔｕｒｅｓ ｗｉｔｈ Ｍａｔｃｈｅｄ Ｓｉｚｅｓ．ＣｈｅｍＢｉｏＣｈｅｍ １２、８８７－８９５（２０１１）．

５．Ｔａｎｇ，Ｓ．ら、Ａｎｔｉｖｉｒａｌ Ａｇｅｎｔｓ ｆｒｏｍ Ｍｕｌｔｉｖａｌｅｎｔ Ｐｒｅｓｅｎｔａｔｉｏｎ ｏｆ Ｓｉａｌｙｌ Ｏｌｉｇｏｓａｃｃｈａｒｉｄｅｓ ｏｎ Ｂｒｕｓｈ Ｐｏｌｙｍｅｒｓ．ＡＣＳ Ｍａｃｒｏ Ｌｅｔｔ．５、４１３－４１８（２０１６）．

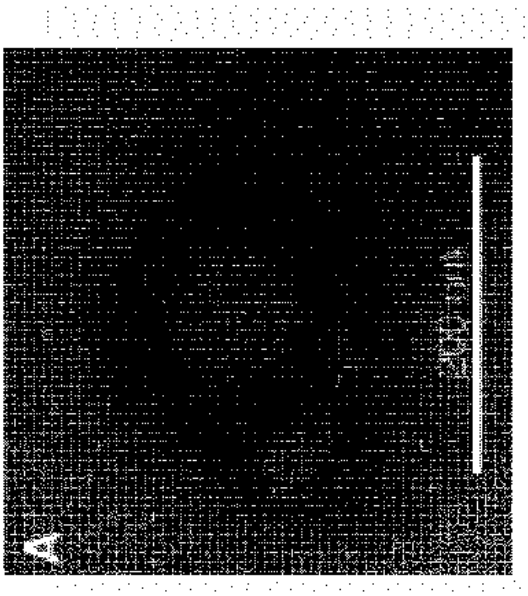
６．Ｋｗｏｎ，Ｓ．－Ｊ．ら、Ｎａｎｏｓｔｒｕｃｔｕｒｅｄ ｇｌｙｃａｎ ａｒｃｈｉｔｅｃｔｕｒｅ ｉｓ ｉｍｐｏｒｔａｎｔ ｉｎ ｔｈｅ ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ ｏｆ ｉｎｆｌｕｅｎｚａ Ａ ｖｉｒｕｓ ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ．Ｎａｔ．Ｎａｎｏｔｅｃｈｎｏｌ．１２、４８－５４（２０１７）．

【図面】

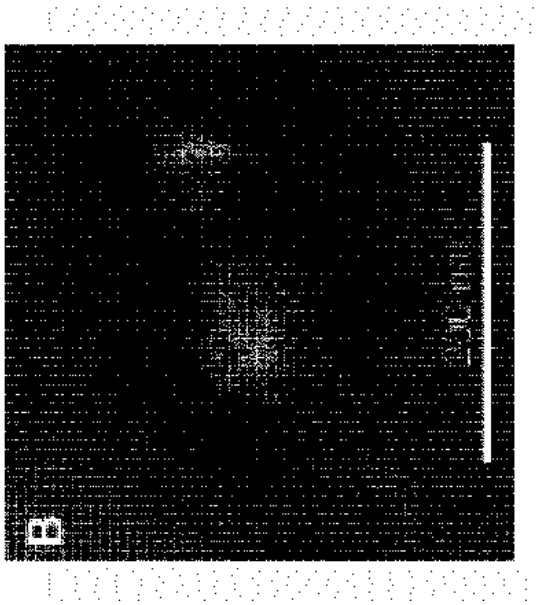
【図１】



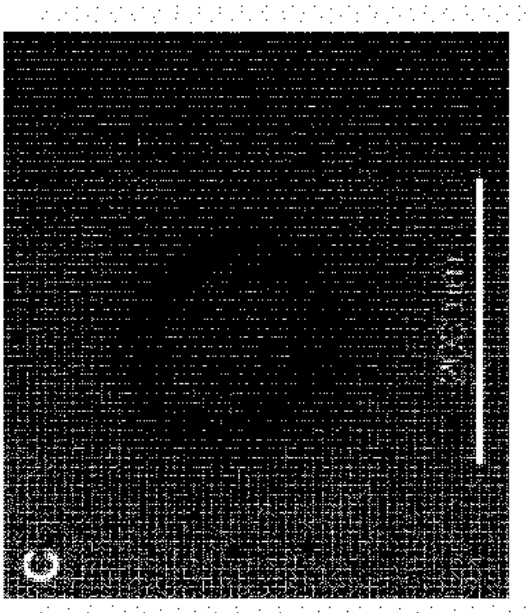
【図２Ａ】



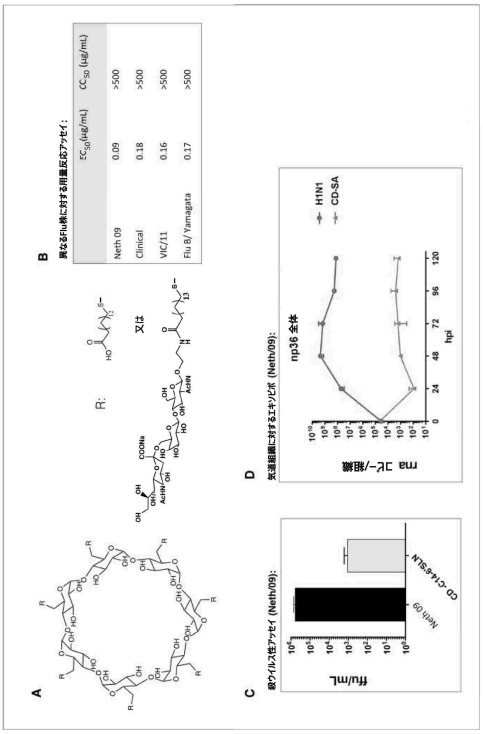
【図２Ｂ】



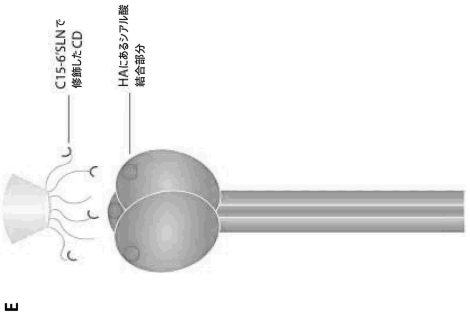
【図２Ｃ】



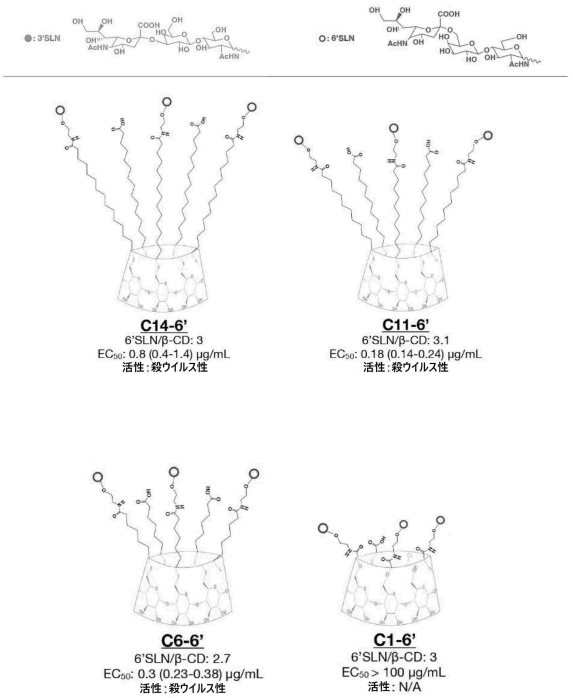
【図３（１）】



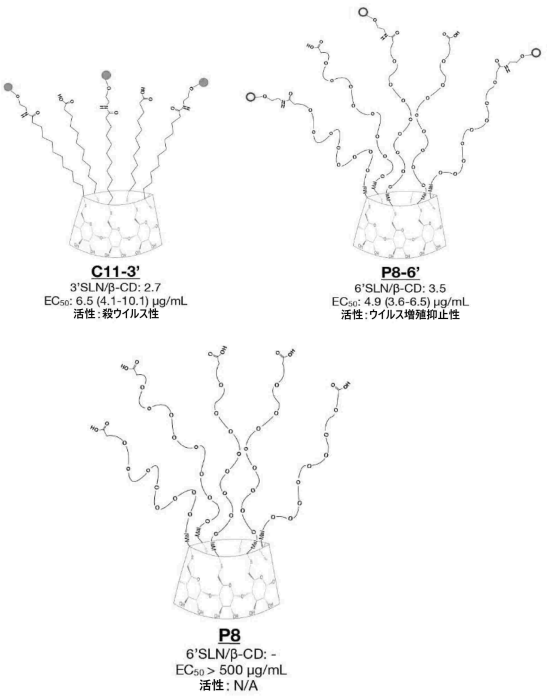
【図３（２）】



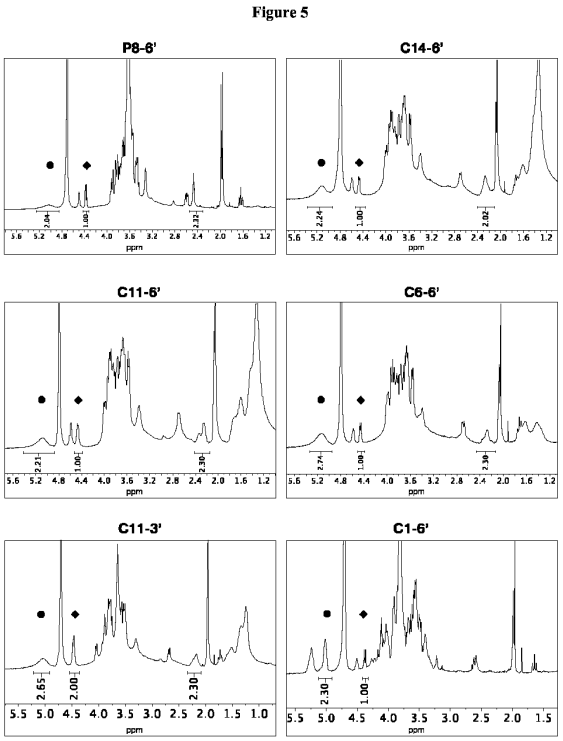
【図４（１）】



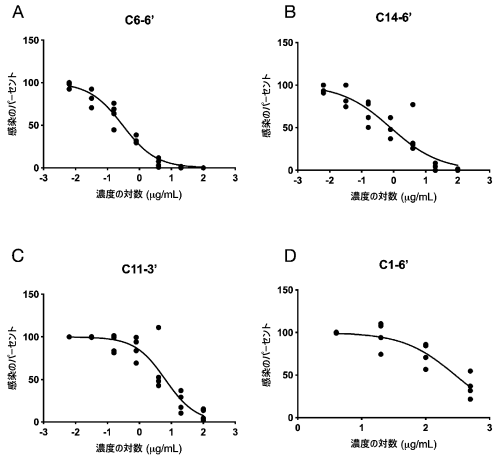
【図４（２）】



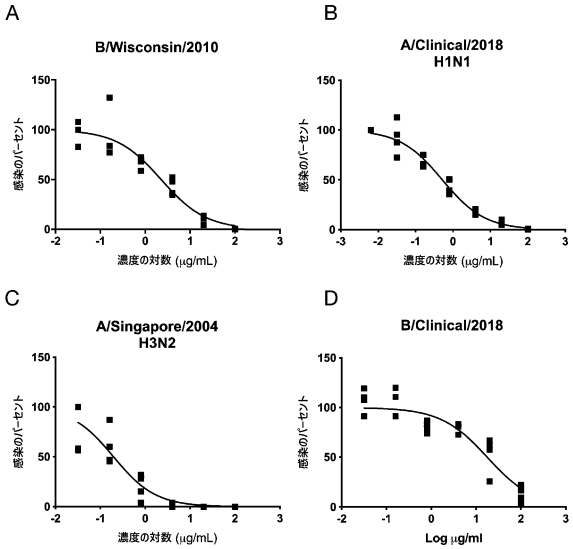
【図５】


Figure 5
P8-6'
C14-6'
C11-6'
C6-6'
C11-3'
C1-6'
ppm

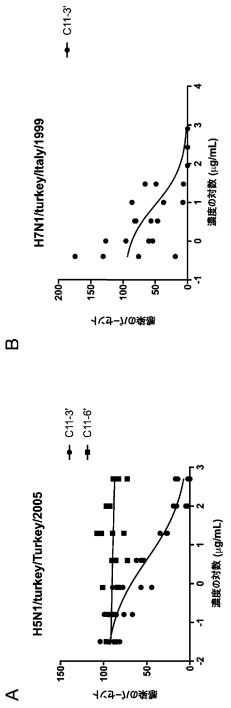
【図６】


A
C6-6'
B
C14-6'
C
C11-3'
D
C1-6'
感染のパーセント
濃度の対数 (μg/mL)

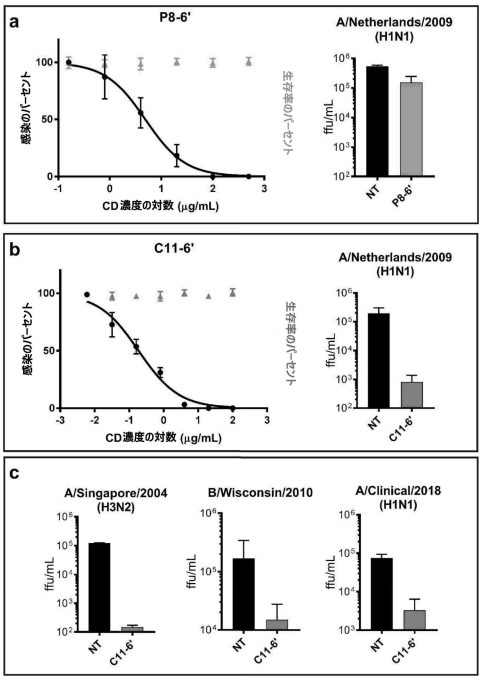
【図７】


A
B/Wisconsin/2010
B
A/Clinical/2018
H1N1
C
A/Singapore/2004
H3N2
D
B/Clinical/2018
感染のパーセント
濃度の対数 (μg/mL)
Log μg/ml

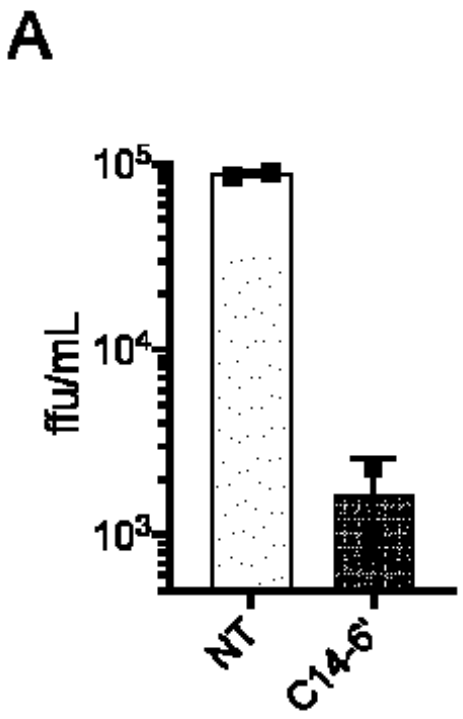
【図８】


C11-3'
H7N1/turkey/Italy/1999
濃度の対数 (μg/mL)
B
C11-3'
C11-6'
H5N1/turkey/Turkey/2005
濃度の対数 (μg/mL)
A

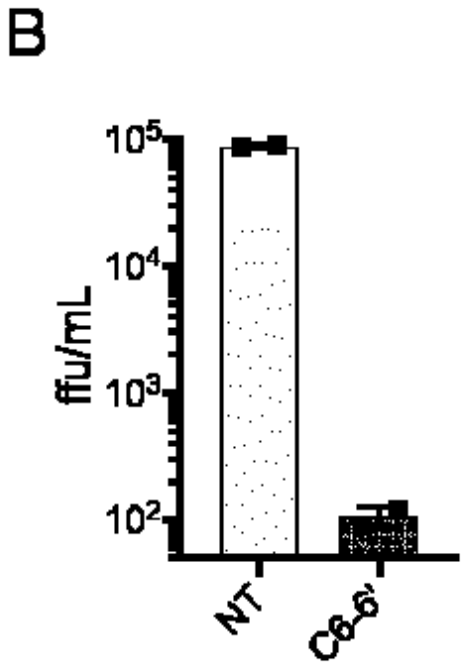
【図９】



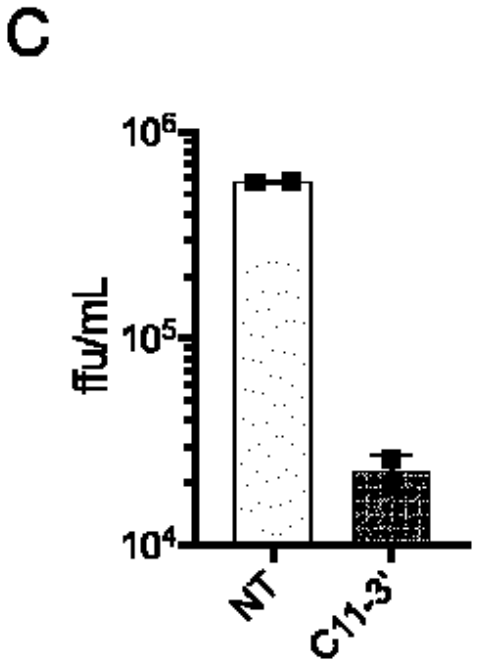
【図１０Ａ】



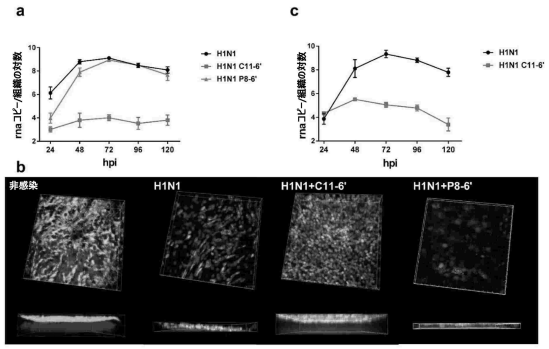
【図１０Ｂ】



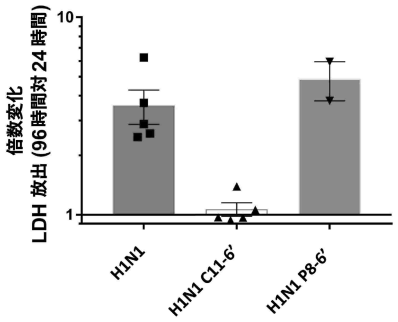
【図１０Ｃ】



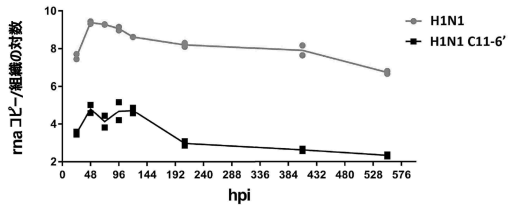
【図１１】



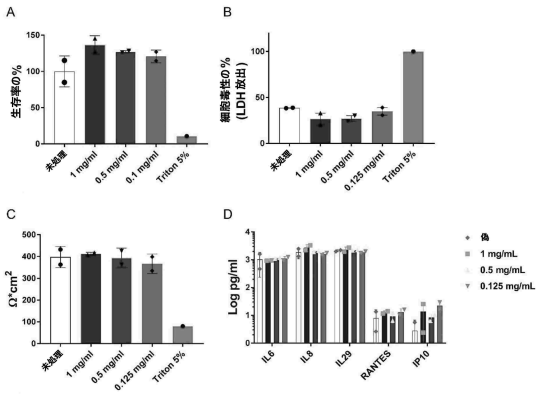
【図１２】



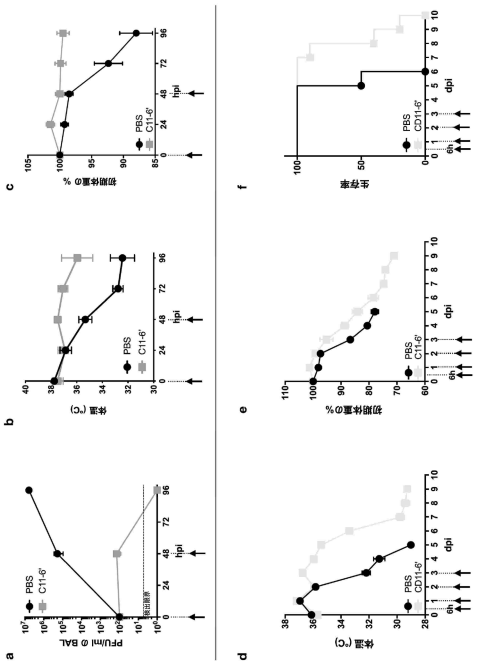
【図１３】



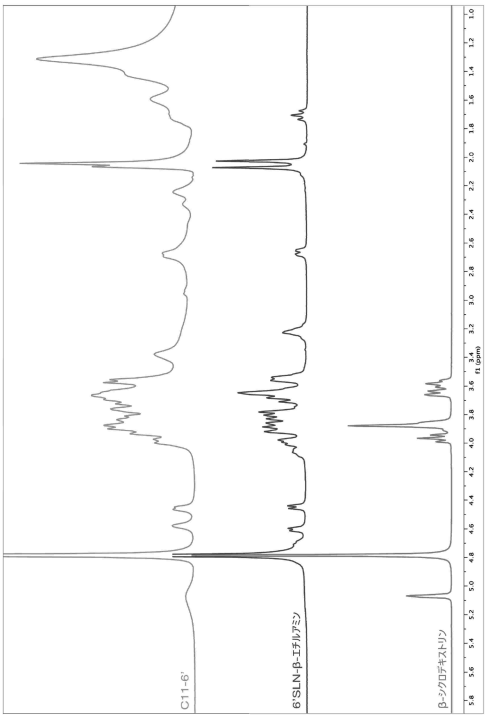
【図１４】



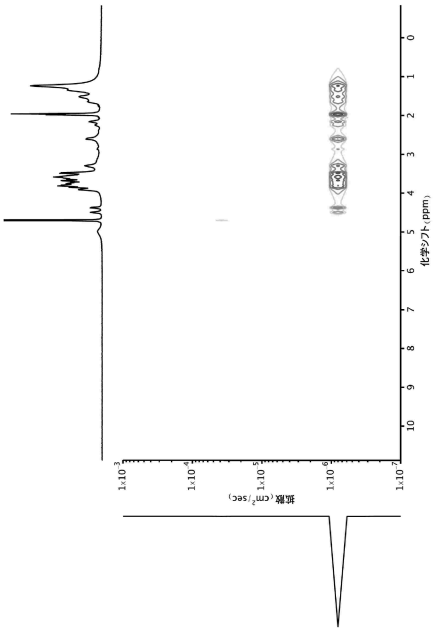
【図１５】



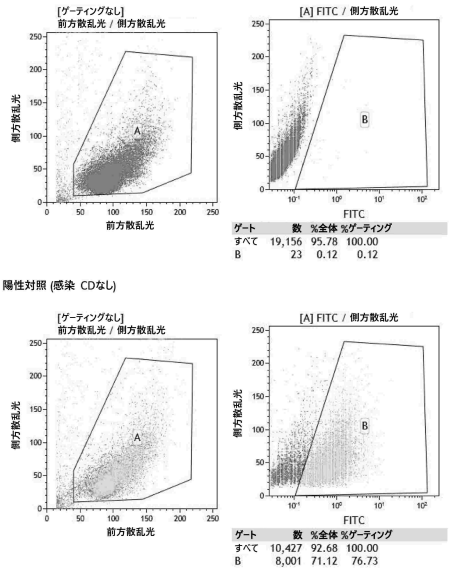
【図１６】



【図１７】



【図１８】



フロントページの続き

(74)代理人　230113332
弁護士　山本 健策
(72)発明者　タッパレル ヴー カロリーヌ
スイス国 １２２４ シェヌ－ブジュリー シュマン デ エグランティエ １０エー
(72)発明者　カーニョ ヴァレリア
スイス国 １２２４ シェヌ－ブジュリー シュマン デ フロンバーズ ９
(72)発明者　コカビイク オズグン
スイス国 １００３ ローザンヌ リュ ボー セジュール ８イー
(72)発明者　ステラッチ フランチェスコ
スイス国 １１１０ モルジュ アヴェニュ オーギュスト フォレル ４
審査官　春日 淳一
(56)参考文献　米国特許出願公開第２０１４／０１３５４７７（ＵＳ，Ａ１）
国際公開第２００９／００１８０５（WO，Ａ１）
国際公開第２０１８／０１５４６５（WO，Ａ１）
国際公開第２０１８／１９９１７９（WO，Ａ１）
Antiviral Research，2005年，Vol.68，p.116-123
Chem Commun，2017年，Vol.53，p.10528-10531
Biomaterials，2016年，Vol.78，p.74-85
(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ，Ａ６１Ｐ
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）